

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

## **Sfere di silice mesoporosa funzionalizzate con ioni zinco per applicazioni emostatiche**



### **Relatori**

Prof.ssa Barbara Onida  
Dott.ssa Sara Saber Younes Mohamed

### **Candidato**

Giovanni Stanchieri

Marzo 2024



# Indice

<b>Acronimi</b>	<b>III</b>
<b>Introduzione</b>	<b>V</b>
<b>1. Silici mesoporose come agenti emostatici</b>	<b>1</b>
1.1 Coagulazione	1
1.1.1 Emostasi primaria	1
1.1.2 Emostasi secondaria	1
1.2 Le silici mesoporose (SM): Generalità	4
1.2.1 Tipologie di particelle di silice mesoporosa	4
1.2.2 Processi di sintesi	6
1.3 Applicazioni delle particelle di silice mesoporosa come agenti emostatici	11
1.3.1 Attività emostatica di silici mesoporose	11
1.3.2 Attività emostatica di silici funzionalizzate	13
1.4 Conclusioni	17
<b>2 Attività antibatterica degli ioni zinco</b>	<b>19</b>
<b>3 Materiali e metodi</b>	<b>21</b>
3.1 I materiali	21
3.2 Sintesi delle sfere di silice mesoporosa	21
3.3 Processo di funzionalizzazione con ioni zinco	21
3.4 Caratterizzazione strumentale	22
3.4.1 Microscopia elettronica FESEM e spettroscopia EDX	22
3.4.2 Analisi di fisisorbimento di azoto	22
3.4.3 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)	23
3.4.4 Diffrazione a raggi X (XRD)	23
3.4.5 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)	23
3.5 Test emostatici	23
<b>4 Risultati</b>	<b>25</b>
4.1 Caratterizzazione del campione SSM	25
4.2 Caratterizzazione del campione SSM-H <sub>2</sub> O	27
4.3 Caratterizzazione dei campioni funzionalizzati (Zn5%@SSM e Zn10%@SSM)	29
4.4 Risultati dei test emostatici	37
<b>5. Conclusioni e sviluppi futuri</b>	<b>39</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>41</b>



## Acronimi

<b>ADP</b>	Adenosin difosfato
<b>AgNP</b>	Nanoparticelle di argento
<b>AgCaMSS</b>	Particelle di silice mesoporosa funzionalizzate con ioni Argento e ioni calcio
<b>APTMAC</b>	Cloruro di (3-acrilammidopropil) trimetilammonio
<b>APTT</b>	Tempo di trombina parziale attivata
<b>BET</b>	Modello Emmet-Brunauer-Teller
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ione calcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro di calcio
<b>CBT</b>	Blood clotting test; test di coagulazione
<b>CCK-8</b>	Cell Counting Kit 8
<b>CCM-MSN</b>	Nanoparticelle di silice mesoporosa funzionalizzate con curcumina
<b>CCM/MSN</b>	Rapporto in massa tra curcumina e particelle di silice mesoporosa
<b>CG</b>	Garza emostatica Combat Gauze
<b>COK</b>	Centre for Research Chemistry and Catalysis
<b>CPTES</b>	$\gamma$ -cloropropil-trietossisilano (CPTES)
<b>CSH-MS</b>	Idrogel cationico super-adsorbente coordinato con particelle di silice mesoporosa
<b>CSH-MS1</b>	Idrogel cationico super-adsorbente coordinato con particelle di silice mesoporosa al 5%
<b>CSMS-S</b>	Nanoparticelle di silice mesoporosa rivestite da chitosano
<b>CSSX</b>	Xerogel di silice rivestite da chitosano macroporoso
<b>CTAB</b>	Bromuro di cetiltrimetilammonio
<b>CTAC</b>	Cloruro di cetiltrimetilammonio
<b>DFT</b>	Density Functional Theory
<b>DFU</b>	Technical Deft University
<b>DNA</b>	Acido desossiribonucleico
<b>EDS/EDX</b>	Energy Dispersive X-ray Analysis/Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
<b>F<sup>x</sup></b>	Fattore presente nel sangue responsabile della coagulazione, dove “x” indica un numero romano, in forma inattiva
<b>F<sup>x</sup>*</b>	Fattore presente nel sangue responsabile della coagulazione, dove “x” indica un numero romano, in forma attivata
<b>FDU</b>	Furdan University Material
<b>FESEM</b>	Field emission scanning electron microscopy
<b>FT-IR</b>	Spettrofotometria infrarossa in trasformata di Fourier
<b>Ga<sub>0,5</sub>CaMSS</b>	Particelle di silice mesoporose dopate con ioni calcio e ioni gallio
<b>GACS</b>	Spugna carbosimetil N-alchilata modificata con glicerolo
<b>GP Ib</b>	Glicoproteina Ib
<b>GPIIb/IIIa</b>	Recettori GPIIb e GPIIIa presenti sulle piastrine
<b>HCl</b>	Acido cloridrico
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Acqua
<b>HMM</b>	Hiroshima Meseoporus Material

<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>KCC-1</b>	Fibrous nano-silica sphere
<b>KCl</b>	Cloruro di potassio
<b>KIT</b>	Korean Advanced Institute of Science and Technology
<b>M41S</b>	Famiglia di particelle di silice mesoporosa prodotte dalla Mobil Oil Company
<b>MCM</b>	Mobil Crystalline Materials; Mobil Composition of matter
<b>MSM</b>	Microparticelle di silice mesoporosa
<b>MSN</b>	Mesoporous silica nanoparticles; nanoparticelle di silice mesoporosa
<b>MSN@CS-HCA</b>	Manoparticelle di silice mesoporosa modificate con acido idrocaffeico e chitosano
<b>MSN@U</b>	Nanoparticelle di silice mesoporosa funzionalizzate con urusciolo
<b>MSN-GACS</b>	Spugna carbossimetil N-alchilata modificata con glicerolo e nanonparticelle di silice mesoporosa
<b>pH</b>	Indicatore della scala di acidità o basicità di una soluzione
<b>PEG</b>	Polietilenglicole
<b>PT</b>	Tempo di protrombina
<b>rpm</b>	Rotazioni al minuto
<b>SANS</b>	Small angle neutron scattering
<b>SAXS</b>	Small angle X-ray scattering
<b>SBA</b>	Santa Barbara Amorphus
<b>SEM</b>	Microscopia elettronica a scansione
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Silice; diossido di silicio
<b>SM</b>	Silici mesoporose
<b>SSM</b>	Campione di sfere di silice mesoporosa
<b>SSM-H<sub>2</sub>O</b>	Campione di sfere di silice mesoporosa trattate con acqua
<b>SSA<sub>BET</sub></b>	Area superficiale specifica calcolata secondo il modello BET
<b>TEA</b>	Trietanolammina
<b>TEG</b>	Tromboelastrogramma
<b>TEM</b>	Microscopia elettronica a trasmissione
<b>TEOS</b>	Ortosilicato tetraetile; tetraetil ortosilicato
<b>TF</b>	Fattore tissutale
<b>TMOS</b>	Tetrametil ortosilicato
<b>TSD</b>	N-[3-(trimetossisilil)propil]etilendiammina
<b>TX A2</b>	Trombossano A2
<b>V<sub>P</sub></b>	Volume poroso
<b>VWF</b>	Fattore di Von Willebrand
<b>XRD</b>	Diffrattometria a raggi X
<b>XPS</b>	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Ione zinco
<b>Zn5%@SSM</b>	Campione di sfere di silice mesoporosa funzionalizzate con una quantità nominale di ioni zinco pari al 5% in massa
<b>Zn10%@SSM</b>	Campione di sfere di silice mesoporosa funzionalizzate con una quantità nominale di ioni zinco pari al 10% in massa
<b>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · xH<sub>2</sub>O</b>	Nitrato di zinco idrato

## Introduzione

Da sempre, il sanguinamento copioso e incontrollato, dovuto a ferite o traumi, rappresenta una delle principali cause di morte dei pazienti coinvolti. In particolare, quest'ultimo rappresenta la principale causa di morte in più del 50% dei casi relativi a persone rimaste ferite sul campo di battaglia, e nel 15-25% degli incidenti in ambito civile. Inoltre, è stato dimostrato anche che un'abbondante perdita di sangue aumenta il rischio di contrarre infezioni, che impattano sui costi delle relative cure, aumenta il rischio di insufficienza multi-organo e, più in generale, complica la gestione del paziente e il suo processo di guarigione [1,2]. Altre possibili complicazioni possono essere: shock emorragici, ipotermia e acidosi metabolica, la compromissione del sistema di coagulazione del paziente, ipossia al cervello o in altre parti del corpo e aumento della probabilità di rigetto in caso di trasfusione. Anche nel caso di operazioni cardiovascolari, epatiche, ortopediche o spinali, le emorragie rappresentano la principale causa di decesso [3].

Per questi motivi è fondamentale gestire le emorragie nel modo più efficace e veloce possibile, e la richiesta di nuovi materiali con proprietà emostatiche è sempre elevata. Tuttavia, non è un problema di facile risoluzione, in quanto un materiale emostatico ideale non deve solo favorire una emostasi veloce ed efficace, ma anche essere sicuro, di facile utilizzo, conservazione e produzione su larga scala, economico, con proprietà antibatteriche e capace di essere certificato dal punto di vista normativo [3]. Inoltre, è fondamentale che sia biocompatibile e biodegradabile [2].

Al momento, la maggior parte dei materiali emostatici esistenti non soddisfa tutte le proprietà precedentemente citate, motivo per cui è stata notevolmente incentivata la ricerca in questo settore e sono stati scoperti molti nuovi materiali emostatici promettenti [3].

Di recente, materiali come le silici o i vetri bioattivi mesoporosi hanno riscontrato un grande interesse nel campo delle applicazioni emostatiche, grazie al loro elevato grado di porosità. In particolare, le silici mesoporose hanno dimostrato di essere molto valide nel favorire una serie di processi che portano ad una buona attività emostatica in tempi brevi. Infatti, oltre alla loro elevata porosità, la presenza di gruppi silanoli e cariche negative sulla loro superficie favorisce l'attivazione del fattore XII durante la coagulazione, noto per la sua funzione di favorire e velocizzare il processo di emostasi [1-3]. Inoltre, questi materiali non presentano gli effetti collaterali indesiderati di altri materiali inorganici che possiedono struttura simile, come gli emostatici a base di argilla o le zeoliti [2]. Questi ultimi, ad esempio, sono scarsamente biodegradabili e il processo emostatico che innescano è fortemente esotermico, e l'aumento di temperatura può causare ulteriori lesioni [1].

Per questo motivo, è stato intrapreso uno studio riguardo l'attività emostatica delle silici mesoporose. In primo luogo, si è partiti dalla sintesi di una polvere di silice caratterizzata da particelle sferiche ed una dimensione dei pori abbastanza grande ( $\approx 25$  nm). È stato scelto questo materiale in quanto questa silice è stata precedentemente studiata per questa applicazione e ha dimostrato una buona attività emostatica [1].

In seguito, al fine di implementarne l'attività antibatterica, si è deciso di procedere con un processo di funzionalizzazione con ioni zinco, dato che non sempre è sufficiente, in ambito biomedico, fornire materiali esclusivamente emostatici. Anzi, è spesso preferibile che i materiali emostatici siano dotati di molteplici proprietà simultaneamente, tra cui quelle antibatteriche [2]. A questo scopo, si è deciso di seguire la procedura descritta nel lavoro di

*Trinh et al.* [4]. Sono stati funzionalizzati due campioni di silice mesoporosa con diverse percentuali in massa di ioni zinco (5% e 10 % m/m).

L'ultimo passaggio è stato quello di analizzarne e confrontarne le rispettive proprietà, avvalendosi sia di caratterizzazioni volte allo studio della loro morfologia, composizione atomica, superficie specifica e volume poroso, sia di test emostatici ed antibatterici, ideali per ottenere un riscontro pratico delle relative caratteristiche.

Per cui, la seguente tesi si dividerà nei seguenti capitoli:

- Capitolo 1, silici mesoporose come agenti emostatici, durante il quale verranno descritti, dopo una breve introduzione, il processo di coagulazione in tutte le sue fasi, le caratteristiche e le proprietà delle silici mesoporose, soffermandosi anche sui relativi metodi di sintesi e applicazioni biomediche in campo emostatico;
- Capitolo 2, attività batterica degli ioni zinco, nel quale verrà descritta la proprietà antibatterica tipica degli ioni zinco, soffermandosi sui meccanismi e gli utilizzi possibili in ambito biomedico ed emostatico in particolare;
- Capitolo 3, materiali e metodi, durante il quale verranno descritti i materiali usati durante l'attività sperimentarle e tutti i procedimenti effettuati, ossia la sintesi delle particelle di silice, il successivo processo di funzionalizzazione con ioni zinco, tutte le conseguenti analisi e caratterizzazioni strumentali e la procedura eseguita per i test emostatici;
- Capitolo 4, risultati, nel quale verranno illustrati, esposti e discussi tutti i risultati derivanti dai test e dalle varie caratterizzazioni effettuate, raggruppate per ciascun campione;
- Capitolo 5, conclusioni e sviluppi futuri, nel quale verranno raccolte e formulate le informazioni ottenute da questa esperienza, basandosi sulle ricerche effettuate e i risultati ottenuti, con una particolare attenzione allo sviluppo di futuri studi e approfondimenti che potrebbero fornire nuove informazioni interessanti in questo ambito.

# 1. Silici mesoporose come agenti emostatici

Questo capitolo si concentra sulla descrizione del processo della coagulazione in tutte le sue fasi e peculiarità, per poi proseguire sulla descrizione delle silici mesoporose e le loro principali proprietà, caratteristiche, metodi di sintesi e, infine, applicazioni in campo emostatico.

## 1.1 Coagulazione

Per coagulazione, o emostasi, si intende quel complesso processo fisiologico che porta alla formazione di un coagulo, stabile e insolubile, volto ad interrompere la fuoriuscita di sangue in seguito alla formazione di una ferita [2,3]. Esso coinvolge numerosi componenti, come piastrine, cellule, proteine presenti nel plasma e altri fattori, che agiscono in modo coordinato e accuratamente regolato durante il fenomeno, ma rimanendo quiescenti in condizioni normali. Infatti, nei tessuti epiteliali sani, vengono secreti monossido di azoto, trombomodulina, prostaciclina e molecole simili all'eparina. Esse hanno la funzione di impedire sia la coagulazione del sangue all'interno dei vasi sanguigni, sia l'eventuale adsorbimento, attraverso le pareti di questi ultimi, delle proteine che entrano in gioco durante il processo di emostasi [3].

Solo dopo il danneggiamento di un tessuto, viene attivato il processo di coagulazione, il quale comprende due fasi distinte: emostasi primaria, durante la quale si forma un tappo dovuto all'aggregazione delle piastrine, e secondaria, caratterizzata dall'insieme di tutti quei processi biologici che definiscono la cascata di coagulazione [3].

### 1.1.1 Emostasi primaria

L'emostasi primaria parte dal momento in cui avviene una lesione di un vaso sanguigno [2].

Non appena il tessuto endoteliale viene localmente danneggiato, viene indotta una contrazione della muscolatura liscia intorno alla zona interessata. Questo primo fenomeno viene chiamato vasocostrizione, ed è finalizzato a ridurre le perdite di sangue tramite la riduzione del flusso sanguigno in corrispondenza della ferita [3]. Successivamente, le piastrine vengono indotte dal collagene, entrato a contatto col sangue a seguito della lesione di un vaso sanguigno, a legarsi ad esso e al fattore di Von Willebrand (VWF) [2], ossia una grande glicoproteina adesiva presente nella matrice extracellulare delle cellule endoteliali, prodotta da queste ultime e dai megacariociti [5]. Questa interazione avviene tramite la presenza della glicoproteina Ib (GP Ib) sulla superficie delle piastrine, che funge da recettore [2].

Questo processo attiva delle piastrine, le quali cambiano forma, riarrangiano il loro citoscheletro e rilasciano granuli contenenti serotonina, trombossano A<sub>2</sub> (TX A<sub>2</sub>) e adenosin difosfato (ADP), che non solo amplificano l'azione locale di vasocostrizione, ma cambiano anche la conformazione dei recettori piastrinici GPIIb/IIIa. Essi favoriscono l'interazione col fibrinogeno e la successiva aggregazione delle piastrine, formando un tappo che impedisce l'ulteriore fuoriuscita di sangue [2].

### 1.1.2 Emostasi secondaria

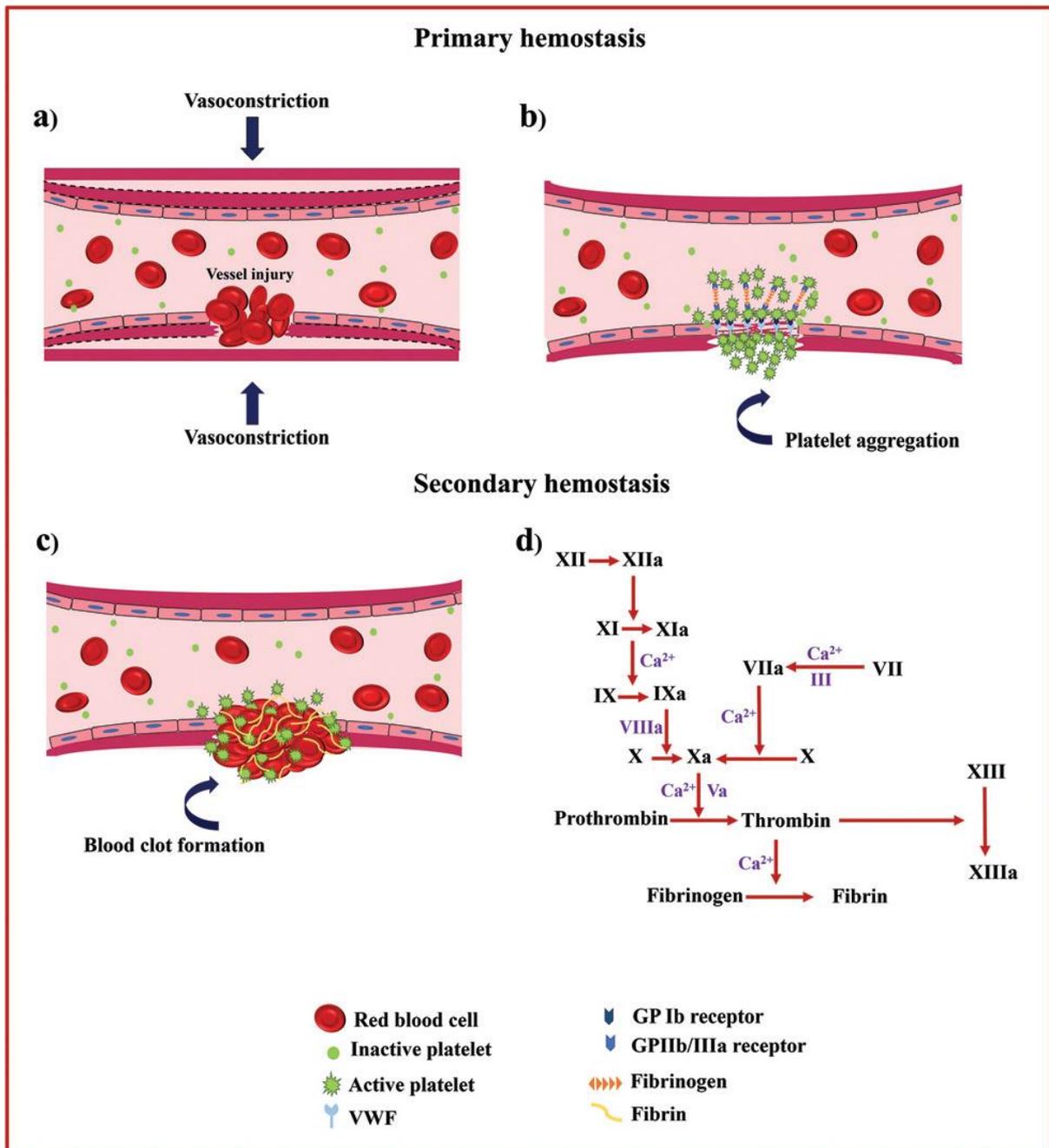
L'emostasi secondaria, invece, si riferisce alla successiva cascata di coagulazione, finalizzata a creare una rete insolubile di fibrina, che stabilizza e rafforza il tappo formato piastrinico formatosi in precedenza [2]. L'attivazione della cascata di coagulazione inizia tramite due

percorsi principali, intrinseco ed estrinseco, che successivamente convergono in un unico percorso comune [3].

La via intrinseca indica i processi che avvengono tra l'attivazione del fattore XII e l'attivazione del fattore X ed è caratterizzata dal fatto che tutti i componenti coinvolti si trovano nel sangue [3]. In corrispondenza di una ferita, il fattore XII viene a contatto con la superficie esogena del vaso sanguigno, causando la sua attivazione e successiva conversione in fattore XIIa [2,3]. La presenza di fattore attivato XIIa causa la successiva trasformazione del fattore XI, ad attivarsi a sua volta, convertendosi in fattore XIa. La trasformazione del fattore XII non dipende dalla presenza di ioni calcio, a differenza della seconda. Di conseguenza, gli ioni calcio favoriscono l'ulteriore attivazione del fattore XI in XIa. Quest'ultimo si lega con il fattore VIIIa secondo un rapporto 1:1, formando un complesso, il quale comporta l'attivazione del fattore X, diventando Xa [3].

Nella via estrinseca, invece, i fattori coinvolti non provengono tutti dal sangue. Infatti, il processo è attivato dal fattore tissutale (TF), non presente nel sangue, ma rilasciato nei vasi sanguigni in caso di danneggiamento o rottura delle loro pareti. In presenza di ioni calcio  $Ca^{2+}$ , questo fattore interagisce col fattore VII formando un altro complesso, combinandosi seguendo un rapporto 1:1. Successivamente viene attivato il fattore VII in VIIa, formando un nuovo complesso tissutale-fattore VIIa, il quale incentiva la rapida attivazione del fattore X in Xa, sempre in presenza di ioni calcio [3].

A questo punto, le due vie di coagulazione, intrinseca ed estrinseca, convergono in un unico percorso, chiamato via comune, che inizia nel momento in cui il fattore X viene attivato e termina con la conversione di fibrinogeno in fibrina. In questa fase, il fattore Xa interagisce con il fattore Va attivato, in presenza di ioni calcio. Si forma il complesso protrombinasi, o tromboplastina, responsabile della conversione della protrombrina in trombina. Questo complesso è una serina proteasi che ha la funzione di idrolizzare il fibrinogeno, idrosolubile, trasformandolo in fibrina, insolubile in acqua. Inoltre, il complesso protrombinasi catalizza anche altre reazioni durante la cascata di coagulazione, ed è responsabile dell'attivazione del fattore XIII in XIIIa. Quest'ultimo, in un ambiente ricco di ioni calcio, stabilizza i monomeri di fibrina e ne incentiva una rapida reticolazione. Si forma una rete filamentosa che aderisce al tappo piastrinico formatosi in precedenza, rendendolo più stabile e resistente, andando a formare dei veri e propri coaguli di sangue [2,3]. Il processo appena descritto è schematizzato nella figura 1.1, nella pagina seguente.



**Figura 1.1:** Schema illustrativo delle varie fasi della coagulazione, vasocostrizione (a), aggregazione delle piastrine (b), formazione del tappo in corrispondenza della lesione (c) e uno schema riassuntivo delle interazioni durante la cascata di coagulazione (d) [2].

## 1.2 Le silici mesoporose (SM): generalità

Per silici mesoporose si intendono tutti quei materiali porosi a base di diossido di silicio ( $\text{SiO}_2$ ) che presentano una dimensione dei pori compresa tra i 2 nm e i 50 nm, secondo la classificazione IUPAC [2,6].

