

**POLITECNICO DI TORINO**

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

**Silice mesoporosa funzionalizzata con ioni  
zinc per applicazioni biomedicali**



**Relatori**

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

**Candidato**

Davide Luison

Marzo 2025



# Indice

## Acronimi

## Introduzione

<b>1. Materiali per il controllo delle emorragie</b>	<b>1</b>
1.1 Coagulazione del sangue	1
1.1.1 Emostasi primaria	1
1.1.2 Emostasi secondaria	3
1.2 Materiali emostatici	6
1.2.1 Materiali emostatici a base di polimeri naturali	6
1.2.2 Materiali emostatici a base di polimeri sintetici	7
1.2.3 Materiali emostatici inorganici	7
<b>2. Silice mesoporosa</b>	<b>11</b>
2.1 Sintesi e proprietà	11
2.2 Applicazioni biotecnologiche	19
2.3 Attività emostatica	21
2.4 Silice mesoporosa funzionalizzata per attività antibatterica	22
<b>3. Materiali e metodi</b>	<b>27</b>
3.1 Materiali	27
3.2 Sintesi della silice mesoporosa	27
3.3 Funzionalizzazione con ioni zinco	28
3.4 Caratterizzazione	29
3.4.1 Fisisorbimento di azoto	29
3.4.2 Diffrazione a raggi X (XRD)	29
3.4.3 Microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo FESEM e spettroscopia EDX	29
3.4.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	30
3.4.5 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)	30
3.5 Test emostatici	30
3.6 Rilascio ioni zinco	31
<b>4. Risultati</b>	<b>33</b>
4.1 Caratterizzazione di SM	33
4.2 Caratterizzazione di Nt-Zn X%@SM	37
4.3 Caratterizzazione di Ac-Zn X%@SM	44
4.4 Caratterizzazione di Cl-Zn X%@SM	51
4.5 Risultati dei test emostatici	59

4.6 Risultati dei test di rilascio degli ioni zinco	61
<b>5. Conclusioni</b>	<b>63</b>
<b>6. Sviluppi futuri</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>67</b>

## Acronimi

<b>Ac-Zn 5%@SM</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 5% in massa usando acetato di zinco
<b>Ac-Zn 10%@SM</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 10% in massa usando acetato di zinco
<b>ADP</b>	Adenosin difosfato
<b>Ag<sup>+</sup></b>	Ione Argento
<b>AMA</b>	Aspergillomarasmine A
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BET</b>	Modello Brauner-Emmet-Teller
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ione calcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro di calcio
<b>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn · 2H<sub>2</sub>O</b>	Acetato di zinco diidrato
<b>Cl-Zn 5%@SM</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 5% in massa usando cloruro di zinco
<b>Cl-Zn 5%@SM C</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 5% in massa usando cloruro di zinco e sottoposta a calcinazione per la rimozione degli anioni
<b>Cl-Zn 5%@SM L</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 5% in massa usando cloruro di zinco e sottoposta a lavaggio per la rimozione degli anioni
<b>Cl-Zn 10%@SM</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 10% in massa usando cloruro di zinco
<b>Cl-Zn 10%@SM C</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 10% in massa usando cloruro di zinco e sottoposta a calcinazione per la rimozione degli anioni
<b>Cl-Zn 10%@SM L</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 10% in massa usando cloruro di zinco e sottoposta a lavaggio per la rimozione degli anioni
<b>CTAB</b>	Bromuro di esadeciltrimetilammonio
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Ione rame
<b>DFT</b>	Modello Density Functional Theory
<b>DNA</b>	Acido desossiribonucleico
<b>EDTA</b>	Acido etilendiamminotetraacetico
<b>EDX</b>	Energy Dispersive X-ray Spectrometry
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Ione ferro
<b>FESEM</b>	Microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo
<b>FT-IR</b>	Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier
<b>GpIb</b>	Glicoproteina Ib
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Perossido di idrogeno
<b>ICP-MS</b>	Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>KCl</b>	Cloruro di potassio
<b>MCM-41</b>	Mobil Composition of Matter No. 41
<b>MCM-48</b>	Mobil Composition of Matter No. 48
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Solfato di magnesio
<b>NaCl</b>	Cloruro di sodio