Negli ultimi decenni, le silici mesoporose hanno destato sempre maggiore interesse a livello scientifico grazie alle loro peculiari proprietà, quali ottima biocompatibilità, scarsa citotossicità, elevata area superficiale specifica e volume poroso [2], una struttura rigida e amorfa, ed elevata stabilità chimica e termica. Inoltre, questi materiali sono semplici ed economici da produrre, ed è possibile modificare, anche significativamente, le loro proprietà, intervenendo sui parametri del processo [3,7]. Infine, è possibile funzionalizzare le due superfici, esterna e interna, singolarmente e separatamente [6].

In ambito emostatico, le silici mesoporose presentano diversi vantaggi. Innanzitutto, i gruppi ossidrilici, presenti sulla loro superficie, possono formare legami idrogeno con l'acqua contenuta nel sangue, agevolando un maggiore contatto tra le silici e il sangue. Inoltre, l'elevata porosità di questi materiali favorisce l'adsorbimento dell'acqua presente nel sangue, ciò facilita la concentrazione degli emocomponenti, incentivando e accelerando la coagulazione. Infine, la presenza di cariche negative superficiali stimola l'attivazione del fattore XII durante la coagulazione secondaria [3].

In seguito, verranno illustrate le diverse particelle di silice mesoporosa finora studiate e i relativi processi di sintesi.

### 1.1.2 Tipologie di particelle di silice mesoporosa

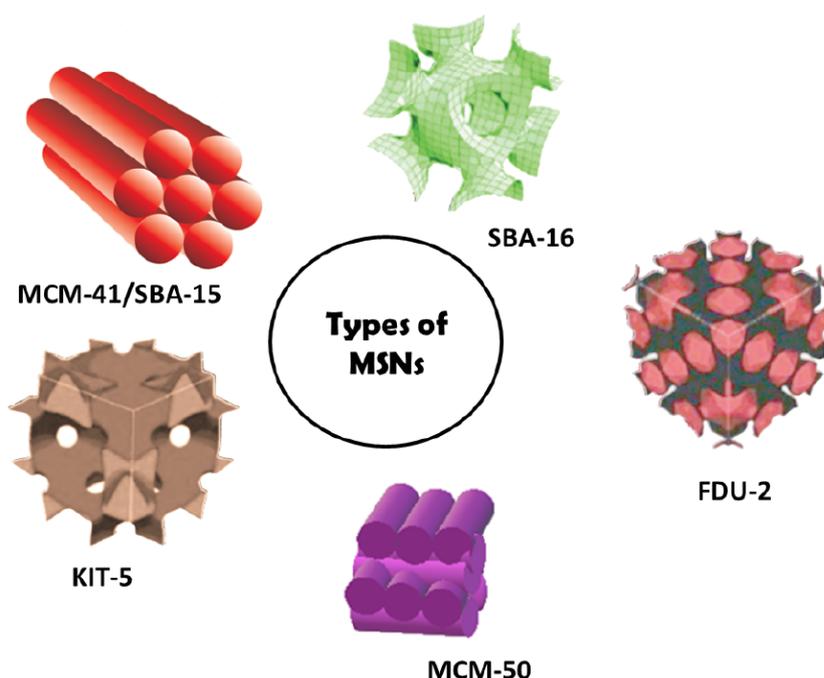
Tra le silici mesoporose, a partire dai primi anni '90 hanno attirato l'attenzione della comunità scientifica le silici preparate mediante l'uso di tensioattivi, allo scopo di ottenere una porosità ordinata e controllata. Tra i primi esempi, emersero in particolare i materiali designati con la sigla M41S, ottenuti dai ricercatori della Mobil Oil Company. Esistono tre tipi di M41S, denominate MCM-50, MCM-48 ed MCM-41 [7] (dove la sigla MCM è l'acronimo di *Mobil Crystalline Materials*, oppure *Mobil Composition of Matter*). Quest'ultima fu la silice a mesoporosità controllata più studiata, e fu sintetizzata, nel 1992, dalla Mobil Research and Development Corporation, partendo da gel di silicati, e utilizzando un composto a base di cristalli liquidi come agente templante (traduzione di *templating agent*, ossia il responsabile della formazione della porosità del materiale finale) [6].

Avendo scoperto sin dal principio che fosse molto semplice poter regolare i parametri strutturali delle silici durante il processo sintesi, sono stati sintetizzati vari tipi di particelle, ognuna con un nome diverso a seconda del produttore o delle caratteristiche delle particelle finali [6,7]. Ad esempio, le MCM-41 presentano una morfologia con sezione esagonale e una dimensione dei pori variabile tra 2,5 e 6 nm, mentre le particelle MCM-48 presentano una struttura cubica e le MCM-50 una struttura simil-lamellare [6].

Cambiando il templante usato, come ad esempio copolimeri tri-blocco non ionici quali tensioattivi oligomerici, a base di alchil poli(ossido di etilene) o poli(ossido di alchilene), sono state ottenute nuove strutture di particelle di silice. Alcuni esempi sono le particelle SBA-11, con struttura cubica, SBA-12, con struttura esagonale tridimensionale, SBA-15, con struttura esagonale semplice, ed SBA-16, con una struttura a gabbia cubica. Esse sono state sintetizzate per la prima volta dall'Università di Santa Barbara, in California, dalla quale deriva il loro acronimo SBA (*Santa Barbara Amorphus*), e possiedono una dimensione dei pori maggiore

(compresa tra i 4,6 e i 30 nm) e delle pareti di silice più spesse, rispetto alle particelle di silice MCM [6].

Sono stati proposti anche ulteriori tipi di particelle di silice a mesoporosità controllata sintetizzate da altri enti, come la Technical Deft University (DFU-1), Hiroshima Meseoporus Material-33 (HMM-33), Centre for Research Chemistry and Catalysis (COK-12), Furdan University Material (FDU), Korean Advanced Institute of Science and Technology (KIT) e tante altre, ognuna con diversa forma delle particelle e diversa dimensione dei pori, o con caratteristiche peculiari [6,7]. Alcuni di questi materiali sono stati ottenuti sotto forma di nanoparticelle (mesoporous silica nanoparticles, MSN). Nella figura 1.2 e nella tabella 1.1, vengono illustrate le principali tipologie di nanoparticelle di silice mesoporosa, e le loro principali proprietà [6].



**Figura 1.2:** Esempi di struttura di nanoparticelle di silice a mesoporosità controllata (MSN) [6].

**Tabella 1.1:** Elenco delle principali caratteristiche e proprietà delle MSN più conosciute [6].

MSN Family	MSN Type	Pore Symmetry	Pore Size (nm)	Pore Volume (cm <sup>3</sup> /g)
M41S	MCM-41	2D hexagonal $P6mm$	1.5–8	>1.0
	MCM-48	3D cubic $Ia3d$	2–5	>1.0
	MCM-50	Lamellar $p2$	2–5	>1.0
SBA	SBA-11	3D cubic $Pm3m$	2.1–3.6	0.68
	SBA-12	3D hexagonal $P6_3/mmc$	3.1	0.83
	SBA-15	2D hexagonal $p6mm$	6–0	1.17
	SBA-16	Cubic $Im3m$	5–15	0.91
KIT	KIT-5	Cubic $Fm3m$	9.3	0.45
COK	COK-12	Hexagonal $P6m$	5.8	0.45

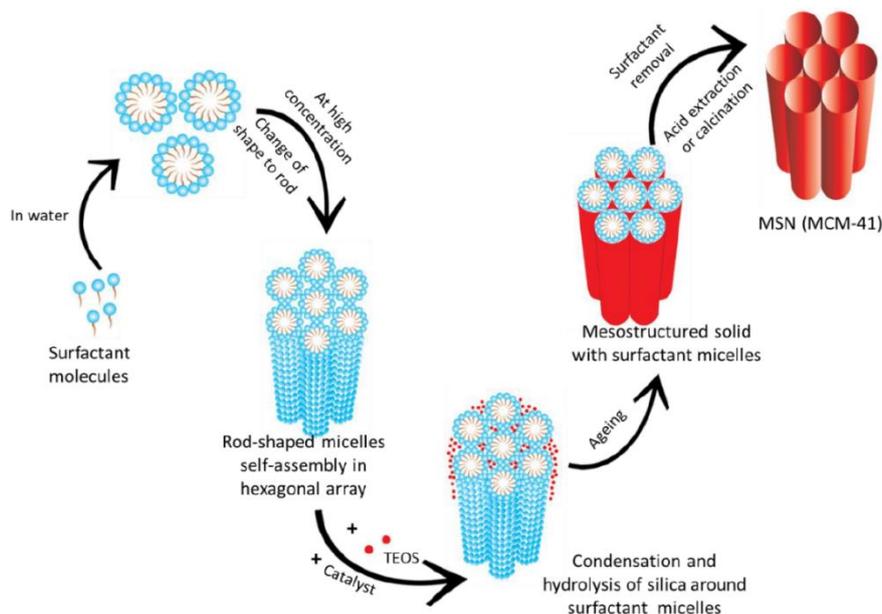
### 1.2.2 Processi di sintesi

Nei processi di sintesi delle silici mesoporose vengono spesso utilizzati tre componenti principali: un precursore della silice, che andrà a formare le pareti del materiale, un agente templante, solitamente un tensioattivo, utile a creare le porosità, e un acido, o una base, che favorisce il processo. Esistono anche altri fattori che entrano in gioco, come il solvente, la temperatura, la presenza di agitazione meccanica e la sua intensità, o eventuali additivi o substrati. Anche su questi è possibile intervenire, nel caso in cui si vogliano modificare le proprietà o le caratteristiche finali delle particelle sintetizzate [7].

Tuttavia, prima di trattare nel dettaglio la descrizione dei vari metodi di sintesi proposti in letteratura, è opportuno focalizzarsi sui meccanismi responsabili della loro formazione.

I primi studi lasciarono intendere che la struttura porosa delle silici si formasse a partire dai tensioattivi non ionici mentre si trovavano nella forma di cristalli liquidi. Questa ipotesi può spiegare bene i processi di sintesi di materiali che partono da una soluzione molto diluita di tensioattivo, in quanto non è stata osservata alcuna traccia di una struttura mesoporosa in questi casi. Successivamente, altri studi in letteratura hanno evidenziato che la struttura delle particelle di silice si può formare in due modi: o la silice subisce una reazione di idrolisi e successivamente viene adsorbita dalle micelle di tensioattivo, oppure attraverso la formazione di un complesso silice-tensioattivo con una struttura core-shell [6].

Le nanoparticelle di silice MCM-41 sono un esempio del primo caso. Il loro meccanismo di formazione è stato studiato, in funzione del tempo, utilizzando la tecnica di *small angle neutron scattering* (SANS). Durante la prima fase di idrolisi del precursore della silice (generalmente un alcossilano, TEOS o TMOS), gli ioni silicato si adsorbono ai lati delle micelle di tensioattivo che si stanno formando e accrescendo. Con l'avanzare del processo, diminuisce la carica superficiale presente sulle molecole di tensioattivo, a causa della progressiva conversione del precursore. Ciò incentiva l'ulteriore formazione di piccoli aggregati di silice. Dopo circa 400 secondi, sono state osservate strutture di silice mesoporosa di forma esagonale, con pori ben chiari e distinti, grazie all'utilizzo della microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Il processo è illustrato nella figura 1.3.

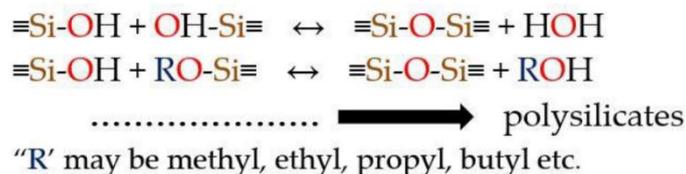


**Figura 1.3:** Schema illustrativo del meccanismo responsabile della formazione delle MCM-41 [6].

L'altro meccanismo possibile viene chiamato “*swelling-shrinking mechanism*”. Quest'ultimo è stato osservato e studiato mediante l'utilizzo della tecnica di *small angle X-ray scattering* (SAXS), sempre in funzione del tempo. Questa modalità è molto frequente nel caso delle sintesi che prevedono l'utilizzo di tetraetil ortosilicato (TEOS) come precursore e in assenza di altri solventi, come l'etanolo. Ciò è possibile perché il TEOS, in ambiente acquoso, tende a formare un'emulsione se sottoposto ad una vigorosa agitazione meccanica. Inizialmente, il bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB), usato come agente templante, forma micelle di forma ellissoidale, il cui interno contiene le code idrofobe. Quando viene aggiunto il TEOS, essendo apolare, si discioglie nelle code del CTAB e rigonfia le micelle, che diventano di forma sferica. Durante il processo di idrolisi, i monomeri del TEOS diventano idrosolubili e vengono man mano rilasciati nella soluzione acquosa, causando il restringimento delle micelle. Questi ultimi, carichi negativamente, vengono adsorbiti sulla superficie delle micelle di CTAB cariche positivamente, per attrazione elettrostatica. Questi processi avvengono simultaneamente fino a completa idrolisi del TEOS presente in soluzione, il che comporta il continuo svuotamento e rimpicciolimento delle micelle di CTAB. Di conseguenza, i monomeri idrolizzati del TEOS vanno a ricoprire le micelle, andando a formare un rivestimento a base di silice. Infine, le micelle vicine si aggregano, comportando la crescita e la formazione delle particelle di silice con struttura mesoporosa, i cui pori derivano dalle micelle del tensioattivo [6].

Ritornando ai metodi di sintesi della silice, i principali si possono generalmente dividere in tre macrocategorie: metodo Stöber (o sintesi sol-gel), metodi idrotermali e metodi green, più recenti [7]. Il primo metodo proposto per la sintesi di microparticelle di silice mesoporosa è stato ispirato dal metodo Stöber, dal nome del suo ideatore, noto comunemente anche come sintesi sol-gel. È tuttora il metodo più utilizzato e studiato [6]. Esso comprende quattro componenti principali: acqua, una base, alcol etilico e un precursore della silice [7].

I processi sol-gel sono generalmente molto diffusi nell'ambito delle sintesi di materiali inorganici. Nel caso specifico delle silici, viene formata una soluzione colloidale (sol) nella quale vengono idrolizzati, in presenza di catalizzatori, e poi condensati, dei monomeri alcossidi, derivanti dal precursore. Questi ultimi formano una struttura reticolare ordinata (gel) di particelle distinte. L'inizio del processo di idrolisi dei gruppi alcossidi dipende dal rapporto SiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O presente in soluzione, ed è velocizzato nel caso di ambiente acido. Lo sviluppo della fase di condensazione, a sua volta, dipende dalle modalità con cui è avvenuta l'idrolisi precedente. Se avvengono più processi di condensazione consecutivi, seguendo le reazioni di formazione illustrate nella figura 1.4, si ottengono una struttura a catena nel sol e una conseguenza struttura reticolare nel gel [6].



**Figura 1.4:** Rappresentazione delle reazioni di formazione multiple che comportano la formazione di un reticolo polimerico nei processi sol-gel di sintesi delle silici [6].

Essendo il metodo più conosciuto, è anche quello di cui sono state proposte più variazioni ed eventuali migliorie. I primi a proporre una variazione del metodo Stöber sono stati *Grün et al.* [8]. In questo lavoro, hanno proposto l'utilizzo di un agente templante cationico al fine di ridurre la taglia delle particelle di silice finali, fino a dimensioni nanometriche, ed ottenere particelle MCM-41 di forma sferica anziché esagonale. Il processo sol-gel della sintesi di particelle di silice mesoporese descritto nel lavoro di Grün, si può descrivere come segue.

L'agente templante viene miscelato con una base in ambiente acquoso. Successivamente, viene aggiunto anche il composto usato come precursore della silice, e sottoposto il tutto a miscelazione e a forte agitazione meccanica. Durante questa fase avvengono i processi di idrolisi e condensazione, con conseguente formazione del sol. In seguito, il tutto viene sottoposto ad un trattamento di invecchiamento, durante il quale si va a formare il gel. Infine, una volta create le particelle di silice, si procede con la rimozione del templante, tramite un processo di calcinazione o l'utilizzo di un solvente acido [7].

Successivamente, *Mann et al.* [9,10] hanno proposto l'inserimento una fase di "spegnimento" nell'iter del processo, in modo da ottenere particelle di silice di piccole dimensioni. Il tutto è stato possibile neutralizzando gradualmente il pH della soluzione. È stato aggiunto un eccesso di acqua dopo 40 secondi dall' inizio del processo, e acido cloridrico (HCl) in un secondo momento, aspettando un ulteriore intervallo di tempo dopo l'aggiunta di acqua, di durata compresa tra i 60 e i 220 secondi. Il resto del procedimento viene mantenuto invariato. Grazie a queste fasi di "spegnimento" del processo, è possibile osservare più facilmente, tramite spettroscopia elettronica a trasmissione ad alta risoluzione, la formazione delle particelle di silice e tutte le sue eventuali variazioni strutturali, dagli inizi alle fasi intermedie e finali della sintesi. In questo studio, è stata osservata una minor percentuale di particelle di silice che ha subito aggregazione, mentre il pH neutro ha ostacolato il processo di condensazione. È stato inoltre osservato che, maggiore è l'intervallo di tempo atteso prima di inserire l'acido cloridrico nel sistema, maggiore è la dimensione finale delle particelle.

Altri ricercatori, invece, hanno provato a testare i processi di sintesi sol-gel cambiando i composti di partenza o i catalizzatori utilizzati.

*Hwang et al.* [11] hanno studiato un processo di sintesi partendo da silicato di sodio, usato come precursore, e polietilenglicole con peso molecolare di 3000 g/mol (PEG) come agente templante, eseguito in un ambiente a pH neutro e in presenza di acido acetico. Così facendo hanno ottenuto delle particelle di silice mesoporosa sferiche, con dimensioni nell'ordine delle centinaia di nanometri e con notevole area superficiale (685 m<sup>2</sup>/g). Inoltre, le silici sinterizzate presentano una dimensione dei pori variabile tra 3 e 40 nm, parametro facilmente regolabile in questo processo di sintesi andando ad agire sulla temperatura. Questo processo può gettare le basi per lo studio di nuovi processi sol-gel facilmente personalizzabili, che prevedono l'utilizzo di un precursore della silice più economico.

Durante un'altra attività sperimentale, svolta da *Lv et al.* [12], è stato utilizzato il tetraetil ortosilicato (TEOS) come precursore, cloruro di cetilmetilammonio (CTAC) come templante e trietanolammina (TEA) come catalizzatore, in ambiente basico. Il fine ultimo dello studio è quello di verificare ed analizzare l'influenza di parametri di processo, come la velocità di agitazione, la temperatura o la concentrazione di trietanolammina sulla dimensione finale delle particelle di silice ottenute. La reazione è stata di durata relativamente breve (circa due ore) e sono state sintetizzate, nei vari tentativi, delle nanoparticelle di silice di dimensione compresa tra i 20 e i 110 nm soltanto intervenendo sui parametri di processo precedentemente citati. In particolare, è stato notato che una minore temperatura di processo e un maggiore velocità di agitazione della soluzione comportano una dimensione media delle particelle inferiore. Questo è stato spiegato ipotizzando che la dimensione delle particelle, derivanti dall'aggregazione e successiva condensazione delle micelle di tensioattivo, sia strettamente correlata alla concentrazione di micelle formatesi durante il processo. Invece, per quanto riguarda la TEA, si è supposto che potesse impedire l'agglomerazione e la crescita delle particelle di silice.

*Zhou et al.* [13] sono riusciti a sintetizzare, tramite un processo sol-gel, particelle di silice mesoporosa con una mesostruttura ordinata e pori di forma esagonale. Si è partiti da bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB), usato come agente templante, e fumo di silice, usato come

precursore, in presenza di acetato di etile che funge da catalizzatore. In questo processo, di durata molto breve (90 minuti), è stato possibile modificare i parametri morfologici della silice soltanto variando la concentrazione di acetato di etile presente in soluzione, passando da nanoparticelle di silice di forma allungata “*simili a vermi*” a particelle sferiche “*simili a popcorn*”. È stato anche proposto come metodo di sintesi ideale da applicare su larga scala, grazie alla sua semplicità, celerità e grande versatilità. Inoltre, è stato anche osservato che la concentrazione di acido acetico possa influenzare il grado di ordine della struttura mesoporosa, essendo risultata meno ordinata in campioni preparati utilizzando una maggiore quantità di tale acido. Ciò è stato confermato anche dai risultati delle analisi XRD, che nella caratterizzazione del campione sintetizzato con minor contenuto di acido acetico, hanno mostrato un picco al valore di  $2\theta$  pari a 2,2. Questo valore indica una disposizione piana delle pareti, seguendo gli indici di Miller (100), il che comporta una struttura porosa molto ordinata.

Il metodo idrotermale è molto simile al processo sol-gel, ma differisce dal fatto che il processo di invecchiamento non è sempre presente nella procedura. Infatti, in alcuni casi, è possibile sostituire questo passaggio tramite un'ulteriore agitazione della soluzione creata, per poi sottoporla ad un trattamento in temperatura mediante l'uso di un'autoclave rivestita in teflon, a temperatura fissata, per un certo periodo di tempo. I vantaggi di questo processo sono una maggiore stabilità idrotermale ed una maggiore omogeneità e grandezza dei pori presenti nelle particelle sintetizzate. Tuttavia, sono richieste attrezzature specifiche, temperature elevate e tempi abbastanza lunghi, il che comporta costi considerevoli. Per questo motivo, solitamente viene preferito il metodo di sintesi sol-gel, motivo per cui è stato anche maggiormente studiato [7].

*Song et al.* [14] hanno studiato la funzionalizzazione di particelle di silice con ammina per applicazioni catalitiche. A questo scopo, è stato sperimentato un metodo di sintesi one-pot, proponendo un processo di sintesi Stöber modificato dall'aggiunta di un trattamento idrotermale dopo la fase di idrolisi. Si è partiti da TEOS e N-[3-(trimetossisilil)propil]etilendiammina (TSD), usati come precursori, e CTAB come agente templante. Inoltre, sono stati usati ammoniaca come catalizzatore ed etanolo come regolatore della reazione di idrolisi. La procedura della sintesi si basa sul metodo Stöber modificato, aggiungendo un trattamento idrotermale di 12 ore a 100°C dopo la reazione di idrolisi, ottenendo delle particelle di forma sferica con diametro medio di circa 230 nm, una superficie specifica intorno ai 133 m<sup>2</sup>/g e una struttura porosa ordinata. È stato poi verificato che la struttura porosa dipende dalla presenza della TSD. Infatti, ripetendo la sintesi partendo solo da TEOS, si ottengono particelle con un diametro medio di circa 180 nm, ma una struttura porosa completamente diversa dalla precedente, unica nel suo genere. Inoltre, sono state sintetizzate e osservate anche particelle che subivano un processo di sintesi con un trattamento idrotermale di diversa durata. È stato osservato che, dopo un trattamento idrotermale di durata compresa tra le 6 e le 12 ore, le particelle presentano una struttura mesoporosa ordinata. Se il trattamento dura circa 24 ore, le particelle tendono ad assumere una struttura cava, e se dura oltre 48 ore, anche la struttura cava si perde completamente, generando nanoparticelle molto piccole e con una struttura porosa disordinata.

In un'altra ricerca, di *Lv et al.* [15], per la sintesi di nanoparticelle di silice con struttura fibrosa (note come KCC-1), anche in questo caso per applicazioni catalitiche, è stato proposto un processo idrotermale migliorato, passando per la formazione di una microemulsione. Anche in questo caso si è partiti sempre da CTAB e TEOS, ma in presenza di cicloesano e urea. Dopo aver formato la microemulsione, grazie ad una vigorosa agitazione meccanica durata 30 minuti. Successivamente è stato applicato un trattamento idrotermale per 4 ore ad una velocità di riscaldamento di 2,5 °C/min, fino al raggiungimento dei 120 °C, in un'autoclave girevole rivestita da teflon, impostata alla velocità di 60 rpm. Infine, le particelle ottenute sono state

raffreddate, separate dal resto della soluzione tramite centrifugazione, lavate e filtrate per 6 volte con acqua deionizzata ed etanolo ed infine essiccate a 100 °C per una notte e calcinate a 550 °C per 4 ore alla velocità di riscaldamento di 1°C/min. Le nanoparticelle di silice ottenuta hanno mostrato una forma sferica e una struttura fibrosa ordinata, con pori orientati secondo una simmetria radiale.

In un altro esperimento, di *Ferreira Soares et al.* [16], volto a sintetizzare particelle di silice mesoporosa per applicazioni antimicotiche, si è partiti da Pluronic F-127 come agente templante e TEOS come precursore, in ambiente acido mediante l'utilizzo di acido cloridrico. Alla soluzione ottenuta è stato applicato un trattamento idrotermale di 30 ore a 50 °C. Poi la soluzione è stata tenuta in una stufa a 120 °C per 24 ore, filtrata, essiccata a 60 °C per altre 24 ore e infine calcinata alla velocità di 5° C/min fino al raggiungimento dei 580 gradi, per poi essere raffreddata alla velocità di 8°C/min. Le particelle di silice risultanti presentano caratteristiche molto simili a quelle delle particelle SBA-16, come ad esempio la forma cubica ed una struttura molto ordinata. Inoltre, è stato verificato che le particelle sintetizzate possiedono una dimensione delle particelle di circa  $284 \pm 21$  nm, ma una superficie specifica molto alta ( $1098 \pm 7,2$  m<sup>2</sup>/g) e pori molto fini, con diametro medio di  $9 \pm 1$  nm. Infine, dalle osservazioni tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM), è stata osservata una distanza tra i pori pressoché costante, pari a circa  $18,2 \pm 0,7$  nm.

Di recente, è stato testato un metodo alternativo, conosciuto come “metodo green” in quanto finalizzato proprio a ridurre al minimo l'impatto ambientale del processo di sintesi, recuperando ad esempio la silice da prodotti di scarto. Tuttavia, nonostante il nome, non tutti i processi di sintesi green hanno un impatto ambientale nullo. Infatti, alcuni steps, come l'estrazione del silicato di sodio dalla lolla di riso o dalla cenere, richiedono ambienti con pH estremi, oltre ad essere molto costosi [7].

*Abburi et al.* [17] hanno proposto un metodo di sintesi di nanoparticelle di silice mesoporosa utilizzando l'acido esafluorosilicico come precursore della silice, un prodotto di scarto tossico e corrosivo derivante dall'industria della produzione di fertilizzanti. Il procedimento si basa proprio sulla reazione di quest'ultimo con ammoniaca, in un ambiente dotato di agitatore meccanico, per favorire la miscelazione, e non prevede l'utilizzo di alcun agente templante. Quindi, gli unici parametri sui quali poter intervenire per modificare le caratteristiche delle particelle finali sono proprio la concentrazione di ammoniaca, la durata e l'intensità dell'agitazione. Nel caso particolare del processo di sintesi studiato in questa ricerca, si è deciso di indurre agitazione meccanica nella soluzione per tre ore a velocità sostenuta, per poi sottoporre il tutto a filtrazione e infine ad un processo di essiccazione a 150 °C per tre ore. È stato effettivamente possibile sintetizzare nanoparticelle di silice mesoporosa, con struttura ordinata e pori di forma esagonale, come confermato dalle analisi XRD. È stato inoltre verificato che pori avevano un diametro medio di 6,5 nm, e l'area superficiale specifica delle particelle era abbastanza elevata ( $> 300$  m<sup>2</sup>/g). Il filtrato derivante dalla sintesi è stato riutilizzato per produrre nanoparticelle di fluoruro di calcio, rendendo così il processo totalmente sostenibile.

*Mohamad et al.* [18], partendo dal fatto che ogni prodotto di scarto derivante dall'agricoltura possiede silicio, hanno studiato un processo green di sintesi di particelle di silice mesoporosa, usando la cenere polverizzata derivante dalla calcinazione delle bucce di banana come precursore della silice, e CTAB come agente templante. È stato stimato che da circa 3,2 kg di banane è possibile ricavare circa 428,3 g di cenere di buccia di banana, dalla quale è stato possibile sintetizzare circa 1,5 g di nanoparticelle di silice, corrispondenti allo 0,35% della massa della cenere di partenza. Le silici ottenute sono state caratterizzate e studiate per l'adsorbimento di metilarancio e fenolo, in diverse condizioni ambientali.

*Li et al.* [19] hanno condotto un altro studio sulla sintesi delle silici, partendo da TEOS come precursore e usando come templante un aminoacido eterociclico modificato. Le particelle ottenute presentavano una forma sferica, una dimensione compresa tra i 130 e i 270 nm, una superficie specifica compresa tra 239 e 678 m<sup>2</sup>/g, ma soprattutto una disposizione dei pori “*a wormhole*”. In particolare, minore era la dimensione dei pori, maggiore era la concentrazione di gruppi silanoli delle particelle e minore era l’angolo di contatto osservato durante le analisi di caratterizzazione. Inoltre, hanno dimostrato un’ottima biocompatibilità e una scarsa tossicità, e sono state studiate per l’applicazione del trasporto dei farmaci.

Infine, sono stati ideati studiati e sperimentati altri processi di sintesi alternativi, volti soprattutto a promuovere lo sviluppo di metodi più economici e, soprattutto, di minor durata. Infatti, sia i processi di sintesi sol-gel, sia quelli idrotermali, sono solitamente laboriosi, duraturi e a volte costosi, difficilmente applicabili per produzioni di silice mesoporosa su larga scala [6,7].

Ad esempio, *Ding e Su* [20] hanno proposto un nuovo metodo di sintesi sol-gel assistito dall’elettrochimica, in modo da poter produrre nanoparticelle di silice mesoporosa in modo semplice, economico e in grandi quantità. Il processo prevede la presenza di un substrato in acciaio inox, finalizzato alla produzione di idrossido per via elettrochimica all’interfaccia con la soluzione. La presenza di idrossido induce la formazione delle micelle, da parte del tensioattivo usato come agente templante, e simultaneamente catalizza la policondensazione dei composti precursori della silice. Sono state ottenute delle particelle con bassa variabilità dimensionale, dei pori di diametro medio di 2,4 nm ed elevata superficie specifica (1164 m<sup>2</sup>/g).

Infine, sono stati testati e studiati anche processi di sintesi assistiti da microonde [21,22] o tramite sintesi sonochimica [23,24], generando un fenomeno di cavitazione fotoacustica. In entrambi i casi, le ricerche e le attività sperimentali hanno confermato la validità di queste soluzioni alternative, consentendo di ottenere nanoparticelle con struttura ordinata e in tempi brevi.

### *1.3 Applicazioni delle particelle di silice mesoporosa come agenti emostatici*

Una delle principali applicazioni in ambito medico in cui sono state largamente studiate le silici mesoporose è quella del trasporto e rilascio di farmaci, essendosi rivelate molto versatili e particolarmente idonee [2,6,7]. Altre applicazioni nella quale sono state oggetto di ricerca le silici mesoporose sono la ricostruzione ossea [4], la rigenerazione di ferite [25,26] ed emostatiche, grazie alle loro grandi capacità adsorbenti e coagulanti [3].

Nel prosieguo di questo paragrafo, verranno descritti e trattati diversi lavori di studio riguardanti particelle di silice mesoporosa usate in applicazioni emostatiche. Tuttavia, per praticità, le attività di ricerca riguardanti silici funzionalizzate e non funzionalizzate verranno trattate separatamente.

#### *1.3.1 Attività emostatica di silici mesoporose*

Come già citato in precedenza, i processi di sintesi sono solitamente molto versatili e facilmente personalizzabili, consentendo di intervenire direttamente sulle caratteristiche morfologiche delle particelle risultanti [2]. Perciò, molti studi e attività sperimentali si sono concentrati sull’influenza che possono avere le caratteristiche morfologiche delle particelle di silice mesoporosa funzionalizzate, come la dimensione dei pori o delle particelle, sulla loro attività emostatica.

*Chen et al.* [27] hanno studiato l'influenza della dimensione dei pori e delle particelle delle silici sull'attività emostatica, al fine di verificare quale delle due proprietà fosse più influente. Durante questo studio, sono state sintetizzate particelle di silice utilizzando un agente templante organico, poi caratterizzate mediante spettroscopia elettronica a scansione (SEM), analisi di fisisorbimento di azoto, analisi FT-IR ed analisi XRD. Infine, sono stati valutati il tempo di trombina parziale attivata (APTT) e il tempo di coagulazione durante dei test emostatici effettuati su del plasma di coniglio. I risultati hanno mostrato che i tempi di coagulazione e di tromboplastina parziale attivata registrati erano molto influenzati dalla dimensione dei pori delle silici, riducendosi notevolmente passando da una dimensione di 5 nm a 15 nm. Al contrario, la variazione della taglia delle particelle, nell'intervallo compreso tra i 60 e i 220 nm, non ha influito significativamente sui tempi di coagulazione. Perciò, è stato ipotizzato che i processi di diffusione del fattore XII durante la coagulazione fossero maggiormente influenzati dalla dimensione dei pori, piuttosto che delle particelle, ipotizzando che pori grandi favoriscano una maggiore adesione delle macromolecole presenti nel sangue con le pareti interne delle particelle di silice. Questa ipotesi è stata confermata anche dai successivi risultati derivanti dal tromboelastogramma (TEG), dimostrando che le silici con una dimensione dei pori maggiore ai 10-15 nm, hanno mostrato anche la formazione di coaguli più resistenti, in tempi più brevi e soprattutto un minore eccesso di fattore XII non attivato con l'aumentare della dimensione dei pori. Tramite studi sulla vitalità cellulare, in particolare mediante un test CCK-8 e un'analisi sull'adsorbimento cellulare, le silici con pori più grandi hanno mostrato anche una maggiore biocompatibilità. Infine, l'efficienza emostatica dei campioni con pori di circa 15 nm di diametro è stata confermata da test *in vivo* della cura della lesione dell'arteria femorale del coniglio, confrontando silici studiate con la garza comune. I risultati hanno evidenziato una notevole riduzione del tasso di mortalità, passando dal tasso del 100% mostrato dalla garza comune, al 10,4% riscontrato dalle particelle in questione, dimostrando che le silici mesoporose possono rivelarsi un ottimo strumento per il primo soccorso delle ferite, o in generale in ambito pre-ospedaliero.

In uno studio simile, *Baker et al.* [28] hanno studiato la capacità emostatica di schiume di silice con diverse dimensioni dei pori (da 10 a 52,1 nm) e diverse aperture (da 5,9 a 33,1 nm). È stato studiato il processo di formazione del coagulo mediante le misure di un tromboelastogramma (TEG) eseguito su dei campioni di plasma umano congelato. Dopo osservazioni derivate dalla microscopia elettronica a scansione (SEM), si è osservato che la dimensione di 'apertura dei pori influisce sulla velocizzazione del processo di emostasi durante le prime fasi della coagulazione, soprattutto quando si supera una dimensione di 20 nm. Inoltre, per dimensioni dell'apertura dei pori intorno ai 33 nm, le molecole di trombina rimanevano incastrate al loro interno, e questo ha avuto un ulteriore effetto favorevole sul processo di emostasi e la sua rapidità.

Lo studio di *Hong et al.* [29], invece, si è concentrato sullo studio dell'influenza della dimensione delle particelle di silice mesoporosa, cercando di ovviare ai difetti dovuti a polveri troppo fini. Infatti, le polveri hanno una scarsa affinità con le pareti dei vasi sanguigni, motivo per cui rischiano di essere spazzate via dal flusso o dalla fuoriuscita di sangue, vanificando la loro azione coagulante. Questo vale soprattutto per le particelle più piccole, di dimensione nanometrica [3]. Per ovviare a questo problema, Hong e il suo gruppo di ricerca hanno proposto la formazione di agglomerati di nanoparticelle di silice e hanno studiato l'efficacia emostatica di varie popolazioni di granuli, di dimensione compresa tra 0,4 e 1,1 mm. Per la loro formazione, si è partiti da particelle di silice mesoporosa, poliuretano pirofosfato di sodio e argilla, per poi passare a processi di miscelazione a secco e granulazione in umido per la formazione dei granuli. Sono stati effettuati test emostatici sia *in vivo* sia *in vitro*, confrontando i risultati dei granuli ottenuti con quelli di particelle di silice semplici. Innanzitutto, i risultati

hanno mostrato una migliore capacità di adsorbimento di acqua dei granuli di silice preparati, migliorandola del 130%. Inoltre, monitorando i tempi di coagulazione, si è passati da 150 secondi delle particelle di silice ai 30 secondi dei granuli ottenuti, dimostrando proprietà coagulanti decisamente migliori. Successivamente, ulteriori studi *in vivo*, hanno confermato la maggiore efficacia emostatica dei granuli di silice mesoporosa rispetto alle polveri, spiegata dalla maggiore capacità dei granuli di adsorbire acqua presente nel sangue precedente citata, che favorisce e velocizza le prime fasi della coagulazione. Inoltre, si è osservato che i granuli non venivano spazzati via dalla fuoriuscita di sangue, cosa che rallenta il processo di guarigione della ferita, a differenza delle particelle di silice semplici. Infine, anche la loro forma favorisce notevolmente una veloce ed efficace emostasi, perché influisce sulla superficie di contatto con cui possono interagire con il sangue [29].

In un altro loro di ricerca, di *Li et al.* [30], sono state studiate le proprietà emostatiche di uno xerogel di silice mesoporosa biodegradabile, sintetizzato tramite un processo sol-gel migliorato, con successivo trattamento di calcinazione a 600 °C. Lo xerogel ottenuto è stato analizzato e caratterizzato mediante analisi di fisisorbimento di azoto, analisi FT-IR, analisi XRD, ed è stato sottoposto a microscopia elettronica in trasmissione (TEM), rivelando una struttura amorfa, con un'ottima superficie specifica (901,17 m<sup>2</sup>/g) e diametro medio dei pori di 3,3 nm. Successivamente, sono state studiate le sue proprietà coagulanti, tramite i test del tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT) e il test del tempo di protrombina (PT). Da questi esami si è osservata che lo xerogel sintetizzato può attivare la coagulazione, favorendo sia la via intrinseca, sia la via estrinseca. Infine, ulteriori test emostatici effettuati sulle ferite all'orecchio di coniglio, hanno mostrato proprietà emostatiche migliori rispetto alla Yunnan Baiyao, un rimedio emostatico comune, usato come riferimento per valutare le prestazioni dello xerogel in questione.

### 1.3.2 Attività emostatica di silici funzionalizzate

Anche nelle applicazioni riguardanti le silici funzionalizzate, gli obiettivi più frequenti sono quelli di potenziare le proprietà emostatiche del materiale finale, implementandone il potere adsorbente, la capacità di attivare la coagulazione, di velocizzarne il processo, rafforzare i coaguli di sangue oppure di favorire una migliore adesione con i componenti presenti nel sangue.

*Wu et al.* [31] sono partiti dalla sintesi, mediante un processo sol-gel, di uno xerogel di silice (MSX), successivamente funzionalizzato con diverse quantità di ossido di calcio (CaO), pari a 0,5% e 10% molare, al fine di caratterizzare il materiale ottenuto e studiare le relative proprietà emostatiche. Ciò è stato possibile mediante i test di misura del tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT) e del tempo di protrombina (PT), per verificare quando sarebbero iniziati rispettivamente il processo intrinseco ed estrinseco dell'emostasi secondaria. È stato verificato, da test *in vitro*, che i tempi di tromboplastina parziale attivata e di protrombina riscontrati dallo xerogel di silice mesoporosa senza ioni calcio erano molto minori rispetto a quelli relativi a silici non porose, confermando un maggior effetto coagulante dello xerogel. Il tutto è riconducibile alla maggiore area superficiale, al maggiore volume poroso e al maggior potere adsorbente dello xerogel di silice nei confronti dell'acqua contenuta nel sangue (89% contro 31%). Inoltre, i campioni contenenti ossido di calcio hanno dimostrato tempi ancora più brevi, che si riducevano con l'aumentare della quantità di ossido di calcio presente nelle particelle di silice considerate. Questi dati sono stati spiegati grazie alla maggiore predisposizione a rilasciare di ioni calcio, i quali, come spiegato in precedenza, favoriscono l'attivazione di molti fattori e processi durante la cascata di coagulazione [3].

*Chen et al.* [32], invece, hanno modificato delle nanoparticelle di silice mesoporosa con acido idrocaffeoico e chitosano (MSN@CS-HCA). Il materiale sintetizzato presenta una struttura core-shell, ed ha mostrato delle eccellenti proprietà coagulanti, dovute alla sua propensione a favorire la cascata di coagulazione, l'agglomerazione degli emocomponenti e una migliore adesione ai tessuti. È stato sottoposto a test emostatici effettuati sia *in vitro* sia *in vivo*, mostrando eccellenti proprietà emostatiche grazie all'effetto positivo dovuto alla funzionalizzazione. Ad esempio, nello studio dei modelli di lesione dell'arteria femorale e del fegato di ratto, il materiale MSN@CS-HCA ha mostrato dei tempi di coagulazione rispettivamente inferiore del 60,3% e del 42,9%, rispetto a quelli osservati per le particelle di silice mesoporose pure. Inoltre, il materiale in questione ha dimostrato un'ottima biocompatibilità e una buona capacità di favorire il procedimento di guarigione delle ferite. È stato ipotizzato che questo materiale possa formare una struttura reticolare con la fibrina, rafforzando la resistenza del coagulo e limitando ulteriormente la perdita di sangue.

Altri studi, invece, hanno proposto l'utilizzo delle particelle di silice mesoporosa per migliorare le proprietà emostatiche di altri materiali.

Ad esempio, nel lavoro descritto da *Sun et al.* [33] le particelle di silice mesoporosa sono state usate in combinazione con il chitosano, per migliorare le performance e la versatilità di quest'ultimo in applicazioni emostatiche. In particolare, è stata proposta la sintesi di microsfele formate da nanoparticelle di silice mesoporosa rivestite da chitosano (CSMS-S) tramite un processo che comprende la formazione di una microemulsione inversa e un trattamento termico al fine di indurre la separazione di fase. Confrontando le prestazioni emostatiche del nuovo composto ottenuto con particelle porose di chitosano puro, si è osservato che favoriscono la formazione di coaguli più grandi e possono ridurre i tempi di coagulazione. Infatti, dai test emostatici eseguiti sul modello di lesione del fegato di ratto, è emerso che il tempo di coagulazione delle CSMS-S è stato di 97 secondi, contro i 114 secondi delle particelle di chitosano puro poroso. Inoltre, gli esami istologici hanno confermato una scarsa tossicità del composto ottenuto e nessun effetto indesiderato in corrispondenza della ferita durante il suo utilizzo, dimostrando di essere un agente emostatico sicuro ed efficace.

In un altro esempio, *Chen et al.* [34] hanno provato a funzionalizzare con nanoparticelle di silice mesoporosa una spugna carbossimetil N-alchilata (GACS), anch'essa con proprietà emostatiche, e ulteriormente modificata con glicerolo per migliorare le proprietà idrofile del composto. Ciò ha comportato la creazione di una spugna (MSN-GACS) che ha mostrato ottime proprietà emostatiche *in vitro*. Queste proprietà sono state anche confrontate con le prestazioni della garza emostatica Combat Gauze (CG), largamente usata nell'esercito statunitense, mostrando maggiori proprietà adsorbenti nei confronti del sangue ed una migliore adesione piastrinica. Inoltre, nello studio di modelli di una lesione femorale di un coniglio, il complesso MSN-GACS ha mostrato una maggiore efficienza emostatica e una minore tossicità rispetto alla Combat Gauze, dimostrandosi un valido strumento per il trattamento emostatico delle ferite in fase pre-ospedaliera.

*Shen et al.* [35], invece, hanno sintetizzato un complesso derivante da un idrogel cationico super-adsorbente coordinato con particelle di silice mesoporosa (CSH-MS), ottenuto mediante un processo di polimerizzazione dei radicali liberi, e l'hanno successivamente testato per verificarne sia le proprietà emostatiche, sia quelle antibatteriche. Il materiale ottenuto ha evidenziato una superficie rugosa ed estremamente adsorbente nei confronti dell'acqua (con un tasso di adsorbimento di circa il 5000%), anche se questa proprietà dipende dal grado di reticolazione raggiunto durante il processo. Inoltre, testando un nuovo campione di questo materiale, contenente il 5% di particelle di silice (chiamato CSH-MS1), è stata confermata la sua predisposizione a favorire l'aggregazione dei globuli rossi e l'attivazione delle proteine del

sangue, con effetti benefici sui processi di coagulazione. Inoltre, nei test emostatici eseguiti sul modello di amputazione della coda di ratto, il suddetto materiale, oltre a ridurre significativamente le perdite di sangue e i tempi di coagulazione, ha manifestato scarsa citotossicità, ottime proprietà antibatteriche e bassa tendenza all'emolisi.

In un altro lavoro di ricerca, *Dai et al.* [36] hanno studiato e testato un processo di sintesi finalizzato alla formazione di microsfele di xerogel di silice rivestite da chitosano macroporoso (CSSX), da testare in ambito emostatico. Si è partiti da particelle di silice mesoporosa e fogli di chitosano poroso, eseguendo un processo di sintesi sol-gel con un successivo trattamento di imprinting molecolare, usando polietilenglicole (PEG). Sono stati sintetizzati più campioni di xerogel, utilizzando diverse quantità di PEG e di chitosano. Gli xerogel ottenuti hanno mostrato un'elevata area superficiale specifica (755,7 m<sup>2</sup>/g) e una dimensione media dei pori di 3,6 nm. Dai risultati test *in vitro* e *in vivo*, è stato confermato che gli xerogel ottenuti possono favorire significativamente l'emostasi, accelerando il processo e attivando la cascata di coagulazione in tempi più brevi. In particolare, il campione contenente il 2% di chitosano e il 5% di PEG ha riscontrato le migliori performance emostatiche. Inoltre, dopo gli esami istologici, si è osservato che lo xerogel in questione è caratterizzato da una bassissima citotossicità. Infatti, non sono stati riscontrati effetti collaterali o lesioni indesiderate alla ferita durante il suo utilizzo, quali reazioni esotermiche che possono causare ustioni ai tessuti, necrosi, infiammazioni o degenerazioni dei vasi sanguigni, neanche a distanza di sette giorni.

Sono stati intrapresi anche degli studi anche sulla ricerca di soluzioni ai limiti delle silici riscontrati in ambito emostatico, come la scarsa adesione ai vasi sanguigni.

Ad esempio, *Chen et al.* [37] ha proposto una funzionalizzazione delle MSN con urusciolo, andando a creare una struttura core-shell (MSN@U). L'urusciolo è dotato di una lunga catena idrofoba e del gruppo pirocatecolo, idrofilo, i quali, all'interfaccia aria/sangue, favoriscono la formazione di una membrana di Janus anfipatica (uno strato idrofobo e uno strato idrofilo in una membrana) tramite auto-assemblaggio. Infatti, la catena alchilica va a creare uno strato idrofobo che riduce l'ulteriore fuoriuscita di sangue, mentre il gruppo pirocatecolo, formando legami covalenti con le pareti del vaso sanguigno, ne garantisce una buona adesione. Inoltre, anche i gruppi ossidrilici del pirocatecolo, dotati di una parziale carica negativa, possono favorire l'attivazione del fattore XII durante la fase di emostasi secondaria e quindi rendere questo processo più rapido. Dopo la caratterizzazione delle particelle ottenute, è stato verificato che il complesso MSN@U era dotato di una buona area superficiale specifica, pari a 448,91 m<sup>2</sup>/g, e una struttura molto porosa, con una dimensione media dei pori di 3,94 nm. Da test effettuati sia *in vitro*, sia *in vivo*, è stata confermata che il complesso MSN@U combina le buone attività emostatiche delle particelle di silice mesoporosa con una migliore adesione alle pareti dei vari sanguigni grazie all'urusciolo, dimostrando anche una migliore emocompatibilità, un maggiore effetto coagulante rispetto alle particelle singole. Infine, MSN@U ha dimostrato di garantire una buona emostasi anche *in vivo*.