<b>NaOH</b>	Idrossido di sodio
<b>Nt-Zn 5%@SM</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 5% in massa usando nitrato di zinco
<b>Nt-Zn 10%@SM</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 10% in massa usando nitrato di zinco
<b>Nt-Zn 15%@SM</b>	Silice mesoporosa funzionalizzata con una quantità nominale di ioni zinco pari al 15% in massa usando nitrato di zinco
<b>PCL</b>	Poli( $\epsilon$ -caprolattone)
<b>PEG</b>	Poli(etilenglicole)
<b>PEO</b>	Poli(ossido di etilene)
<b>PU</b>	Poliuretano
<b>PVA</b>	Poli(vinil alcol)
<b>ROS</b>	Specie reattive dell'ossigeno
<b>SBA-15</b>	Santa Barbara Amorphous No. 15
<b>SM</b>	Silice mesoporosa
<b>TEA</b>	Trietanolammina
<b>TEM</b>	Microscopia elettronica a trasmissione
<b>TEOS</b>	Tetraetil ortosilicato
<b>TMOS</b>	Tetrametil ortosilicato
<b>TPOS</b>	Tetrapropil ortosilicato
<b>TXA2</b>	Trombossano A2
<b>vWF</b>	Fattore di von Willebrand
<b>XRD</b>	Diffrazione a raggi X
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Ione zinco
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	Cloruro di zinco
<b>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	Nitrato di zinco esaidrato
<b>ZnO</b>	Ossido di zinco

## Introduzione

Le emorragie incontrollate derivanti da traumi o ferite possono avere conseguenze molto gravi sulla salute compromettendo le funzioni vitali dell'organismo e, nei casi peggiori, possono risultare fatali se non vengono trattate in tempi rapidi. Per affrontare questo problema, la ricerca scientifica sta sviluppando diversi materiali emostatici in grado di arrestare il sanguinamento in maniera rapida ed efficace. Un materiale emostatico ideale, però, deve anche garantire la sicurezza del paziente per impedire la presenza di effetti collaterali indesiderati e deve, inoltre, risultare economicamente sostenibile per poter essere adottato sia in ambito ospedaliero che in situazioni di emergenza [1].

Tra i possibili materiali emostatici, la silice mesoporosa ha mostrato di essere particolarmente promettente per accelerare il processo di emostasi grazie alle sue caratteristiche uniche. Questo materiale possiede infatti un'elevata area superficiale che consente l'assorbimento di una grande quantità di acqua dal sangue. L'assorbimento dell'acqua comporta l'aumento della concentrazione dei componenti presenti nel sangue come le piastrine e i fattori di coagulazione e, di conseguenza, permette di favorire la formazione dei coaguli. Inoltre, la silice mesoporosa è adatta all'impiego in applicazioni biologiche grazie alla sua buona biocompatibilità e alla sua bassa citotossicità. Il processo di sintesi consente, inoltre, di modificare facilmente alcune delle sue caratteristiche, come, ad esempio, la dimensione dei pori, andando semplicemente a variare alcuni parametri del processo [2].

Un altro aspetto interessante della silice mesoporosa è che essa può essere facilmente funzionalizzata per ottenere un materiale che possiede nuove proprietà. La funzionalizzazione permette, ad esempio, di ottenere particelle con proprietà antibatteriche. Possedere queste proprietà è fondamentale per i materiali che devono essere impiegati in applicazioni biologiche. Questo interessante obiettivo può essere raggiunto grazie alla funzionalizzazione con ioni metallici, come gli ioni zinco. Questi vengono immobilizzati sulla superficie del materiale tramite adsorbimento fisico o scambio ionico ed esplicano la loro azione inibendo gli enzimi respiratori dei batteri e generando sostanze nocive per i microrganismi [3].

In questo lavoro è stata studiata la silice mesoporosa funzionalizzata con ioni zinco per valutarne l'attività emostatica e la potenziale attività antibatterica. La silice mesoporosa di partenza è stata sintetizzata, seguendo la procedura descritta da *Mohamed et al.* [4]. Questa è stata, poi, funzionalizzata con lo zinco utilizzando il procedimento riportato da *Catillon-Mucherie et al.* [5]. La funzionalizzazione è avvenuta utilizzando tre diversi precursori: nitrato di zinco, acetato di zinco e cloruro di zinco. Per ogni precursore sono stati preparati campioni a diverse quantità nominali di zinco. Per i campioni derivanti dal cloruro di zinco sono state utilizzate due diverse tecniche per la rimozione dell'anione: una parte è stata sottoposta a calcinazione (utilizzata anche per i campioni derivanti da nitrato e acetato di zinco) e l'altra a lavaggio.

Tutti i campioni sono stati sottoposti a diverse tecniche di caratterizzazione per valutarne la morfologia, la struttura e la composizione. L'obiettivo è stato quello di valutare come il processo di funzionalizzazione possa influire sulle caratteristiche del materiale siliceo. I campioni sono stati, poi, sottoposti a test emostatici su plasma bovino per valutarne l'attività emostatica. Sono stati, infine, effettuati dei test di rilascio degli ioni zinco in una soluzione di NaCl 0,9% w/v per valutare, in via preliminare, la potenziale attività batterica.