Infine, sono stati ritrovati in letteratura diversi studi riguardanti l'utilizzo di particelle di silice mesoporosa per applicazioni emostatiche, nei quali si desiderava implementare anche una buona attività antibatterica, oltre che coagulante, nel materiale finale.

Ad esempio, *Nie et al.* [38] hanno preparato dei granuli di silice mesoporosa con nanoparticelle di argento incorporate al loro interno (AgNP), note per le loro attività antibatteriche. Il tutto è stato ottenuto mediante un processo sol-gel one-pot. Dopo diverse analisi e caratterizzazioni, volte a definirne la struttura e le sue proprietà di adsorbimento in ambito emostatico e la sua biocompatibilità, il materiale ottenuto (AgNP-MSG) si è rivelato essere un ottimo agente emostatico, dotato anche di una buona attività batterica contro lo *Staphylococcus Aureus*. Ulteriori test *in vivo*, hanno mostrato che un materiale contenente il 5% di AgNP è in grado di

interrompere il sanguinamento in soli 7 secondi, dimostrando una performance più che 5 volte migliore rispetto alle garze emostatiche presenti in commercio. Inoltre, le analisi istologiche hanno dimostrato che i compositi in questione si degradano completamente entro due settimane dal loro utilizzo, nel sito della lesione.

Anche *Dai et al.* [39] hanno provato a sintetizzare un complesso partendo da particelle di silice mesoporosa funzionalizzate con ioni calcio e argento (AgCaMSS), per abbinare le proprietà emostatiche a quelle antibatteriche. I risultati del loro lavoro hanno mostrato che il materiale ottenuto era in grado di favorire l'adesione delle piastrine, attivare la via intrinseca dell'emostasi secondaria e ridurre i tempi di coagulazione. Inoltre, è stata riscontrata una buona stabilità termica e, soprattutto, il nuovo materiale ha ridotto le probabilità di morte nella cura di lesioni epatiche e dell'arteria femorale. Ha anche mostrato un'efficace attività antibatterica contro *Escherichia Coli* e *Staphylococcus Aureus*. Infine, è stata testata anche la sua degradabilità mediante dei test di immersione in una soluzione tris-HCl, mostrando una potenziale perdita di massa del 40% dopo soli 42 giorni, probabilmente favorita anche dalla presenza di ioni calcio e argento.

*Wang et al.* [40] hanno intrapreso un'attività sperimentale basata sull'utilizzo di particelle di silice mesoporosa SBA-15, andando a formare un aerogel ibrido di chitosano e silice che possa presentare buone proprietà sia emostatiche, sia antibatteriche. A questo scopo, si è partiti usando cloruro di (3-acrilamidopropil)trimetilammonio (APTMAC), precursore della N-alammina, funzionalizzati con le particelle di silice, e  $\gamma$ -cloropropil-trietossisilano (CPTES) che funge da agente reticolante, per poi procedere alla sintesi mediante un processo di liofilizzazione. Sono stati sintetizzati due tipi di aerogel ibridi: alcuni sono stati sintetizzati favorendo la formazione di ponti silossanici, mentre altri mediante un processo di clorurazione, partendo dal precursore della N-ammina e implementando maggiormente le proprietà antibatteriche. Gli aerogel ottenuti presentano una bassa densità (circa 0,12 g/cm<sup>3</sup>) ed un'elevata porosità ( $\geq 99,53\%$ ). In particolare, gli aerogel clorurati hanno dimostrato un'efficace attività antibatterica nei confronti di *Escherichia Coli* e *Staphylococcus Aureus*, entro un tempo massimo di 10 minuti e di 30 minuti, rispettivamente. Dai risultati dei test emostatici, confrontando le prestazioni degli aerogel silossanici sintetizzati con quelle delle garze comuni e dell'ovatta, si è verificato che l'aerogel ha mostrato migliori proprietà adsorbenti nei confronti dell'acqua contenuta nel sangue. Inoltre, dai test di adesione delle piastrine e degli eritrociti, si è osservata una migliore tendenza all'adesione sulle pareti degli aerogel silossanici ottenuti. In pratica, gli aerogel in questione si sono dimostrati un ottimo materiale ibrido in ambito biomedico.

Invece, nello studio di *Ding et al.* [41] si è partiti dal presupposto di potenziare le proprietà coagulanti della silice tramite una procedura di doppio doping, con ioni calcio e ioni gallio, applicata su nanoparticelle di silice mesoporosa, e implementare simultaneamente anche proprietà antibatteriche nel materiale finale (Ga<sub>0,5</sub>CaMSS). Le particelle ottenute sono state caratterizzate mediante spettroscopia elettronica a trasmissione (TEM), analisi EDS, misure di fisisorbimento e desorbimento di azoto, analisi XRD, e analisi FT-IR, al fine di valutarne la struttura, la dimensione dei pori e l'area superficiale specifica. Successivamente, le Ga<sub>0,5</sub>CaMSS ottenute sono state sottoposte a test di coagulazione (CBT), test del tempo di parziale tromboplastina attivata (APTT), test del tempo di protrombina (PT) e il test del tromboelastogramma (TEG), mostrando proprietà emostatiche nettamente migliori rispetto alle nanoparticelle di silice pure, usate come riferimento. Inoltre, questo materiale ha riscontrato una notevole attività antibatterica contro *Staphylococcus Aureus* ed *Escherichia Coli*, mentre da ulteriori test appositi, ha mostrato anche di avere bassa citotossicità e una buona biocompatibilità, dimostrandosi un materiale valido per il trattamento immediato di emorragie e infezioni. Da tutti i test precedentemente citati, si è ipotizzato che gli ioni calcio possano favorire e catalizzare diversi processi di attivazione dei fattori durante la cascata di attivazione.

Allo stesso modo, è stato dedotto che gli ioni gallio incentivano la precipitazione del fibrinogeno, che favorisce la coagulazione.

*Wang et al.* [42] hanno usato particelle di silice mesoporosa contenenti acido tannico per poi testarle in ambito emostatico, soffermandosi anche sul valutare le proprietà antibatteriche del materiale. L'acido tannico è stato legato alle silici tramite due possibili processi, ossia adsorbimento fisico ed innesto chimico. Esso è stato scelto al fine di ridurre il tasso di emolisi e di favorire una migliore adesione delle particelle con il sangue ed una migliore concentrazione tra gli emocomponenti durante la coagulazione, impattando positivamente sul processo. I due campioni di materiale ottenuti sono stati sottoposti a test emostatici sia *in vitro* sia *in vivo*, compresi anche dei test sulle ferite derivanti dal taglio della coda di ratto. In particolare, dai risultati si è potuto osservare che i tempi di coagulazione registrati dalle particelle di silice caricate con acido tannico tramite adsorbimento fisico possono essere ridotti potenzialmente fino al 65%. Inoltre, la quantità di acido adsorbita dalle particelle ha mostrato risvolti altrettanto positivi sull'attività antibatterica delle particelle, in particolare contro *Staphylococcus Aureus* e *Staphylococcus Epidermis*. Invece, le particelle di silice caricate con acido tannico tramite innesto chimico hanno mostrato una superficie specifica inferiore rispetto alle altre, in quanto l'acido andava a sostituirsi ai gruppi ossidrilici delle particelle, mostrando proprietà emostatiche e antibatteriche peggiori. Nonostante questo, entrambe le polveri hanno mostrato un'ottima vitalità cellulare, da cui deriva un'eccellente biocompatibilità delle particelle studiate.

*Li et al.* [43], con l'intento di migliorare le prestazioni emostatiche e antibatteriche dei nastri in nanofibra di polivinilpirrolidone, hanno studiato un processo di modifica degli stessi, utilizzando nanoparticelle di silice mesoporosa funzionalizzate con curcumina (CCM-MSN). In particolare, sono state incorporate le particelle di silice caricate dentro i nastri di nanofibra tramite un processo di elettrofilatura. Successivamente, sono state caratterizzate e studiate le nanofibre modificate ottenute, valutandone le proprietà strutturali, emostatiche, antibatteriche e ne è stata testata la biocompatibilità.

Dai risultati dei test e delle caratterizzazioni effettuate, si è notato che le particelle di silice caricate con curcumina che presentano un rapporto CCM/MSN espresso in massa inferiore all'8%, possono essere disperse efficacemente in modo omogeneo nelle nanofibre tramite elettrofilatura. Inoltre, da test di citotossicità eseguiti *in vitro*, si è osservato che i suddetti nastri modificati non hanno sortito effetti nocivi o impedimenti alla crescita di una coltura di cellule L929, mentre nei test antibatterici ha dimostrato una migliorata attività antibatterica contro il ceppo *Staphylococcus Aureus*, resistente alla meticillina. Per quanto riguarda le proprietà emostatiche, i nastri di nanofibra ottenuti hanno dimostrato una buona capacità di concentrare gli emocomponenti e un buon potere adsorbente nei confronti del sangue, soprattutto i nastri con una maggiore concentrazione di CCM-MSN. Da ulteriori test emostatici *in vivo*, tra cui dei test sul trattamento di ferite epatiche nei topi, si è evinto che i nastri in nanofibra in questione, possono eventualmente trasformarsi in idrogel quando viene a contatto con il sangue derivante da una ferita, attivando preventivamente il processo di coagulazione e velocizzando il processo. Di conseguenza, i nastri di nanofibra modificati in questione si sono dimostrati degli ottimi strumenti per il trattamento immediato delle ferite.

## 1.4 Conclusioni

Dagli studi e le ricerche effettuate, è evidente il potenziale delle silici mesoporose nelle applicazioni in ambito emostatico. Essendo in generale materiali adsorbenti, biocompatibili, e semplici da modificare a seconda dell'esigenza, rappresentano una valida possibilità per la terapia delle ferite. Inoltre, agisce in modo positivo in molteplici fasi durante il processo di coagulazione, quali l'adsorbimento dell'acqua contenuta nel sangue, la maggiore propensione ad attivare i fattori coinvolti durante l'emostasi secondaria (soprattutto se si parla di silici

funzionalizzate), l'aggregazione degli emocomponenti e la diffusione della trombina, confermando ancora una volta la loro grande versatilità.

Gli studi sulle proprietà morfologiche delle silici hanno dimostrato che le migliori performance emostatiche sono state osservate su campioni di silice mesoporosa con area superficiale specifiche, volume poroso e dimensione dei pori elevati, in quanto queste caratteristiche comportano migliori proprietà adsorbenti. Inoltre, pori più grandi hanno dimostrato di essere in grado di diffondere più facilmente ioni calcio o molecole coinvolte durante la coagulazione, come la trombina o i vari fattori coinvolti durante la coagulazione.

Per questo motivo in questo lavoro di tesi, si è deciso di studiare l'attività emostatica di sfere silici mesoporose con pori grandi, di dimensione intorno ai 25 nm, in quanto materiale precedentemente studiato per questa applicazione e ha dimostrato una buona attività emostatica [1]. Inoltre, si è cercato di implementarne l'attività antibatterica, tramite un processo di funzionalizzazione con ioni zinco, al fine di ottenere un materiale che combinasse il potere emostatico con il potere antibatterico, dato che non sempre è sufficiente, in ambito biomedico, fornire materiali esclusivamente emostatici [2,3], ma è sempre preferibile implementare più proprietà simultaneamente, tra cui quelle antibatteriche, come testimoniato da studi presenti in letteratura [38-43].

Nel capitolo successivo, infatti, verranno descritte le proprietà, l'importanza e le applicazioni degli ioni zinco, spiegando le ragioni del loro utilizzo, proseguendo con la descrizione dell'attività sperimentale e successivo elenco e discussione dei risultati ottenuti.

## 2. Attività antibatterica degli ioni zinco

Il fine ultimo di questo capitolo è quello di descrivere le proprietà antibatteriche degli ioni zinco, soffermandosi sui meccanismi e le dinamiche che causano l'azione battericida di tali ioni. Verrà spiegato, inoltre, il motivo per cui si è deciso di impiegare ioni zinco nella seguente attività sperimentale, citando anche altre applicazioni che si sono servite di ioni zinco per implementare attività antibatteriche e valutando anche il loro possibile effetto favorevole al raggiungimento dell'emostasi.

Lo zinco è uno degli elementi metallici più importanti per il corretto svolgimento di molteplici funzioni vitali negli organismi viventi, essendo alla base di diversi processi biologici intracellulari [44,45]. È anche il secondo metallo più presente negli ambienti organici e nel sangue, dopo il ferro [46,47]. Inoltre, lo zinco è uno degli elementi in grado di generare ioni biologicamente attivi, così come l'argento, il rame, il cobalto, l'alluminio o il potassio [4]. Questi ioni hanno effetti biocidi nei confronti di una gran varietà di batteri, sia Gram-positivi, sia Gram-negativi. Questa proprietà viene chiamata effetto oligodinamico, ed è nota già da secoli [48]. Non è ancora stato chiarito con precisione il meccanismo con cui gli ioni metallici possano avere effetti antimicrobici, ma è stato osservato che essi causano la formazione di composti ossigenati altamente reattivi che vanno a danneggiare la membrana cellulare dei batteri, oppure interferire sugli scambi intracellulari [49]. L'attività antibatterica degli ioni cellulari dipende dal tipo di batterio sulla quale viene sperimentata. Infatti, alcune ricerche hanno evidenziato un possibile effetto battericida più sostenuto contro i batteri Gram-negativi, ipotizzando che lo strato di peptidoglicano più sottile, presente nella membrana plasmatica di questi ultimi, garantisca una minore protezione contro gli ioni metallici. Tuttavia, altri studi hanno smentito questa teoria, evidenziando che lo spessore dello strato di peptidoglicano nella membrana cellulare dei batteri Gram-positivi potrebbe non essere sufficiente per garantire una maggiore protezione all'azione antimicrobica [48].

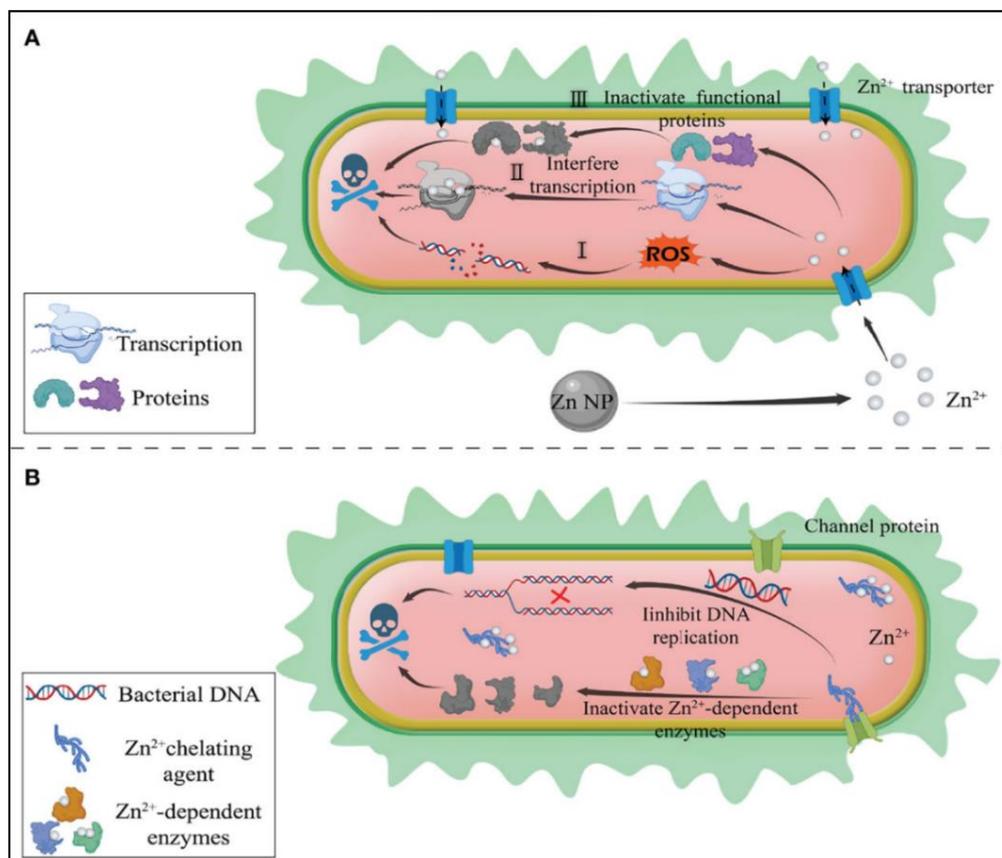
Nel caso particolare degli ioni zinco ( $Zn^{2+}$ ), essendo uno dei metalli più coinvolti in diversi processi biologici cellulari, si può amplificare l'azione battericida dei suoi ioni andando ad intervenire sulla loro concentrazione, rendendola molto alta o molto bassa, causando l'impedimento di molte funzioni vitali batteriche. In virtù di questa doppia modalità con cui è possibile utilizzare gli ioni zinco, esistono due approcci possibili: sovraccarico e deprivazione di zinco, entrambi illustrati nella figura 2.1 (nella pagina seguente). Nel primo caso, si va a creare un eccesso di ioni zinco nell'ambiente batterico, andando a compromettere ed inibire i processi di respirazione cellulare batterica, di trascrizione del DNA e causando l'inattivazione di diverse proteine fondamentali per le attività metaboliche. Inoltre, gli ioni zinco favoriscono la formazione intracellulare di specie chimiche dell'ossigeno molto reattive, che causano danni alla membrana plasmatica dall'interno, con conseguente morte dei batteri. Al contrario, agendo secondo la tecnica di deprivazione di zinco, vengono rilasciati agenti chelanti selettivi, rendendo gli ioni zinco inaccessibili per i batteri, compresi quelli intracellulari. Ciò comporta l'inattivazione degli enzimi dipendenti da tale ione e responsabili della trascrizione del DNA, con conseguente morte dei batteri. Tra le due modalità, la prima ha dimostrato un'azione antibatterica maggiore [44].

Gli ioni zinco sono stati largamente utilizzati in applicazioni biomediche per implementare proprietà antibatteriche, così come altri metalli con proprietà analoghe. Le modalità più diffuse sono principalmente due: o vengono usate particelle di ossido di zinco in grado di rilasciare ioni zinco [49–51], oppure si procede con la funzionalizzazione di altri materiali [4,52–54]. Di conseguenza, è stato deciso di utilizzare lo zinco per il seguente lavoro sperimentale per diversi

motivi. Innanzitutto, esso rappresenta un elemento più sicuro per l'organismo rispetto agli ioni rame e argento, che normalmente non vengono coinvolti nei processi biologici cellulari [44]. Inoltre, gli ioni argento, soprattutto oltre una certa quantità, si sono rivelati potenzialmente più tossici dello zinco [46]. In particolare, quando vengono a contatto con l'organismo, gli ioni argento e gli ioni rame rischiano di entrare anche nelle sue cellule, innescando gli stessi processi di formazione di composti ossigenati instabili che danneggiano la membrana plasmatica, causando la morte delle cellule coinvolte. Essi tendono ad accumularsi nell'organismo, e possono causare disfunzione epatica o nelle cellule dei mammiferi in generale. Infine, è stato riscontrato recentemente che l'efficacia dell'azione antibatterica degli ioni argento è diminuita nel tempo, dimostrando che i batteri hanno acquisito una maggiore resistenza ad essi [44].

Infine, in alcune ricerche è stato riscontrato un effetto pro-coagulante da parte dello zinco, che va a favorire alcuni passaggi chiave del processo di emostasi, come l'aggregazione piastrinica e l'interazione tra le proteine presenti nel sangue [55,56]. Inoltre, nel lavoro di *Mammadova-Bach e Braun* [45] sono stati studiati gli effetti negativi di un'alimentazione povera di zinco sui topi, essendo già noto che questa rappresenta la causa di decesso per una percentuale di uomini compresa tra l'1% e il 4% ogni anno. È stato osservato che i topi alimentati seguendo una dieta povera di zinco presentavano una maggiore tendenza al sanguinamento e ad una minore adesione piastrinica durante i processi di coagulazione, dimostrando una possibile correlazione tra carenza di zinco ed efficienza dei processi emostatici. Inoltre, è stata analizzata l'influenza di tale ione sulla formazione di coaguli, confermandone l'effetto benefico, in quanto essi velocizzano la formazione dei coaguli e contribuisce a renderli più spessi e resistenti.

Nei capitoli successivi, inizierà la descrizione dell'attività sperimentale, partendo dal procedimento di sintesi e funzionalizzazione delle sfere di silice mesoporosa per poi passare alla loro caratterizzazione e alla discussione dei risultati ottenuti.



**Figura 2.1:** Illustrazione delle modalità di sovraccarico di zinco (A) e privazione di zinco (B) [44].

### 3. Materiali e metodi

In questo capitolo verrà descritta l'attività sperimentale che caratterizza questo lavoro di tesi, che consiste nello studio dell'attività emostatica di silici mesoporose funzionalizzate con zinco, non essendo stati trovati articoli analoghi in letteratura. Verranno descritti i materiali e i processi seguiti durante questo lavoro, partendo dalla sintesi delle particelle di silice, per poi passare al processo di funzionalizzazione con ioni zinco, concludendo con la descrizione di tutti gli strumenti e le analisi utili per la caratterizzazione dei campioni ottenuti e con l'illustrazione del procedimento seguito per i test emostatici.

#### 3.1 I materiali

Acido cloridrico (HCl), 37%), Sigma-Aldrich®, Acqua deionizzata (grado LC-MS) Merck®, Pluronic P123 ((EO<sub>20</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>20</sub>; HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>20</sub>(CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O)<sub>70</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>20</sub>H), Sigma-Aldrich®, Cloruro di potassio (KCl, in polvere, cristallino, ≥ 99%), Sigma-Aldrich®, Mesitilene (1,3,5-trimetilbenzene, C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>, 98%), Sigma-Aldrich®, Ortosilicato tetraetile (TEOS, SiC<sub>8</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> 99,999%) Sigma-Aldrich®, Nitrato di zinco idrato (Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · xH<sub>2</sub>O, in polvere, 99,999%), Sigma-Aldrich®, Cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub>, in polvere, > 99,999%, Sigma-Aldrich®), Plasma bovino (Fonte SLCM4897), Sigma-Aldrich®.

#### 3.2 Processo di sintesi delle sfere di silice mesoporosa

Il processo utilizzato per la sintesi delle sfere di silice mesoporosa (SSM) è quello descritto nel lavoro di *Mohamed et al.* [1]. Si inseriscono 23,6 g di acido cloridrico a 120 g di acqua distillata in un becher, il tutto a temperatura ambiente. Successivamente, vengono aggiunti nella soluzione 4 g di Pluronic P123, che funge da agente templante, e 6,1 g di cloruro di potassio. Il tutto viene agitato tramite un agitatore magnetico, impostato a circa 300 rpm per favorire lo scioglimento del Pluronic. Dopo circa 30 minuti, vengono aggiunti 3 g di mesitilene che fungerà da agente rigonfiante, per poi lasciare la soluzione in agitazione per altre due ore. Trascorse le due ore, vengono aggiunti goccia a goccia 8,5 g di TEOS, ossia il precursore della silice usato, e si continua ad agitare per dieci minuti. Successivamente la miscela viene lasciata in un bagno d'olio in ambiente statico alla temperatura di 35 °C per 24 ore. Poi il bagno in questione viene riscaldato fino a 100 °C, e viene lasciato il tutto per ulteriori 24 ore. La soluzione ottenuta viene filtrata con l'ausilio di una pompa a vuoto, filtri di carta e acqua distillata, per rimuovere qualsiasi traccia di sale. La procedura viene ripetuta per 3 volte e la polvere risultante viene lasciata a riposo in una stufa a 60 °C per una notte, per favorirne l'essiccazione. Infine, la polvere ottenuta viene calcinata a 500 °C per sei ore, utilizzando una muffola, alla velocità di 1 °C/min. Dal processo di sintesi si ottengono circa 2 g di particelle di silice mesoporosa (campione SSM).

#### 3.3 Processo di funzionalizzazione con ioni zinco

Non essendo specificato a priori il numero di molecole d'acqua presenti nella polvere nitrato di zinco a disposizione, per ricavare la quantità iniziale necessaria da usare nel processo di funzionalizzazione si è partiti dalla percentuale in massa di zinco desiderata per il materiale finale, e dalla massa molare del composto non idrato (nonostante il rischio di sovrastimare la quantità di zinco).

Per la funzionalizzazione con ioni zinco si è scelto il processo descritto da *Trinh et al.* [4]. Si è deciso di effettuare due processi di funzionalizzazione, al fine di ottenere due campioni di silice,

contenenti rispettivamente una percentuale in massa nominale di zinco pari al 5% e al 10%. Nel primo caso, per la preparazione della silice con il 5% m/m di zinco (campione Zn5%@SSM), sono stati disciolti 65,17 mg di nitrato di zinco idrato in 4 ml di acqua distillata. Subito dopo sono stati aggiunti 427,5 mg di silice. Il tutto è stato miscelato per tre ore, servendosi di un agitatore magnetico impostato alla velocità di 200 rpm. In seguito, la miscela è stata messa in stufa a 60 °C per 24 ore ed infine calcinata alla temperatura di 500°C e alla velocità di 1 °C/min. È stato seguito lo stesso procedimento anche per la silice funzionalizzata con Zinco al 10% m/m (campione Zn10%@SSM), ma cambiando le quantità. Infatti, in questo caso sono stati disciolti 103,34 mg di nitrato di zinco in 4 ml di acqua distillata, aggiungendo poi altri 405 mg di silice. Infine, è stato creato un ulteriore campione (SSM-H<sub>2</sub>O), partendo sempre dalla silice mesoporosa ottenuta durante la sintesi precedente e disciogliendola in 4 ml di acqua, ma senza l'utilizzo di nitrato di zinco. Le fasi successive del processo sono state le stesse eseguite per i campioni Zn5%@SSM e Zn10%@SSM, e questo terzo campione avrà la funzione di fungere da riferimento per gli altri due, essendo stato sottoposto agli stessi e identici processi, in particolare l'interazione con acqua.

### 3.4 Caratterizzazione strumentale

I campioni ottenuti sono stati analizzati tramite varie tecniche di caratterizzazione, tra cui: microscopia elettronica ad emissione di campo (FESEM), analisi di fisisorbimento di azoto, analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR), analisi di diffrazione ai raggi X (XRD) ed analisi XPS.

#### 3.4.1 Microscopia elettronica FESEM e Spettroscopia EDX

La microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo (FESEM) è una tecnica microscopica che consente di visualizzare direttamente il campione, potendo quindi valutarne direttamente le caratteristiche morfologiche e alcune loro proprietà, come la dimensione media o la forma delle particelle. La spettroscopia EDX (Energy Dispersive X-ray Spectrometry), invece, è una tecnica spettroscopica che permette di ricavare informazioni sugli elementi presenti nel campione. Per l'analisi, sia microscopia sia EDX, è stato usato lo strumento FESEM Zeiss Merlin. Sono state ottenute immagini con ingrandimenti che vanno da 1000 X a 50000 X, e su scale che variano da 0,1 µm a 20 µm. Prima dell'analisi è stato necessario metallizzare i campioni con platino.

#### 3.4.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

L'analisi di fisisorbimento di azoto viene utilizzata per valutare l'area superficiale specifica ( $SSA_{BET}$ ), la distribuzione dei pori, il diametro medio e il volume totale dei pori del materiale in esame. Per effettuare l'analisi, è stato impiegato lo strumento l'ASAP 2020 Plus della Micrometrics. La misura necessita di un quantitativo di polvere di materiale compreso tra i 50 e i 100 mg. Prima della misura di adsorbimento è stato necessario effettuare un degasaggio a 150 °C della durata di due ore, al fine di eliminare eventuali contaminanti o specie già adsorbite sulla superficie. La  $SSA_{BET}$  è stata calcolata tramite il modello di Brauner-Emmet-Teller (BET), nell'intervallo di pressione relativa compreso tra 0,1 e 0,25. La distribuzione dei pori è stata ottenuta mediante il metodo di Density Functional Theory (DFT), il diametro medio dei pori è stato ricavato da tale distribuzione. Infine, il volume poroso è stato determinato a pressione relativa pari a 0,90 circa.

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

La Spettroscopia infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR) si avvale della proprietà delle molecole di emettere uno spettro caratteristico se irradiate da una radiazione infrarossa, il quale presenta dei picchi di forma e intensità dipendenti esclusivamente dai gruppi funzionali e dagli atomi presenti nel materiale analizzato. Lo spettro viene rappresentato in un grafico, che mette in relazione il numero d'onda della radiazione incidente, sull'asse x, con l'assorbanza o la trasmittanza, sull'asse y. In questo caso, è stato usato lo strumento Bruker Equinox 55 con detector MCT, con risoluzione di  $2\text{ cm}^{-1}$  e raffreddamento ad azoto liquido. Per effettuare l'analisi, è stata preparata una pastiglia partendo dalla polvere del materiale da studiare, con l'aiuto di una pressa idraulica. Successivamente, la pastiglia è stata inserita in una bustina d'oro forata al centro e immessa in una cella dotata, nella parte terminale, di finestre di KBr, trasparenti alla radiazione infrarossa. Prima dell'analisi, è stato effettuato un degasaggio in vuoto (pressione residua: 0,1 Pa), della durata di 30 minuti a temperatura ambiente.

### 3.4.4 Diffrattometria a raggi X (XRD)

La diffrattometria a raggi X (XRD) è una tecnica molto utilizzata per lo studio dei materiali (soprattutto se cristallini) e sfrutta la grande capacità penetrativa dei raggi X, dovuta alla loro elevata frequenza. La radiazione irradia il materiale preso in esame e, grazie alla lunghezza d'onda paragonabile alle dimensioni della distanza tra i piani cristallini del materiale, si genera un fenomeno di diffrazione, con deviazione del fascio incidente. Quest'ultimo raggiunge un detector posto all'estremità opposta dello strumento, che ne rileva l'intensità. L'analisi XRD è stata effettuata utilizzando il diffrattometro Panalytical X'Pert<sup>3</sup> Powder (Cu K $\alpha$  radiation). La polvere di silice è stata inserita in un portacampione di alluminio. L'analisi è stata effettuata ad alti angoli (da  $2\theta = 5^\circ$  a  $2\theta = 60^\circ$ ).

### 3.4.5 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)

La spettroscopia fotoelettronica a raggi X è una tecnica che permette di valutare gli elementi presenti sulla superficie del campione, il loro stato chimico e la quantità. In particolare, tale tecnica fornisce una stima del numero di atomi, nell'area considerata. Per l'analisi è stato usato il VersaProbe 5000 della Physical Electronic Instruments, con sorgente una radiazione monocromatica Al K $\alpha$  1486.6 eV.

## 3.5 Test emostatici

Per studiare l'attività emostatica delle materiali ottenuti, è stato effettuato un test, su plasma animale, per la valutazione del tempo necessario per la formazione del coagulo.

Il test è stato eseguito seguendo la procedura riportata da *Mohamed et al.* [1]. Inizialmente, sono stati inseriti 2,5 mg di materiale una provetta eppendorf, poi inserita in un bagno a  $37^\circ\text{C}$  per 5 minuti per mantenerla a tale temperatura. Successivamente, sono stati aggiunti 0,25 ml di plasma bovino, e il tutto è stato lasciato nel bagno per ulteriori 3 minuti. Dopo questo intervallo di tempo, sono stati aggiunti 25  $\mu\text{l}$  di una soluzione di cloruro di calcio 0,2 M ( $\text{CaCl}_2$ ), per innescare la coagulazione. Infine, la provetta viene ribaltata ogni 15 secondi per verificare lo stato della coagulazione del plasma. Quando il plasma smetterà di essere fluido e di scorrere liberamente, assumendo un aspetto decisamente più viscoso e gelatinoso e una colorazione più opaca, allora il processo di coagulazione sarà avvenuto. Il tempo impiegato dal plasma per la formazione del coagulo viene preso come risultato di tale test. Inoltre, è stato effettuato anche un test in assenza materiale, chiamato "controllo", che verrà usato come riferimento.

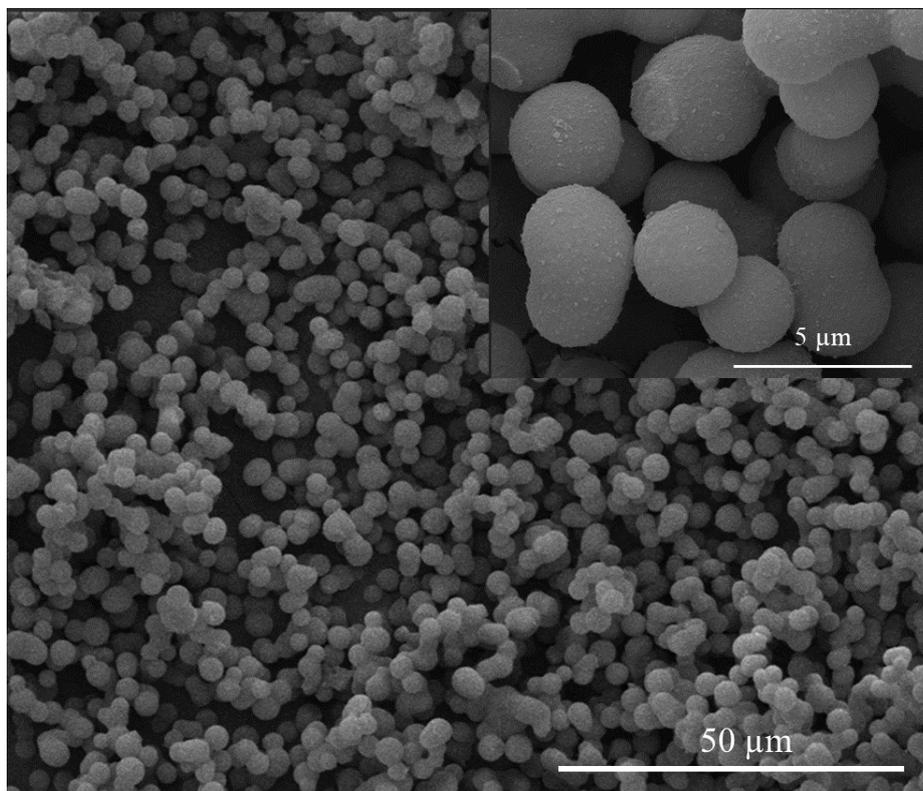


## 4 Risultati

In questo capitolo, verranno mostrati e discussi i vari risultati dei test e delle caratterizzazioni eseguite, raggruppati campione per campione e confrontandoli con i precedenti.

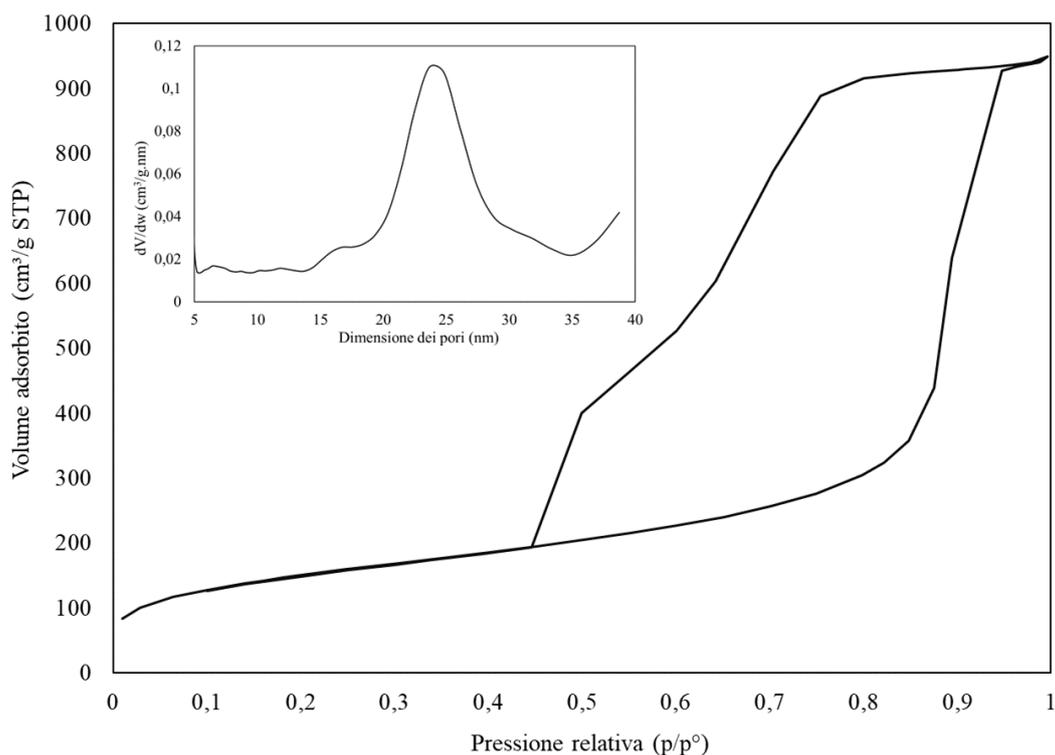
### 4.1 Caratterizzazione del campione SSM

Le immagini raccolte dalla microscopia FESEM sono riportate nella figura 4.1; le particelle di silice mesoporosa ottenute dalla sintesi appaiono di forma sferica. Valutando diversi ingrandimenti, è possibile notare che la dimensione delle particelle non è uniforme, ma varia tra i valori di 1 e 5  $\mu\text{m}$ , in accordo con i risultati osservati dall'articolo preso come riferimento per il processo di sintesi [1].



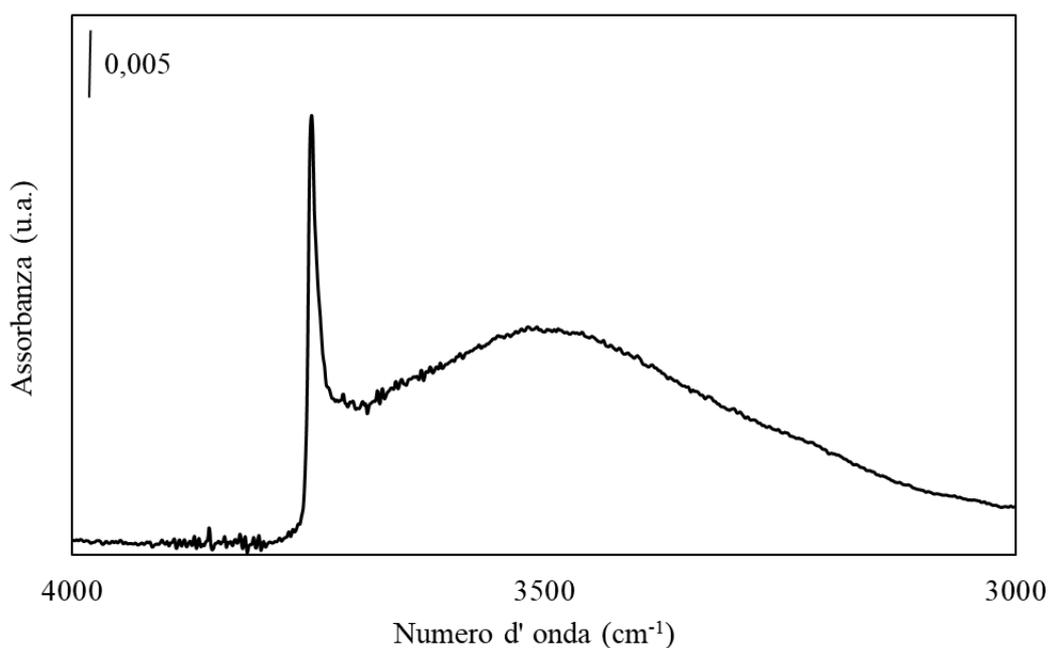
**Figura 4.1:** Immagini FESEM delle SSM a diversi ingrandimenti: ingrandimento 10000 X con scala a 5  $\mu\text{m}$  in alto a destra, ingrandimento a 1000 X con scala a 50  $\mu\text{m}$  nel resto dell'immagine.

Per quanto riguarda l'analisi di fisisorbimento di azoto, le isoterme di adsorbimento e desorbimento sono riportate nella figura 4.2, nella pagina seguente. Secondo la classificazione IUPAC, è possibile notare un'isoterma di tipo IV(a) con un coppia di isteresi di tipo H5, che indicano un materiale caratterizzato da una struttura mesoporosa disordinata e non omogenea, con pori liberi e pori parzialmente ostruiti [57]. È inoltre stata misurata la superficie specifica, mediante il modello BET, pari a circa 541  $\text{m}^2/\text{g}$ , e il volume poroso, pari a circa 1,44  $\text{cm}^3/\text{g}$ . Per quanto riguarda la distribuzione dei pori, ricavata mediante il modello DFT (figura 4.2, inset), è possibile osservare una distribuzione unimodale, con un unico picco intorno al valore di 24 nm, confermando la presenza di pori abbastanza grandi, coerentemente con i risultati presenti nel lavoro preso come modello per il processo di sintesi [1].



**Figura 4.2:** Isotherma di adsorbimento-desorbimento di azoto e distribuzione dei pori (inset) di SSM.

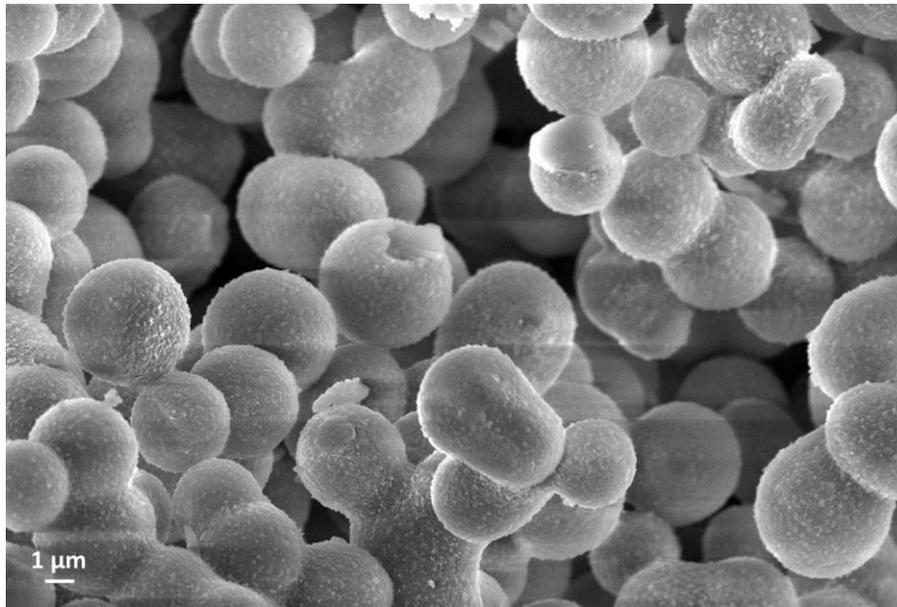
Lo spettro FT-IR del campione SSM è riportato in figura 4.3, considerando intervallo di numeri d'onda compresi tra 4000 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ . È possibile notare un picco stretto ed intenso intorno a 3750  $\text{cm}^{-1}$ , dovuto alla vibrazione di stretching dei silanoli isolati. Inoltre, si può osservare una banda larga intorno a 3500  $\text{cm}^{-1}$  associata allo stretching dei silanoli mutuamente interagenti per legame idrogeno [58].



**Figura 4.3:** Rappresentazione dello spettro derivante dall'analisi FT-IR del campione SSM.

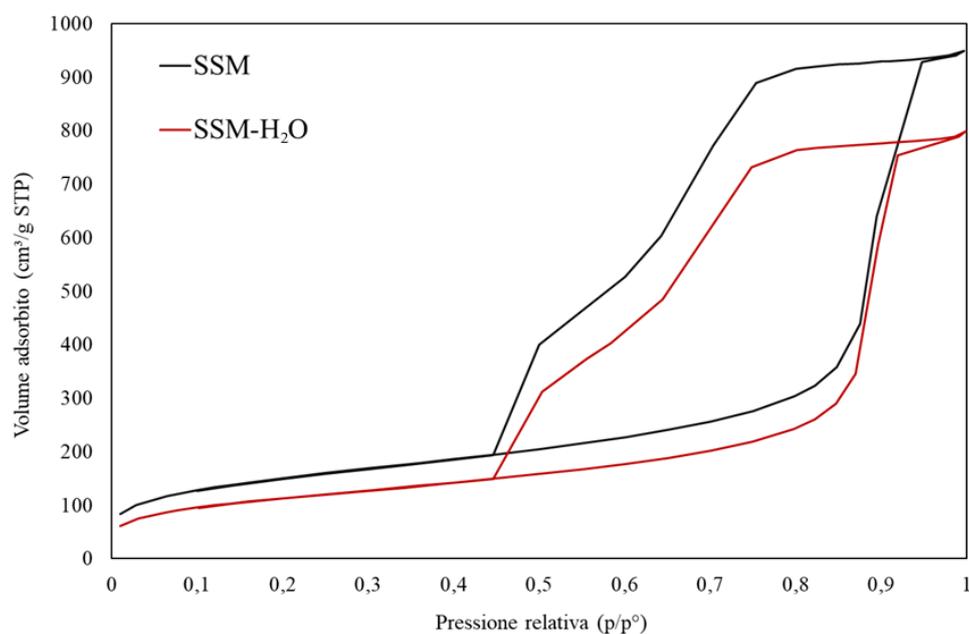
## 4.2 Caratterizzazione del campione SSM-H<sub>2</sub>O e confronto con SSM

Dalle immagini derivanti dalla microscopia FESEM, in figura 4.4, del campione di silice trattato con acqua (SSM-H<sub>2</sub>O), è possibile notare una morfologia molto simile a quella osservata per il campione di silice non trattate con acqua (SSM). Anche il campione SSM-H<sub>2</sub>O presenta particelle per lo più sferiche e regolari. Questo risultato suggerisce che il trattamento con acqua non ha influito sulla morfologia del campione SSM-H<sub>2</sub>O.



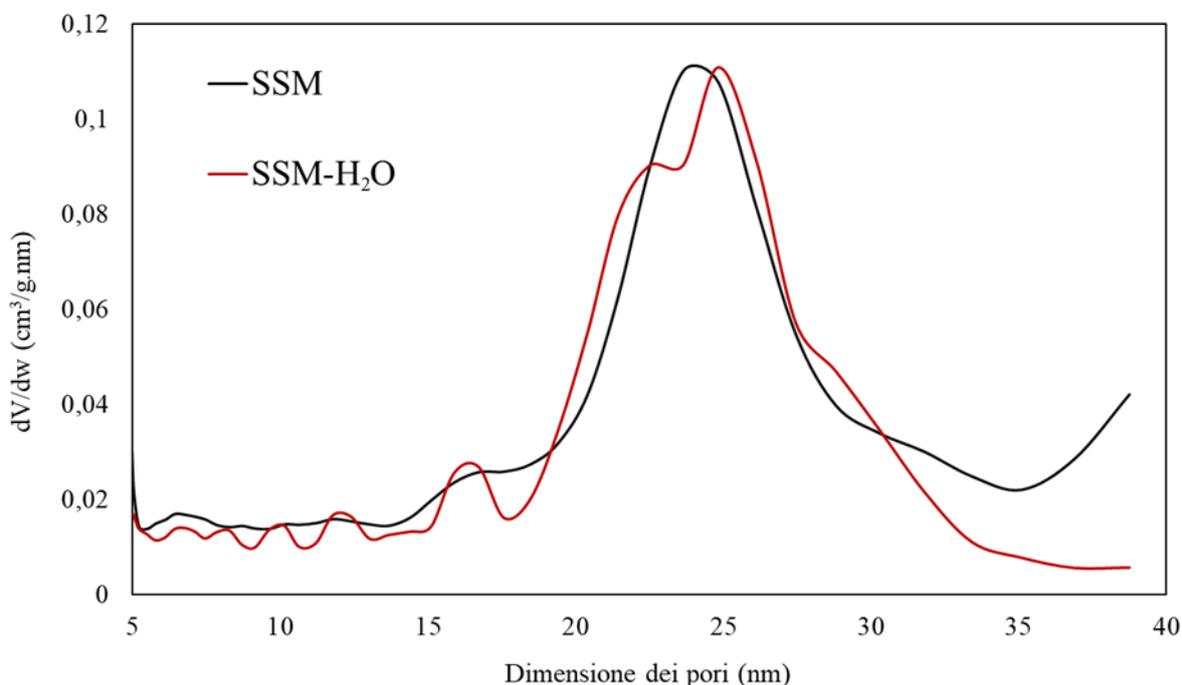
**Figura 4.4:** Immagini FESEM di SSM-H<sub>2</sub>O, con ingrandimento di 10000x e scala impostata a 1 μm.

Per quanto riguarda invece le isoterme di adsorbimento e desorbimento di azoto dei campioni SSM e SSM-H<sub>2</sub>O (figura 4.5), non si osservano cambiamenti rilevanti in seguito al trattamento con acqua. Considerando l'isoterma del campione SSM-H<sub>2</sub>O (figura 4.5, in rosso), si può notare che si tratta anche in questo caso di un'isoterma di tipo IV, con un cappio di isteresi di tipo H5.



**Figura 4.5:** Isotherme di adsorbimento-desorbimento di azoto di SSM e SSM-H<sub>2</sub>O.

Per quanto riguarda la distribuzione dei pori (figura 4.6), si può osservare una lieve differenza tra i due campioni. Infatti, la distribuzione dei pori del campione SSM-H<sub>2</sub>O (figura 4.6, in rosso) è più disomogenea, e presenta due popolazioni di pori, con diametro medio pari rispettivamente a 23 e 25 nm.



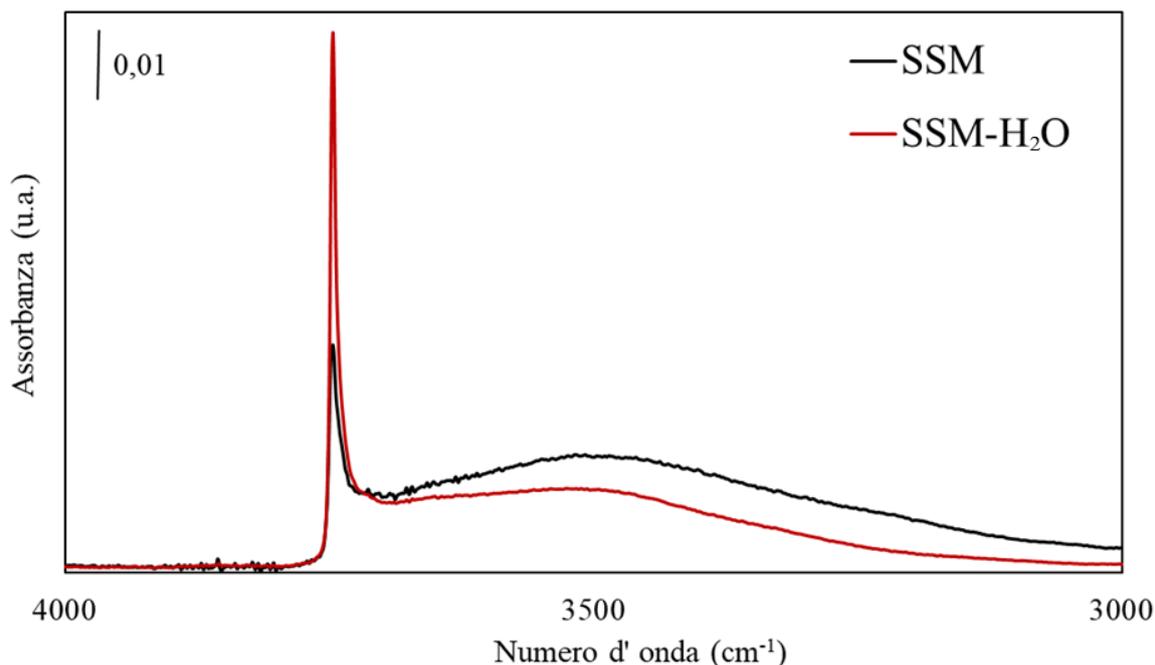
**Figura 4.6:** Distribuzione della dimensione dei pori di SSM e SSM-H<sub>2</sub>O.

Infine, confrontando i valori misurati di area superficiale specifica ( $SSA_{BET}$ ) e volume poroso ( $V_P$ ), riportati nella tabella 4.1, si può osservare una diminuzione nei valori del campione SSM-H<sub>2</sub>O rispetto a SSM. Questa variazione può essere dovuta al secondo processo di calcinazione subito dal campione SSM-H<sub>2</sub>O, che può aver causato un'ulteriore condensazione dei gruppi silanoli e una possibile contrazione della struttura.

**Tabella 4.1:** Valori di area superficiale specifica ( $SSA_{BET}$ ) e volume poroso ( $V_P$ ) di SSM e SSM-H<sub>2</sub>O.

Campione	$SSA_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	$V_P$ (cm <sup>3</sup> /g)
SSM	541	1,44
SSM-H <sub>2</sub> O	410	1,17

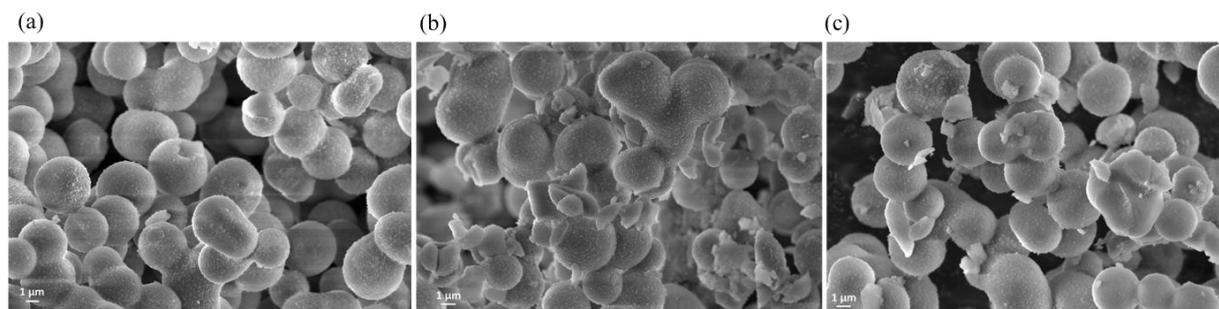
Gli spettri FT-IR dei campioni SSM e SSM-H<sub>2</sub>O sono riportati in figura 4.7, nella pagina seguente. Considerando lo spettro relativo al campione SSM-H<sub>2</sub>O, si può osservare una diminuzione nell'intensità della banda intorno a 3500 cm<sup>-1</sup>, associata ai silanoli interagenti per legame idrogeno. Tale riduzione può essere associata alla condensazione dei silanoli interagenti, che generalmente avviene tra i 200 °C e i 400 °C, in seguito al secondo processo di calcinazione [59].



**Figura 4.7:** Spettro FT-IR relativo ai campioni SSM e SSM-H<sub>2</sub>O.

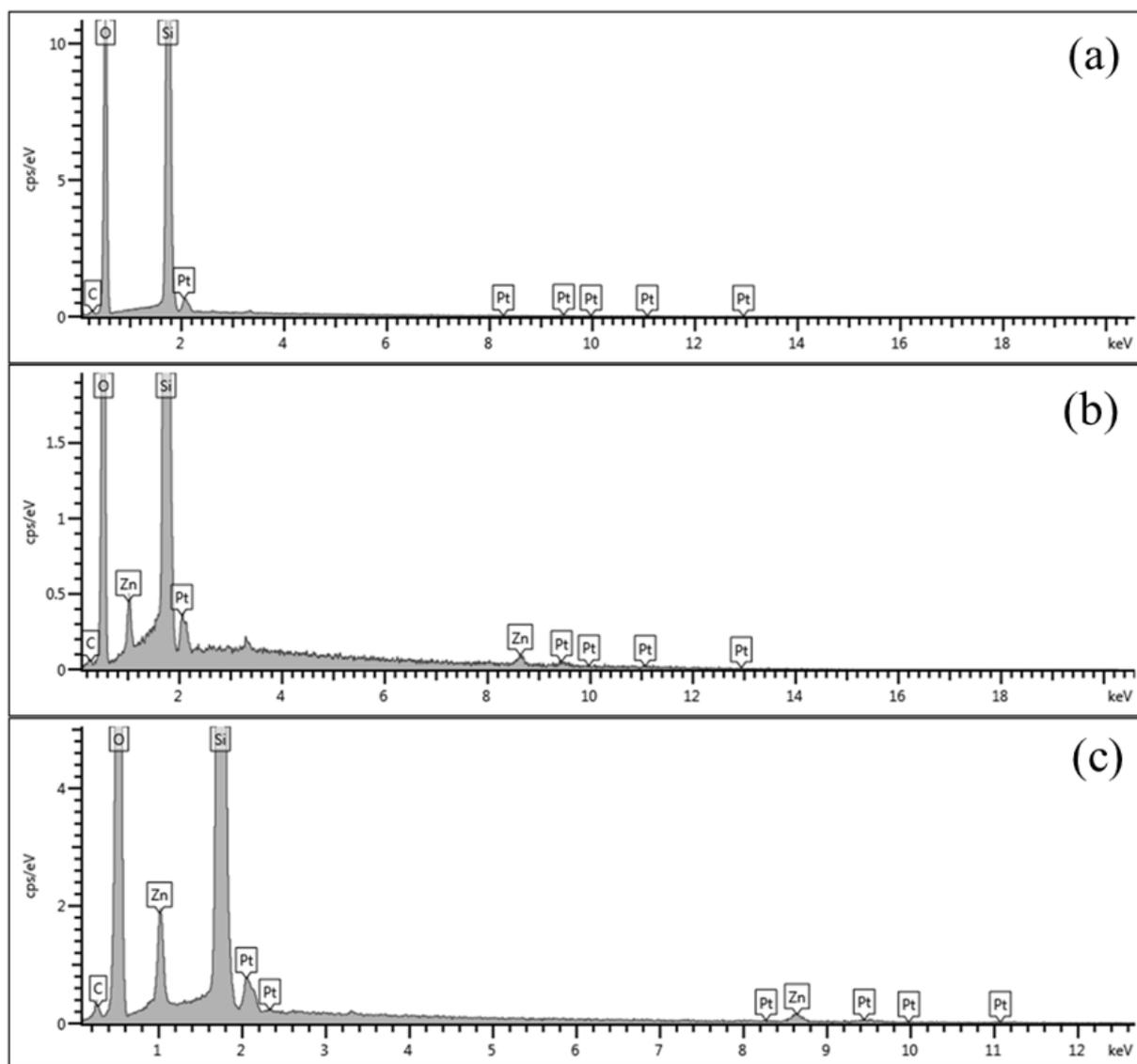
#### 4.3 Caratterizzazione dei campioni funzionalizzati Zn5%@SSM e Zn10%@SSM

Nella figura 4.8 sono riportate le immagini derivanti dalla microscopia FESEM dei campioni funzionalizzati con ioni zinco, ossia Zn5%@SSM (b) e Zn10%@SSM (c), confrontati con il precedente campione SSM-H<sub>2</sub>O, trattato solo con acqua (a). Analizzando le immagini FESEM relative ai campioni funzionalizzati (Zn5%@SSM e Zn10%@SSM), si può notare che essi sono caratterizzati sia da particelle di forma e dimensione simili a quelle osservate nel caso del campione SSM-H<sub>2</sub>O, sia da particelle più piccole e di forma più irregolare.



**Figura 4.8** Immagini FESEM dei campioni SSM-H<sub>2</sub>O (a), Zn5%@SSM (b) e Zn10%@SSM (c).

Per questi campioni, è stata anche effettuata l'analisi EDX, illustrati nella figura 4.9, alla pagina seguente. Dagli spettri EDX risulta che, oltre ad alcuni picchi minori dovuti alla presenza di platino, usato per la metallizzazione, sono ben evidenti i picchi del silicio, dell'ossigeno e dello zinco nei campioni funzionalizzati (Zn5%@SSM e Zn10%@SSM), confermando la corretta riuscita del processo. Inoltre, dalle analisi semi-quantitative, riportate nella in tabella 4.2 alla pagina seguente, si può osservare come la quantità di zinco rilevata dalle analisi non sia uguale a quella nominale, ma circa alla metà. Questo è da ascrivere, almeno parzialmente, all'errore intrinseco nel calcolo del contenuto nominale partendo dalla massa molare del sale anidro.

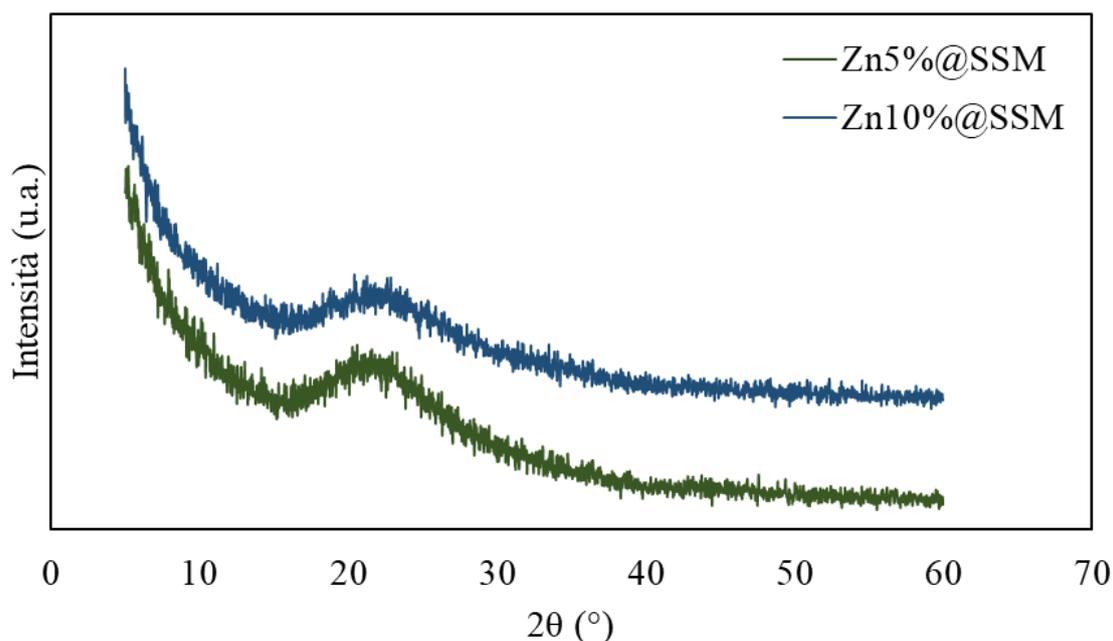


**Figura 4.9:** Spettri EDX di SSM-H<sub>2</sub>O (a), Zn5%@SSM (b) e Zn10%@SSM (c).

**Tabella 4.2:** Risultati analisi quantitative EDX.

Campione	Elemento (percentuale in massa)			
	C	O	Si	Zn
SSM-H <sub>2</sub> O	3,71	59,85	36,44	0
Zn5%@SSM	1,87	45,86	50,01	2,26
Zn10%@SSM	5,62	56,09	32,52	5,77

I risultati dell'analisi XRD dei due campioni Zn5%@SSM e Zn10%@SSM, eseguita su alti angoli (compresi 5° e 60°), sono riportati in figura 4.10, nella pagina seguente. È possibile notare l'assenza, in entrambe le curve, di qualsiasi picco attribuibile ad eventuali specie cristalline, in particolare all'ossido di zinco. Viene mostrato solo l'alone delle silici in entrambi i campioni, e ciò conferma la natura completamente amorfa dei campioni sintetizzati.



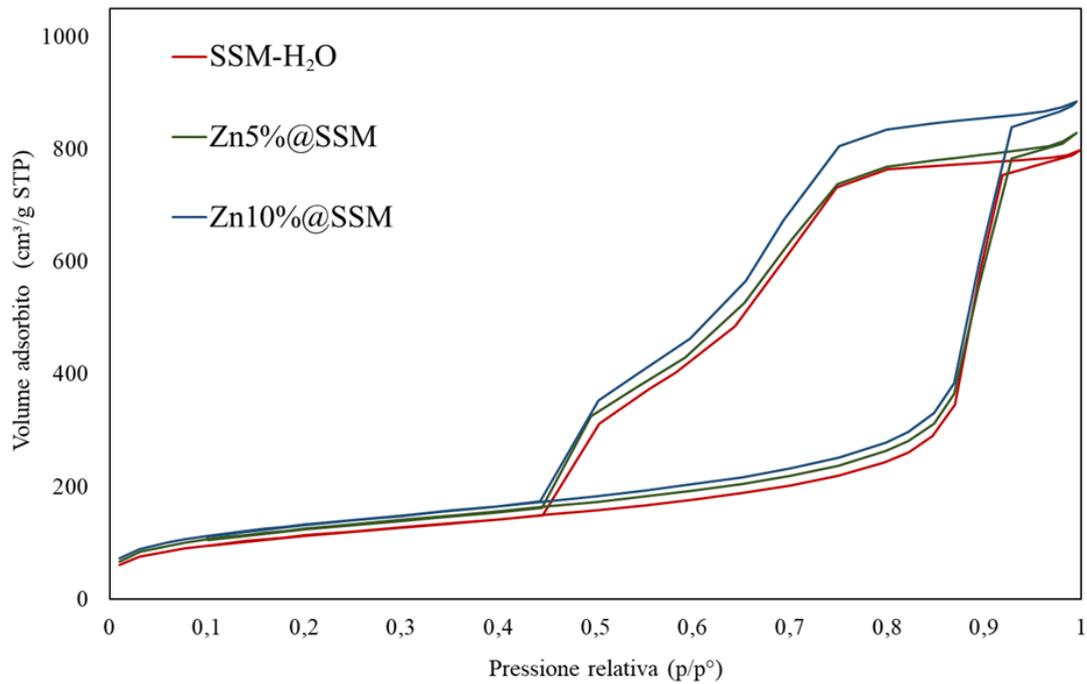
**Figura 4.10:** Spettri XRD di Zn5%@SSM e Zn10%@SSM.

Per quanto riguarda i risultati derivanti dall'analisi di fisisorbimento di azoto dei campioni Zn5%@SSM e Zn10%@SSM, essi sono riportati nella figura 4.11, nella pagina successiva. Anche qui, le forme dell'isoterma e del coppia di isteresi non sono cambiate rispetto al campione SSM-H<sub>2</sub>O. Ciò suggerisce un materiale mesoporoso con una porosità simile a quelle della silice trattata con acqua. Tuttavia, è possibile notare un aumento dell'area superficiale specifica delle silici contenenti zinco (Zn5%@SSM e Zn10%@SSM) rispetto al campione SSM-H<sub>2</sub>O. L'aumento dell'area superficiale specifica può essere dovuto alla presenza di particelle di minori dimensioni nei campioni funzionalizzati, come osservato dalle immagini derivanti dal FESEM, come illustrato in precedenza nelle figure 4.8 (b) e 4.8 (c).

I valori di area superficiale specifica e volume poroso relativi ai vari campioni caratterizzati, sono riassunti nella tabella 4.3.

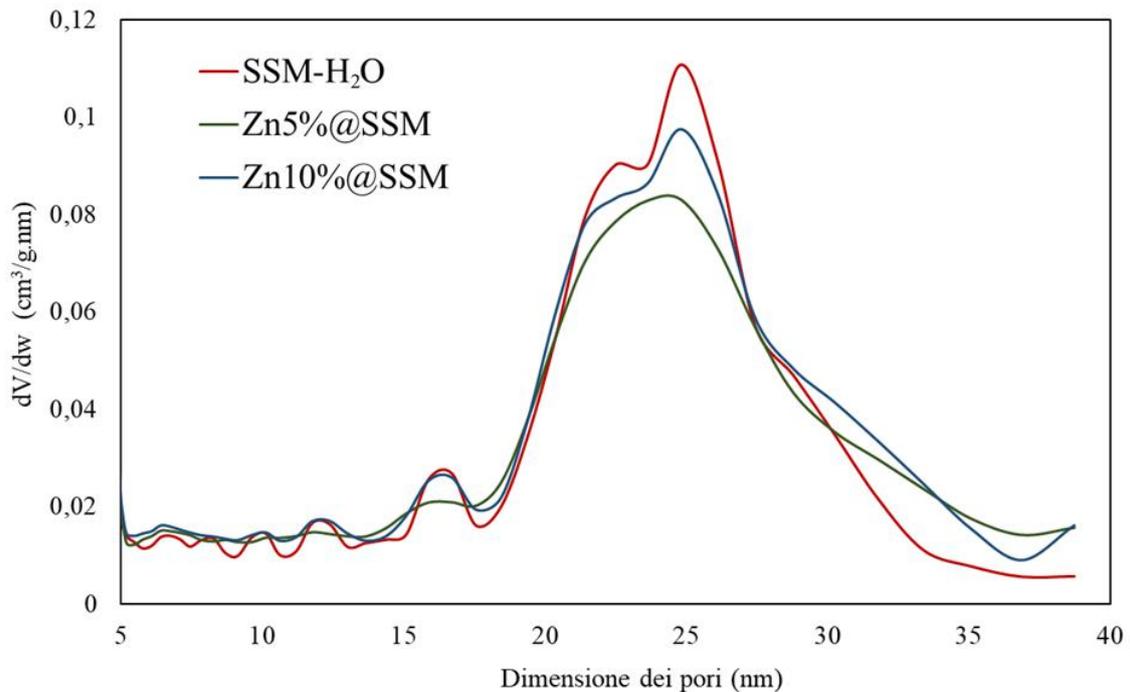
**Tabella 4.3** Valori di area superficiale specifica ( $SSA_{BET}$ ) e volume poroso ( $V_P$ ) dei campioni SSM-H<sub>2</sub>O, Zn5%@SSM e Zn10%@SSM.

Campione	$SSA_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	$V_P$ (cm <sup>3</sup> /g)
SSM-H <sub>2</sub> O	410	1,17
Zn5%@SSM	451	1,21
Zn10%@SSM	477	1,30



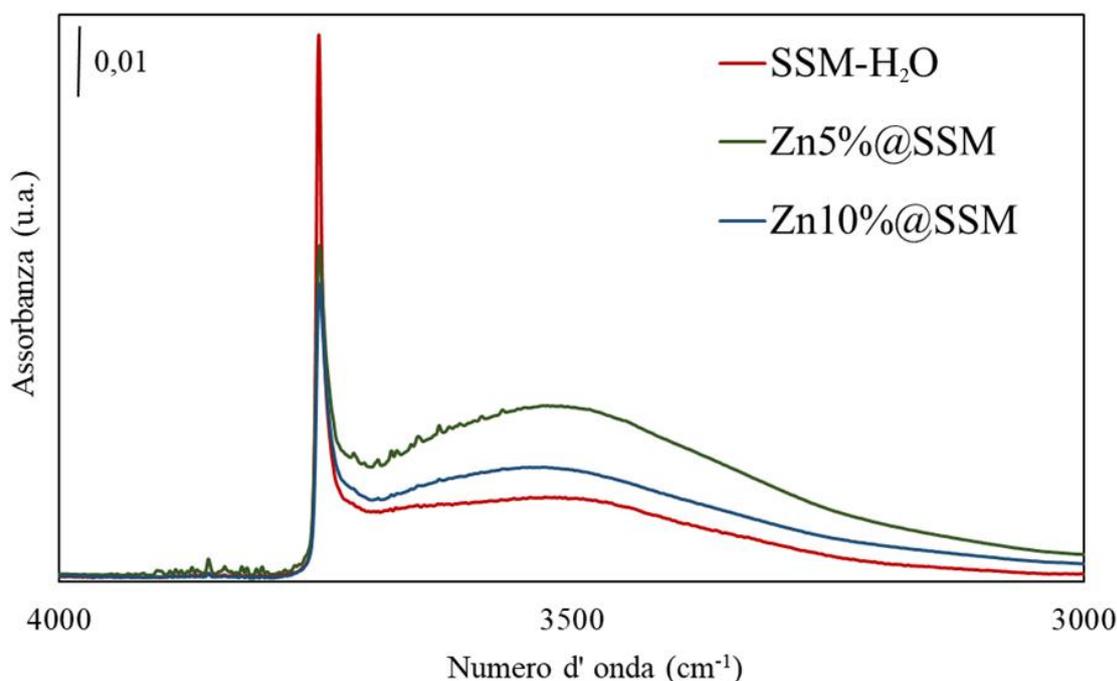
**Figura 4.11:** Isotherme di adsorbimento-desorbimento di azoto dei campioni SSM-H<sub>2</sub>O, Zn5%@SSM e Zn10%@SSM.

Per quanto riguarda la dimensione dei pori, come si può notare nella figura 4.12, anche in questo caso è possibile osservare una distribuzione poco omogenea dei pori anche nei campioni funzionalizzati con zinco. Sono presenti anche qui due popolazioni, con picchi intorno alle dimensioni di 23 e 25 nm, più marcati nel grafico relativo al campione Zn10%@SSM rispetto al campione Zn5%@SSM.



**Figura 4.12:** Distribuzione dei pori di SSM-H<sub>2</sub>O, Zn5%@SSM e Zn10%@SSM.

Dai risultati dell'analisi FT-IR dei campioni funzionalizzati, illustrati in figura 4.13, è possibile notare una diminuzione graduale del picco intorno a  $3750\text{ cm}^{-1}$  relativo ai silanoli isolati, con l'aumentare della quantità di zinco. La riduzione dell'intensità del picco può essere dovuta al consumo dei silanoli a seguito della reazione con gli ioni zinco, con conseguente formazione di specie Si-O-Zn-O-Si [4]. Inoltre, si può osservare un aumento della banda intorno a  $3500\text{ cm}^{-1}$  relativa ai silanoli interagenti nei campioni contenenti zinco. Questo può essere dovuto al fatto che la soluzione usata per il processo di funzionalizzazione presenti un pH acido, il che comporta un aumento del numero di ossidrili interagenti delle silici risultanti [60].



**Figura 4.13:** Spettri FT-IR di SSM-H<sub>2</sub>O, Zn5%@SSM e Zn10%@SSM

Infine, è possibile valutare i risultati forniti dalle analisi XPS relativi ai campioni SSM-H<sub>2</sub>O, Zn5%@SSM e Zn10%@SSM. Essi sono riassunti rispettivamente nelle figure 4.14, 4.15 e 4.16, nelle pagine seguenti. Per tutti e tre i campioni, è stata effettuata un'analisi superficiale (survey) e un ingrandimento del picco dell'ossigeno, per poterne osservare più nel dettaglio la sua forma. Per i campioni di silice funzionalizzati (Zn5%@SSM e Zn10%@SSM), è stato effettuato un ulteriore ingrandimento anche sul picco dello zinco, per le medesime ragioni.

Partendo dalle analisi delle superficie dei vari campioni, si può notare che lo spettro relativo al campione SSM-H<sub>2</sub>O, in figura 4.14 (a), presenta due picchi, relativi all'ossigeno e al silicio. Invece, gli spettri relativi ai campioni funzionalizzati, nelle figure 4.15 (a) e 4.16 (a), presentano, oltre ai due picchi associati all'ossigeno e al silicio, un terzo picco relativo allo zinco, confermandone la sua presenza.

Considerando il dettaglio relativo al segnale O1s, è possibile notare che si tratta di picchi simmetrici in tutti e tre i campioni analizzati, centrati rispettivamente nel valore di 532,7 eV, per quanto riguarda i campioni SSM-H<sub>2</sub>O e Zn5%@SSM, rispettivamente riportati nelle figure 4.14 (b) e 4.15 (b), e di 533 eV nel caso del campione Zn10%@SSM, nella figura 4.16 (b). Questo risultato indica che l'ossigeno presente nei campioni forma legami solo con gli atomi di silicio. Infine, nei campioni funzionalizzati, si può osservare un picco centrato a 1022 eV, attribuibile all'orbitale Zn2p, come illustrato nelle figure 4.15 (c) e 4.16 (c) [49].

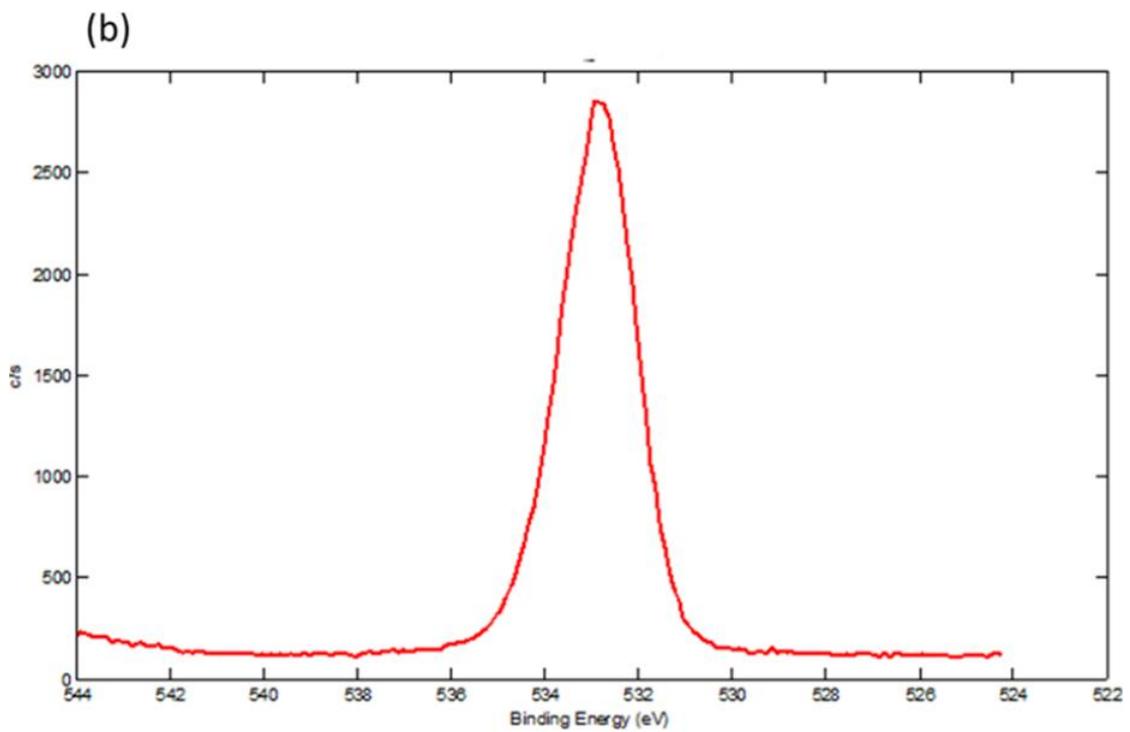
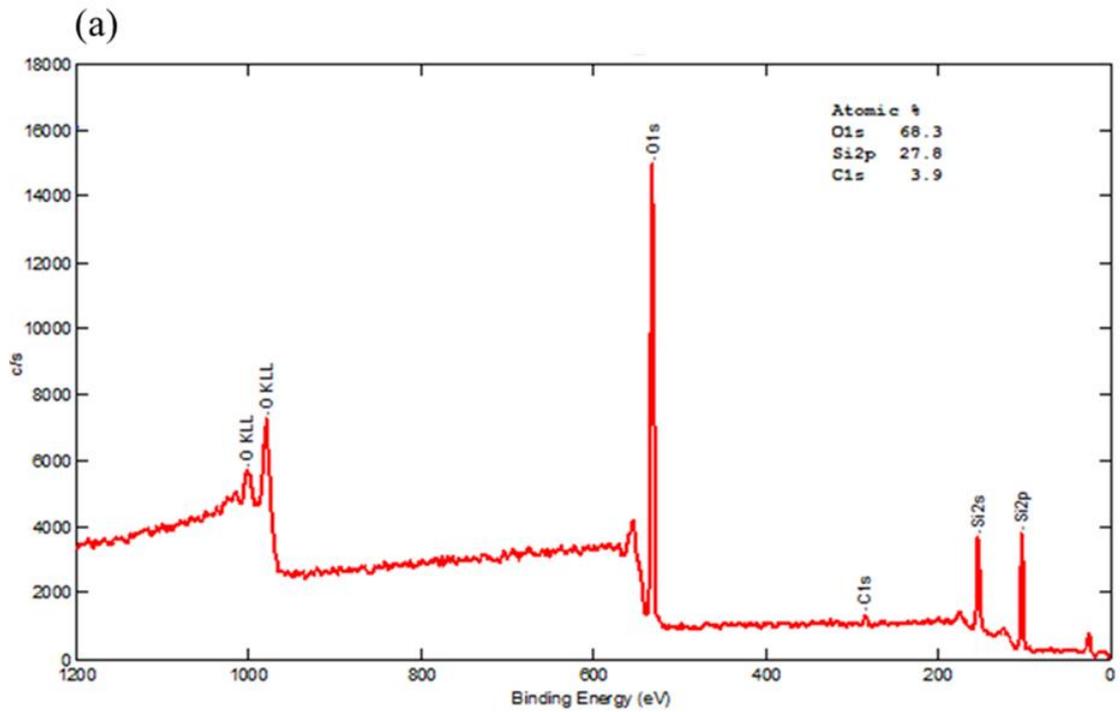
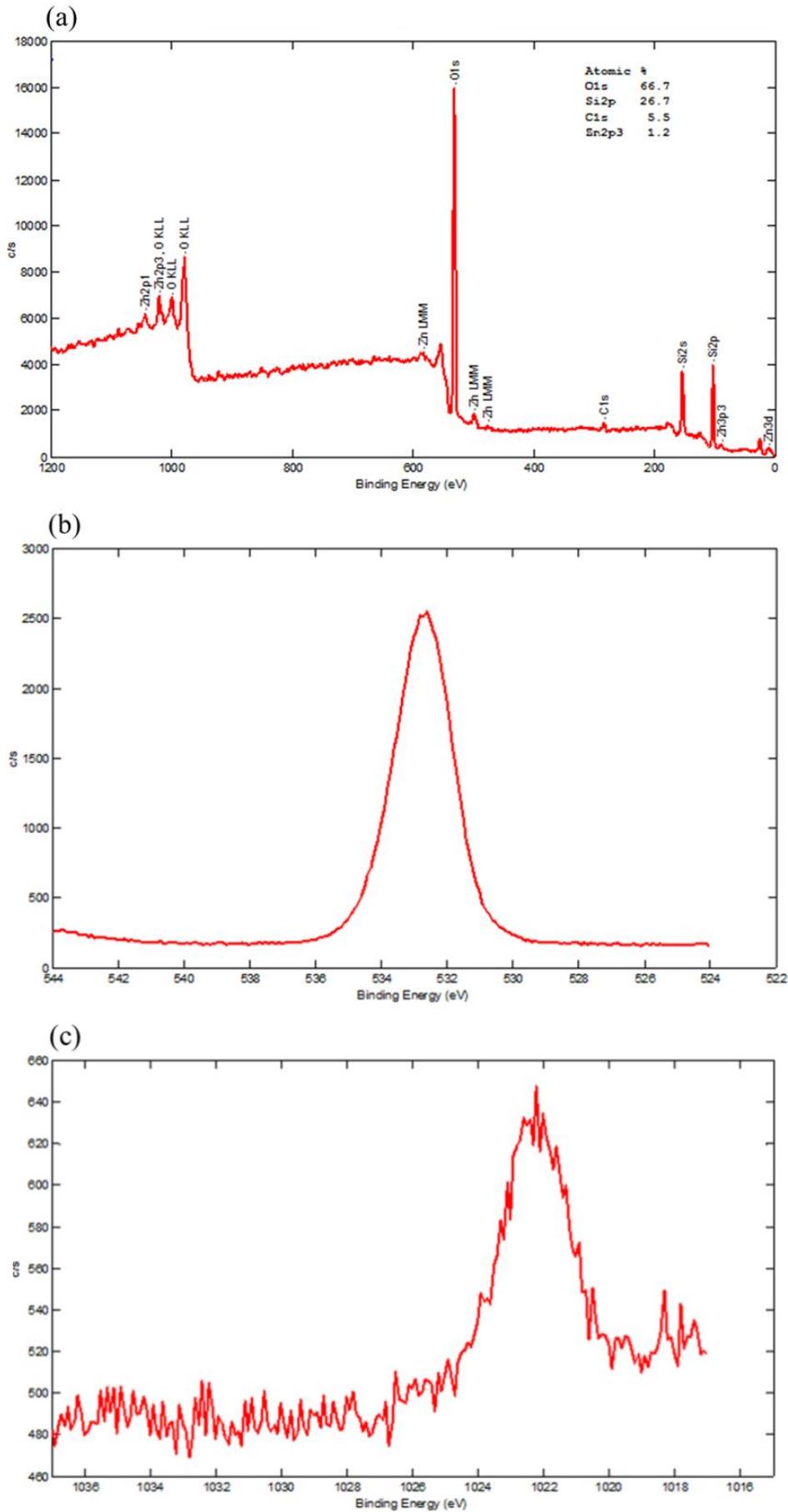
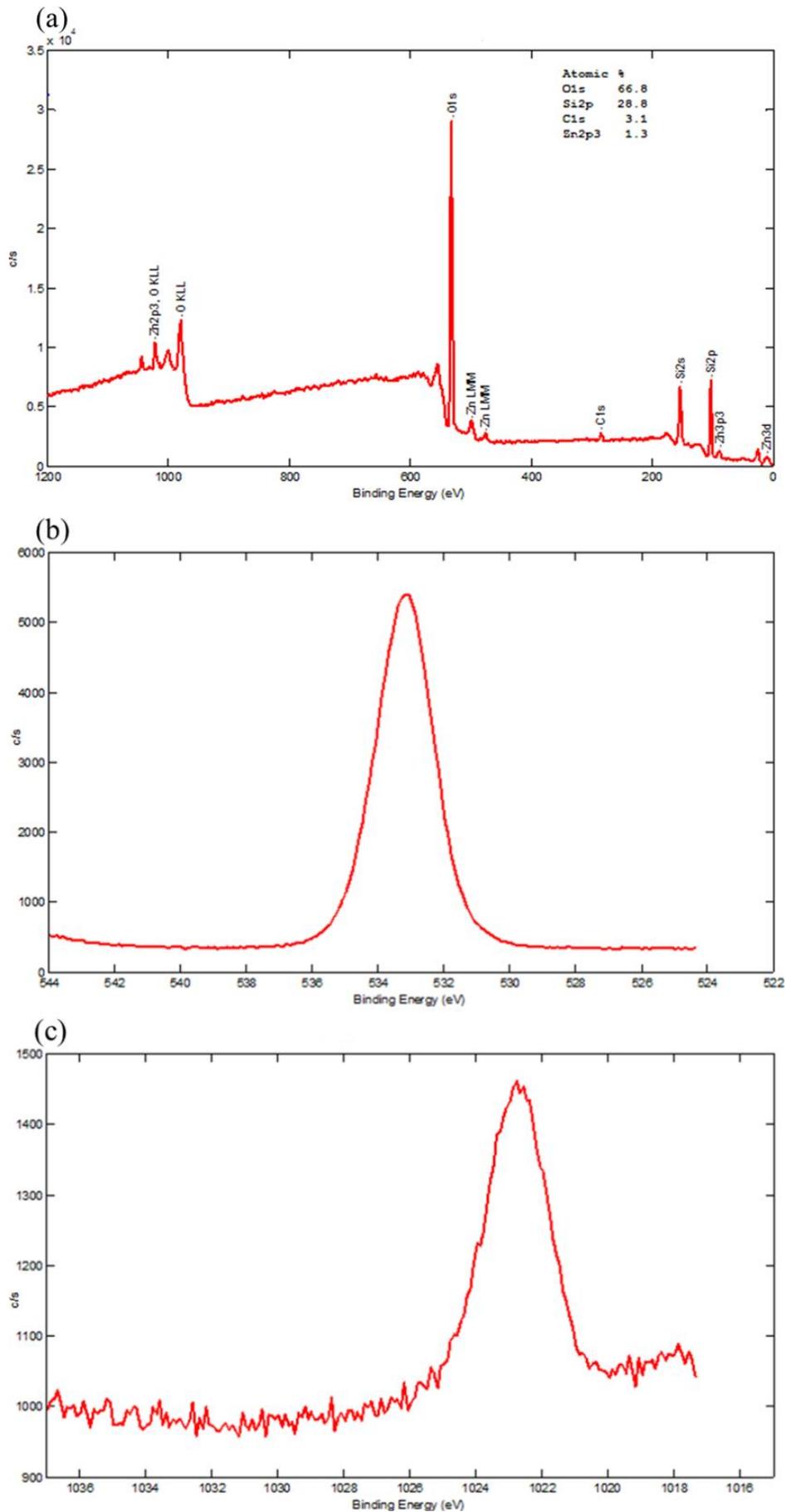


Figura 4.14. Spettro XPS di SSM-H<sub>2</sub>O (a) e ingrandimento del picco O1s (b).



**Figura 4.15.** Spettro XPS di Zn5%@SSM (a), con ingrandimenti dei picchi O1s (b) e Zn2p3 (c).

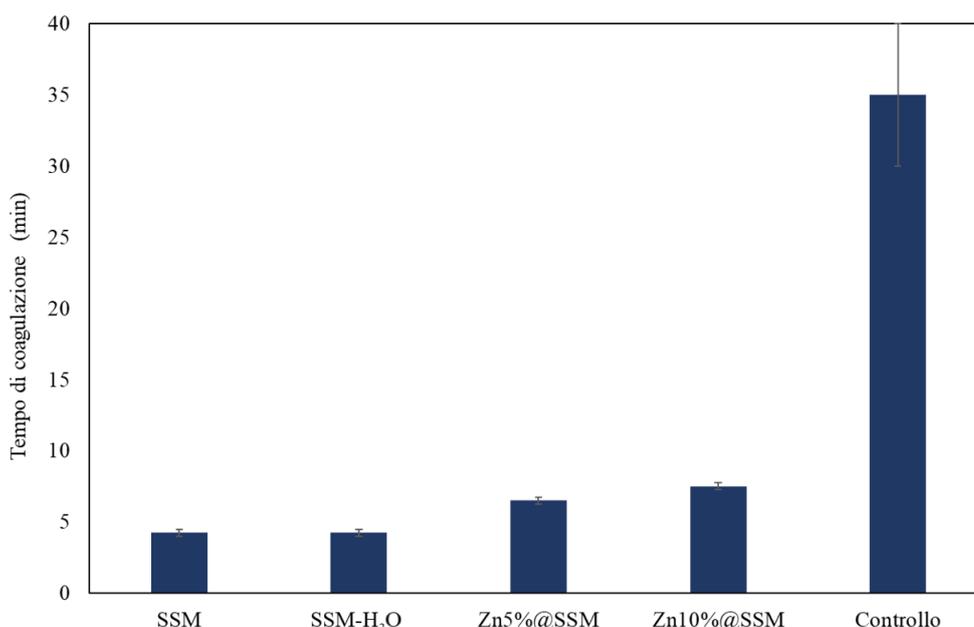


**Figura 4.16:** Spettro XPS di Zn10%@SSM (a), con ingrandimenti dei picchi O1s (b) e Zn2p3 (c).

#### 4.4 Risultati dei test emostatici

I risultati dei test emostatici sono illustrati nella figura 4.17 e riassunti nella tabella 4.4. Come si può osservare, tutti i campioni testati (SSM, SSM-H<sub>2</sub>O, Zn5%@SSM e Zn10%@SSM) hanno mostrato tempi di coagulazione inferiori rispetto al controllo (35 ± 5 minuti), ossia l'ependorf contenente solo plasma. Ciò denota una significativa influenza positiva dei materiali sintetizzati durante i processi di coagulazione, risultato coerente con i dati riportati in letteratura [2,3]. Inoltre, si può notare che i campioni che contengono ioni zinco (Zn5%@SSM e Zn10%@SSM) presentano tempi di coagulazione più alti rispetto a quelli privi di zinco (SSM e SSM-H<sub>2</sub>O), anche se comunque ben al di sotto rispetto ai tempi di coagulazione del controllo. Questo potrebbe dipendere dal fatto che la carica positiva degli ioni zinco possa aver ridotto la carica negativa superficiale delle particelle di silice. Come riportato nel primo capitolo, la presenza di cariche negative superficiali è importante per il processo di coagulazione, dato che stimola l'attivazione del fattore XII e ne velocizza il processo [2,3]. Infatti, come si può notare dai risultati dei test, all'aumentare della quantità di zinco presente, aumenta anche il tempo di coagulazione.

Tuttavia, nonostante questo incremento nei tempi di coagulazione, si può comunque confermare che questi materiali possono essere considerati buoni agenti emostatici, e che la presenza di ioni zinco non impatta in modo particolarmente negativo sulle proprietà emostatiche delle silici.



**Figura 4.17** Tempi di coagulazione dei campioni SSM, SSM-H<sub>2</sub>O, Zn5%@SSM e Zn10%@SSM.

**Tabella 4.4** Elenco dei tempi di coagulazione misurati per ogni campione durante i test emostatici.

Campione	Tempo di coagulazione (min,sec)	Miglioramento percentuale
<b>SSM</b>	4 min 15 s ± 15 s	87,86%
<b>SSM-H<sub>2</sub>O</b>	4 min 15 s ± 15 s	87,86%
<b>Zn5%@SSM</b>	6 min 30 s ± 15 s	81,43%
<b>Zn10%@SSM</b>	7 min 30 s ± 15 s	78,57%
<b>Controllo</b>	35 min ± 5 min	0



## 5. Conclusioni finali e sviluppi futuri

Negli ultimi anni, le silici mesoporose hanno destato grande interesse nell'ambito della ricerca di materiali emostatici, grazie alle loro uniche proprietà chimico-fisiche e di biocompatibilità. Infatti, queste ultime si sono dimostrate valide nel favorire la formazione di coaguli tempi rapidi senza causare effetti collaterali. Grazie alla loro elevata porosità, le silici mesoporose sono in grado di adsorbire l'acqua contenuta nel sangue e concentrare gli emocomponenti nel sito dell'emorragia. Inoltre, presentano un'alta densità superficiale di silanoli e cariche negative sulla loro superficie, che favoriscono l'attivazione del fattore XII durante la coagulazione [2,3].

Per questo motivo, in questo lavoro di tesi, si è deciso di concentrarsi sullo studio di un nuovo materiale emostatico a base di particelle di silice mesoporosa, funzionalizzato con ioni zinco, al fine di ottenere un materiale che possa coniugare le proprietà emostatiche della silice con le proprietà antibatteriche tipiche degli ioni zinco, non essendo stati trovati lavori di ricerca simili in letteratura.

A questo scopo, si è partiti dalla sintesi di particelle sferiche di silice mesoporosa con pori di grandi dimensioni ( $\approx 25$  nm), in quanto già studiate in precedenza e avendo già mostrato ottime proprietà emostatiche. Il materiale è stato sintetizzato partendo da TEOS, usato come precursore della silice, Pluronic P123 usato come agente template, e mesitilene, usato come agente rigonfiante, in ambiente acido garantito dalla presenza di acido cloridrico, seguendo la procedura portata da *Mohamed et al.* [1]. Dal processo di sintesi, si sono ottenute delle sfere di silice mesoporosa (SSM) con una dimensione variabile (compresa tra 1  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ ), come mostrato dalle immagini derivanti dall'analisi FESEM. L'analisi di fisisorbimento di azoto ha mostrato un'isoterma di tipo IV con coppia di isteresi di tipo H5, suggerendo la presenza una struttura porosa disordinata e non omogenea, con pori liberi e pori parzialmente ostruiti. La distribuzione dei pori ha confermato la presenza di pori grandi, con una dimensione media intorno ai 24 nm.

Successivamente, si è proseguito con la funzionalizzazione delle sfere di silice mesoporosa con zinco, con lo scopo di ottenere un materiale che abbia anche proprietà antibatteriche. Per la procedura di funzionalizzazione, si è usato il procedimento descritto da *Trinh et al.* [4]. Sono stati ottenuti due campioni con una quantità nominale di tale elemento pari rispettivamente a 5% e al 10% in massa (chiamati rispettivamente Zn5%@SSM e Zn10%@SSM). Inoltre, è stato preparato un altro campione, trattato solo con acqua (SSM-H<sub>2</sub>O), in modo da valutare l'effetto del solvente usato durante la funzionalizzazione sulla silice. Questo campione è stato preso in esame come riferimento per i due campioni contenenti zinco, in quanto ha subito gli stessi trattamenti (tra cui due calcinazioni, a differenza del campione SSM, che ne ha subita solo una).

Sono stati effettuati diverse caratterizzazioni sui campioni sopra citati, tra cui microscopia elettronica FESEM, spettroscopia EDX, analisi di fisisorbimento di azoto, analisi FT-IR, analisi XRD ed analisi XPS.

L'analisi FESEM dei campioni funzionalizzati con ioni zinco, ossia Zn5%@SSM e Zn10%@SSM, ha mostrato che i campioni funzionalizzati sono caratterizzati da particelle più piccole ed irregolari rispetto al campione trattato solo con acqua. Gli spettri EDX dei campioni Zn5%@SSM e Zn10%@SSM presentano, oltre ad alcuni picchi trascurabili dovuti al platino usato per la metallizzazione, i picchi del silicio, dell'ossigeno e dello zinco, confermando la corretta riuscita del processo. La presenza di ioni zinco è stata anche confermata dall'analisi XPS. L'analisi XRD ha confermato il carattere amorfo dei materiali funzionalizzati, in quanto ha evidenziato l'assenza di picchi attribuibili ad eventuali specie cristalline, in particolare

all'ossido di zinco. L'analisi di fisisorbimento di azoto dei campioni Zn5%@SSM e Zn10%@SSM ha evidenziato che la forma dell'isoterma e del coppia di isteresi non sono cambiate rispetto al campione non funzionalizzato. Tuttavia, è stato notato un aumento dell'area superficiale specifica delle silici contenenti zinco rispetto al campione SSM-H<sub>2</sub>O. Questo può essere dovuto alla presenza di particelle decisamente più piccole ed irregolari nei campioni funzionalizzati, come già osservato dalle immagini derivanti dal FESEM. Anche il volume poroso dei campioni funzionalizzati è leggermente più alto rispetto a quello di SSM-H<sub>2</sub>O.

Dai risultati derivanti dall'analisi FT-IR non sono stati rilevate tracce di altri elementi, oltre al picco dei silanoli isolati e la banda dei silanoli interagenti.

È stato effettuato un test per valutare l'attività emostatica dei campioni ottenuti, utilizzando plasma bovino. È stato effettuato anche un test sul plasma privo di silice, chiamato "controllo", usato come riferimento per gli altri campioni. I risultati del test hanno indicato una capacità coagulante da parte dei materiali sintetizzati. Infatti, è stata osservata un'accelerazione notevole nel processo, dato che si è passati dai 35 ± 5 minuti del controllo a intervalli di tempo compresi tra i 4 min 15 sec ± 15 sec e 7 min 30 sec ± 15 sec, riducendo i tempi di coagulazione di una percentuale che oscilla tra il 78,57% del campione Zn10%@SSM e l'87,86% dei campioni SSM e SSM-H<sub>2</sub>O.

In conclusione, i risultati ottenuti durante questo lavoro di tesi hanno evidenziato che i materiali sintetizzati possono essere promettenti come agenti emostatici. Tuttavia, ci sono diversi aspetti che devono essere considerati per eventuali sviluppi futuri di questo lavoro.

Innanzitutto, si potrebbe pensare di sottoporre i campioni funzionalizzati a test antibatterici appositi, in modo da testare sul campo le loro proprietà antibatteriche, e poter indirizzare gli studi successivi a seconda dell'esito di questi ultimi. Inoltre, si potrebbe pensare di aumentare la quantità di zinco all'interno delle particelle, per verificare se un maggior quantitativo di zinco possa avere un effetto positivo sull'attività antibatterica, sebbene sia stato verificato che lo zinco possa rivelarsi tossico oltre una certa quantità [4]. Inoltre, sarebbe opportuno valutare è il rilascio di ioni zinco da parte delle sfere di silice, per capire se il materiale sintetizzato sia in grado di rilasciarne.

Inoltre, potrebbe risultare utile effettuare delle misure di carica superficiale delle particelle funzionalizzate, per verificare se gli ioni zinco possano avere un'influenza sulla carica superficiale della silice, in quanto è già stato confermato che le cariche negative superficiali delle silici mesoporose favoriscano l'attivazione del fattore XII durante la coagulazione, velocizzando quindi il processo [2,3]. Infine, sarebbe utile valutare l'attività emostatica su sangue ed effettuare test di attività emolitica, per valutare se la presenza di ioni zinco possa compromettere l'emocompatibilità della silice.

## Bibliografia

- [1] S.S.Y. Mohamed, A. Gambino, M. Banchemo, S. Ronchetti, L. Manna, R. Cavalli, B. Onida, Tranexamic acid-loaded mesoporous silica microspheres as a hemostatic material, *Mater. Today Commun.* 34 (2023) 105198. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.105198>.
- [2] S. Pourshahrestani, N.A. Kadri, E. Zeimaran, M.R. Towler, Well-ordered mesoporous silica and bioactive glasses: Promise for improved hemostasis, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 31–50. <https://doi.org/10.1039/c8bm01041b>.
- [3] X.-F. Li, P. Lu, H.-R. Jia, G. Li, B. Zhu, X. Wang, F.-G. Wu, Emerging materials for hemostasis, *Coord. Chem. Rev.* 475 (2023) 214823. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214823>.
- [4] H.T. Trinh, T.K.A. Tran, S. Arora, S.M. George, J. Sheri, Z. Li, J. Yang, P. Naruphontjirakul, K. Balani, A. Karakoti, A. Vinu, Zn-Loaded SBA-1 and SBA-15 Molecular Sieves for Combined Antimicrobial and Osteogenic Activity, *Adv. Mater. Technol.* 8 (2023). <https://doi.org/10.1002/admt.202201169>.
- [5] K. Broos, H.B. Feys, S.F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke, H. Deckmyn, Platelets at work in primary hemostasis, *Blood Rev.* 25 (2011) 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2011.03.002>.
- [6] R. Narayan, U.Y. Nayak, A.M. Raichur, S. Garg, Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances, *Pharmaceutics.* 10 (2018) 1–49. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030118>.
- [7] E.D. Mohamed Isa, H. Ahmad, M.B. Abdul Rahman, M.R. Gill, Progress in Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Agents for Cancer Treatment, *Pharmaceutics.* 13 (2021) 152. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020152>.
- [8] M. Grun, I. Lauer, K.K. Unger, The Synthesis of Micrometer- and Submicrometer-Size Spheres of Ordered Mesoporous Oxide MCM-41, *Adv. Mater.* 9 (1997) 254–257.
- [9] C.E. Fowler, D. Khushalani, B. Lebeau, S. Mann, Nanoscale Materials with Mesostructured Interiors, *Adv. Mater.* 13 (2001) 649–652. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200105\)13:9<649::AID-ADMA649>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200105)13:9<649::AID-ADMA649>3.0.CO;2-G).
- [10] S. Sadasivan, C.E. Fowler, D. Khushalani, S. Mann, Nucleation of MCM-41 Nanoparticles by Internal Reorganization of Disordered and Nematic-Like Silica–Surfactant Clusters We thank the University of Bristol for the support of an ORS award to S.S., and Dr. S. A. Davis for help with electron microscopy., *Angew. Chemie Int. Ed.* 41 (2002) 2151. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020617\)41:12<2151::AID-ANIE2151>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020617)41:12<2151::AID-ANIE2151>3.0.CO;2-U).
- [11] J. Hwang, J.H. Lee, J. Chun, Facile approach for the synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles from sodium silicate, *Mater. Lett.* 283 (2021) 128765. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.128765>.
- [12] X. Lv, L. Zhang, F. Xing, H. Lin, Controlled synthesis of monodispersed mesoporous silica nanoparticles: Particle size tuning and formation mechanism investigation, *Microporous Mesoporous Mater.* 225 (2016) 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.12.024>.

- [13] C. Zhou, C. Yan, J. Zhao, H. Wang, Q. Zhou, W. Luo, Rapid synthesis of morphology-controlled mesoporous silica nanoparticles from silica fume, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 62 (2016) 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.01.031>.
- [14] T. Song, H. Zhao, Y. Hu, N. Sun, H. Zhang, Facile assembly of mesoporous silica nanoparticles with hierarchical pore structure for CO<sub>2</sub> capture, *Chinese Chem. Lett.* 30 (2019) 2347–2350. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2019.07.024>.
- [15] C. Lv, L. Xu, M. Chen, Y. Cui, X. Wen, C. Wu, B. Yang, F. Wang, Z. Miao, X. Hu, Q. Shou, Constructing highly dispersed Ni based catalysts supported on fibrous silica nanosphere for low-temperature CO<sub>2</sub> methanation, *Fuel.* 278 (2020) 118333. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118333>.
- [16] D.C. Ferreira Soares, L.M. Soares, A. Miranda de Goes, E.M. Melo, A.L. Branco de Barros, T.C. Alves Santos Bicalho, N.M. Leao, M.L. Tebaldi, Mesoporous SBA-16 silica nanoparticles as a potential vaccine adjuvant against *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microporous Mesoporous Mater.* 291 (2020) 109676. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109676>.
- [17] A. Abburi, M. Ali, P.V. Moriya, Synthesis of mesoporous silica nanoparticles from waste hexafluorosilicic acid of fertilizer industry, *J. Mater. Res. Technol.* 9 (2020) 8074–8080. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.05.055>.
- [18] D.F. Mohamad, N.S. Osman, M.K.H.M. Nazri, A.A. Mazlan, M.F. Hanafi, Y.A.M. Esa, M.I.I.M. Rafi, M.N. Zailani, N.N. Rahman, A.H.A. Rahman, N. Sapawe, Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticle from Banana Peel Ash for Removal of Phenol and Methyl Orange in Aqueous Solution, *Mater. Today Proc.* 19 (2019) 1119–1125. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.004>.
- [19] H. Li, X. Wu, B. Yang, J. Li, L. Xu, H. Liu, S. Li, J. Xu, M. Yang, M. Wei, Evaluation of biomimetically synthesized mesoporous silica nanoparticles as drug carriers: Structure, wettability, degradation, biocompatibility and brain distribution, *Mater. Sci. Eng. C.* 94 (2019) 453–464. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.053>.
- [20] L. Ding, B. Su, An electrochemistry assisted approach for fast, low-cost and gram-scale synthesis of mesoporous silica nanoparticles, *RSC Adv.* 5 (2015) 65922–65926. <https://doi.org/10.1039/C5RA13482J>.
- [21] S. Bian, K. Gao, H. Shen, X. Jiang, Y. Long, Y. Chen, Organic/inorganic hybrid mesoporous silica membrane rapidly synthesized by a microwave-assisted method and its application in enzyme adsorption and electrocatalysis, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 3267. <https://doi.org/10.1039/c3tb20169d>.
- [22] C.-G. Wu, T. Bein, Microwave synthesis of molecular sieve MCM-41, *Chem. Commun.* (1996) 925. <https://doi.org/10.1039/cc9960000925>.
- [23] S. Vetrivel, C.-T. Chen, H.-M. Kao, The ultrafast sonochemical synthesis of mesoporous silica MCM-41, *New J. Chem.* 34 (2010) 2109. <https://doi.org/10.1039/c0nj00379d>.
- [24] Y. Snoussi, S. Bastide, M. Abderrabba, M.M. Chehimi, Sonochemical synthesis of FeO@NH-mesoporous silica@Polypyrrole/Pd: A core/double shell nanocomposite for catalytic applications, *Ultrason. Sonochem.* 41 (2018) 551–561. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.021>.
- [25] H. Li, Q. Chen, A. Gao, H. Deng, J. Chen, H. Zou, T. Lin, S. Zhang, H. Zhu, A double network hydrogel dressing enhanced by catechin-loaded mesoporous silica for

- accelerating wound repair in conjunction with red-light therapy, *Eur. Polym. J.* 200 (2023) 112488. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112488>.
- [26] P. Khosravian, M. Javdani, R. Noorbakhnia, E. Moghtadaei-Khorasgani, A. Barzegar, Preparation and evaluation of chitosan skin patches containing mesoporous silica nanoparticles loaded by doxycycline on skin wound healing, *Arch. Dermatol. Res.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00403-022-02518-w>.
- [27] Z. Chen, F. Li, C. Liu, J. Guan, X. Hu, G. Du, X. Yao, J. Wu, F. Tian, Blood clot initiation by mesoporous silica nanoparticles: Dependence on pore size or particle size?, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 7146–7154. <https://doi.org/10.1039/c6tb01946c>.
- [28] S.E. Baker, A.M. Sawvel, J. Fan, Q. Shi, N. Strandwitz, G.D. Stucky, Blood clot initiation by mesocellular foams: Dependence on nanopore size and enzyme immobilization, *Langmuir.* 24 (2008) 14254–14260. <https://doi.org/10.1021/la802804z>.
- [29] H. Hong, C. Wang, Y. Yuan, X. Qu, J. Wei, Z. Lin, H. Zhou, C. Liu, Novel porous silica granules for instant hemostasis, *RSC Adv.* 6 (2016) 78930–78935. <https://doi.org/10.1039/c6ra13999j>.
- [30] X.-S. LI, Preparation and Hemostatic Properties of Mesoporous Silica-based Xerogels, *J. Inorg. Mater.* 23 (2008) 327–331. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1077.2008.00327>.
- [31] X. Wu, J. Wei, X. Lu, Y. Lv, F. Chen, Y. Zhang, C. Liu, Chemical characteristics and hemostatic performances of ordered mesoporous calcium-doped silica xerogels, *Biomed. Mater.* 5 (2010). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/3/035006>.
- [32] J. Chen, J. Ai, S. Chen, Z. Xu, J. Lin, H. Liu, Q. Chen, Synergistic enhancement of hemostatic performance of mesoporous silica by hydrocaffeic acid and chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 139 (2019) 1203–1211. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.091>.
- [33] X. Sun, Y. Fang, Z. Tang, Z. Wang, X. Liu, H. Liu, Mesoporous silica nanoparticles carried on chitosan microspheres for traumatic bleeding control, *Int. J. Biol. Macromol.* 127 (2019) 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.039>.
- [34] Z. Chen, L. Han, C. Liu, Y. Du, X. Hu, G. Du, C. Shan, K. Yang, C. Wang, M. Li, F. Li, F. Tian, A rapid hemostatic sponge based on large, mesoporous silica nanoparticles and N -alkylated chitosan, *Nanoscale.* 10 (2018) 20234–20245. <https://doi.org/10.1039/C8NR07865C>.
- [35] Y.-F. Shen, J.-H. Huang, Z.-E. Wu, K.-Y. Wang, J. Zheng, L. Cai, X.-L. Li, H. Gao, X.-Y. Jin, J.-F. Li, Cationic superabsorbent hydrogel composed of mesoporous silica as a potential haemostatic material, *Mater. Sci. Eng. C.* 111 (2020) 110841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110841>.
- [36] C. Dai, C. Liu, J. Wei, H. Hong, Q. Zhao, Molecular imprinted macroporous chitosan coated mesoporous silica xerogels for hemorrhage control, *Biomaterials.* 31 (2010) 7620–7630. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.049>.
- [37] J. Chen, W. Cheng, S. Chen, W. Xu, J. Lin, H. Liu, Q. Chen, Urushiol-functionalized mesoporous silica nanoparticles and their self-assembly into a Janus membrane as a highly efficient hemostatic material, *Nanoscale.* 10 (2018) 22818–22829. <https://doi.org/10.1039/C8NR05882B>.
- [38] W. Nie, X. Dai, D. Li, D. McCoul, G.J. Gillispie, Y. Zhang, B. Yu, C. He, One-Pot Synthesis of Silver Nanoparticle Incorporated Mesoporous Silica Granules for Hemorrhage Control and Antibacterial Treatment, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018)

- 3588–3599. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00527>.
- [39] C. Dai, Y. Yuan, C. Liu, J. Wei, H. Hong, X. Li, X. Pan, Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control, *Biomaterials*. 30 (2009) 5364–5375. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.052>.
- [40] Y. Wang, M. Yin, X. Zheng, W. Li, X. Ren, Chitosan/mesoporous silica hybrid aerogel with bactericidal properties as hemostatic material, *Eur. Polym. J.* 142 (2021) 110132. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110132>.
- [41] Q. Ding, X. Hu, Mesoporous Materials as Catalyst support for Wastewater Treatment, *Madridge J. Nanotechnol. Nanosci.* 4 (2019) 160–167. <https://doi.org/10.18689/mjnn-1000132>.
- [42] C. Wang, H. Zhou, H. Niu, X. Ma, Y. Yuan, H. Hong, C. Liu, Tannic acid-loaded mesoporous silica for rapid hemostasis and antibacterial activity, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 3318–3331. <https://doi.org/10.1039/c8bm00837j>.
- [43] D. Li, W. Nie, L. Chen, Y. Miao, X. Zhang, F. Chen, B. Yu, R. Ao, B. Yu, C. He, Fabrication of curcumin-loaded mesoporous silica incorporated polyvinyl pyrrolidone nanofibers for rapid hemostasis and antibacterial treatment, *RSC Adv.* 7 (2017) 7973–7982. <https://doi.org/10.1039/c6ra27319j>.
- [44] Y. Wei, J. Wang, S. Wu, R. Zhou, K. Zhang, Z. Zhang, J. Liu, S. Qin, J. Shi, Nanomaterial-Based Zinc Ion Interference Therapy to Combat Bacterial Infections, *Front. Immunol.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.899992>.
- [45] E. Mammadova-Bach, A. Braun, Zinc Homeostasis in Platelet-Related Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 5258. <https://doi.org/10.3390/ijms20215258>.
- [46] Priyanka, A. Kumar, Smart soft supramolecular hybrid hydrogels modulated by Zn<sup>2+</sup>/Ag NPs with unique multifunctional properties and applications, *Dalt. Trans.* 49 (2020) 15095–15108. <https://doi.org/10.1039/D0DT01886D>.
- [47] T. Vu, J. Fredenburgh, J. Weitz, Zinc: An important cofactor in haemostasis and thrombosis, *Thromb. Haemost.* 109 (2013) 421–430. <https://doi.org/10.1160/TH12-07-0465>.
- [48] E. Krakor, S. Saniternik, I. Gessner, R. Frohnhoven, M. Wilhelm, M. Drexelius, N. Tosun, I. Neundorf, S. Mathur, Hollow mesoporous silica capsules loaded with copper, silver, and zinc oxide nanoclusters for sustained antibacterial efficacy, *J. Am. Ceram. Soc.* 105 (2022) 1685–1696. <https://doi.org/10.1111/jace.18002>.
- [49] H. Wen, X. Zhou, Z. Shen, Z. Peng, H. Chen, L. Hao, H. Zhou, Synthesis of ZnO nanoparticles supported on mesoporous SBA-15 with coordination effect -assist for anti-bacterial assessment, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 181 (2019) 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.055>.
- [50] Y.-W. Wang, A. Cao, Y. Jiang, X. Zhang, J.-H. Liu, Y. Liu, H. Wang, Superior Antibacterial Activity of Zinc Oxide/Graphene Oxide Composites Originating from High Zinc Concentration Localized around Bacteria, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 2791–2798. <https://doi.org/10.1021/am4053317>.
- [51] V.Y. Borovoi, M. V. Chubik, O. V. Kaz'mina, Antibacterial Properties of Borosilicate Enamel with Nanosized Zinc Oxide Particles, *Glas. Ceram.* 80 (2023) 109–115. <https://doi.org/10.1007/s10717-023-00567-9>.
- [52] S. Hui, Q. Liu, Y. Han, L. Zhang, J. Yang, S. Jiang, H. Qian, W. Yang, ICG@ZIF-

- 8/PDA/Ag composites as chemo-photothermal antibacterial agents for efficient sterilization and enhanced wound disinfection, *J. Mater. Chem. B.* 9 (2021) 9961–9970. <https://doi.org/10.1039/D1TB02107A>.
- [53] M.B. Taye, Biomedical applications of ion-doped bioactive glass: a review, *Appl. Nanosci.* 12 (2022) 3797–3812. <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02672-7>.
- [54] B. Pietrzyk, K. Porębska, W. Jakubowski, S. Miszczak, Antibacterial Properties of Zn Doped Hydrophobic SiO<sub>2</sub> Coatings Produced by Sol-Gel Method, *Coatings.* 9 (2019) 362. <https://doi.org/10.3390/coatings9060362>.
- [55] P. Roy, R. Saha, D. Dattaray, S. Saha, T.K. Mandal, P. Srivastava, J. Chakraborty, Bioactive glass incorporated dressing matrix for rapid hemostatic action with antibacterial activity, *Mater. Chem. Phys.* 315 (2024) 128942. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2024.128942>.
- [56] M. Pan, Z. Tang, J. Tu, Z. Wang, Q. Chen, R. Xiao, H. Liu, Porous chitosan microspheres containing zinc ion for enhanced thrombosis and hemostasis, *Mater. Sci. Eng. C.* 85 (2018) 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.015>.
- [57] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051–1069. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>.
- [58] G. Socrates, Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts, 2001. <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1238>.
- [59] S. Ek, A. Root, M. Peussa, L. Niinistö, Determination of the hydroxyl group content in silica by thermogravimetry and a comparison with <sup>1</sup>H MAS NMR results, *Thermochim. Acta.* 379 (2001) 201–212. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00618-9](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00618-9).
- [60] J. Sonnefeld, The influence of an acid treatment on the surface charge density of silica gel, *Colloid Polym. Sci.* 274 (1996) 1137–1144. <https://doi.org/10.1007/BF00655684>.