L'obiettivo di questa tesi, dunque, è valutare se e in quale misura i materiali realizzati mantengono le proprietà emostatiche tipiche della silice mesoporosa. In particolare, si vuole valutare come l'utilizzo di un differente precursore dello zinco può influire sulle caratteristiche del materiale e con quale di questi si ottengono i risultati migliori. Per questo motivo, la tesi è suddivisa nei seguenti capitoli:

- Capitolo 1, Materiali per il controllo delle emorragie: in questo capitolo sono descritti i principali aspetti del processo di coagulazione oltre ai principali materiali impiegati come agenti emostatici.
- Capitolo 2, Silice mesoporosa: riporta i metodi di sintesi, le proprietà e le applicazioni biotecnologiche della silice mesoporosa. In particolare, sono descritte le proprietà della silice mesoporosa come agente emostatico e i metodi di funzionalizzazione con ioni zinco per ottenere materiali emostatici con proprietà antibatteriche.
- Capitolo 3, Materiali e metodi: sono presentati i materiali utilizzati, le procedure di sintesi e funzionalizzazione impiegate, oltre alle tecniche di caratterizzazione per valutare le proprietà dei campioni, i test emostatici e di rilascio utili a valutare l'attività emostatica e la potenziale attività antibatterica.
- Capitolo 4, Risultati: in questo capitolo sono presentati e discussi i risultati ottenuti dalle caratterizzazioni e dai test effettuati.
- Capitolo 5, Conclusioni: le informazioni ottenute dai risultati sono analizzate per trarre le conclusioni di questo lavoro.
- Capitolo 6, Sviluppi futuri: sono presentati i possibili sviluppi e gli approfondimenti per futuri studi sulla silice mesoporosa funzionalizzata.

# 1. Materiali per il controllo delle emorragie

La coagulazione del sangue è un processo lento e complesso che deve essere controllato in caso di emorragie per evitare seri danni all'organismo. Per questo motivo sono in fase di sviluppo dei materiali emostatici che consentano di accelerare il processo di coagulazione e fermare rapidamente l'emorragia. Inoltre è fondamentale che questi materiali siano sicuri per l'organismo [1]. Questo primo capitolo si concentrerà sui materiali utilizzati per il controllo delle emorragie. Nella prima parte verrà descritto il processo di coagulazione mentre nella seconda parte verranno presentati i materiali emostatici più utilizzati, con particolare attenzione a quelli inorganici.

## 1.1 Coagulazione del sangue

La coagulazione, detta anche emostasi, è un processo che si attiva a seguito di una lesione vascolare e che si conclude con l'arresto del sanguinamento. Il processo può essere diviso in tre fasi: l'emostasi primaria, l'emostasi secondaria e la fibrinolisi. L'emostasi primaria coinvolge le piastrine presenti nel sangue che si aggregano sul sito della lesione e formano un tappo piastrinico temporaneo. L'emostasi secondaria, detta anche cascata di coagulazione, porta alla formazione di una rete di fibrina che rafforza e stabilizza il tappo piastrinico. La fibrinolisi è l'ultima fase della coagulazione in cui la fibrina viene scomposta e il coagulo viene rimosso [6].

Nei paragrafi che seguono, verranno esaminate in dettaglio emostasi primaria e secondaria, le fasi più importanti del processo di coagulazione.

### 1.1.1 Emostasi primaria

Il processo di emostasi primaria inizia immediatamente dopo una lesione all'endotelio e si conclude con la formazione del tappo piastrinico. Il danno iniziale al vaso sanguigno provoca la vasocostrizione sul sito della lesione per comprimere i vasi sanguigni e ridurre la perdita di sangue [2]. A seguito della vasocostrizione inizia il processo di emostasi primaria. Questo processo può essere diviso in tre fasi: adesione, attivazione e aggregazione delle piastrine [7]. In Figura 1.1 è riportato uno schema del processo di emostasi primaria.

Le piastrine sono gli attori principali dell'emostasi primaria. Queste vengono rilasciate dai megacariociti del midollo osseo e possiedono dei granuli che contengono al loro interno componenti cruciali per l'emostasi. Esistono due tipi di granuli, quelli densi e quelli alfa. I granuli densi contengono sostanze come ADP, ATP, serotonina e calcio necessari per l'attivazione e l'aggregazione piastrinica. I granuli alfa contengono invece proteine adesive, fattori di crescita, fattori della coagulazione e inibitori della proteasi [8].

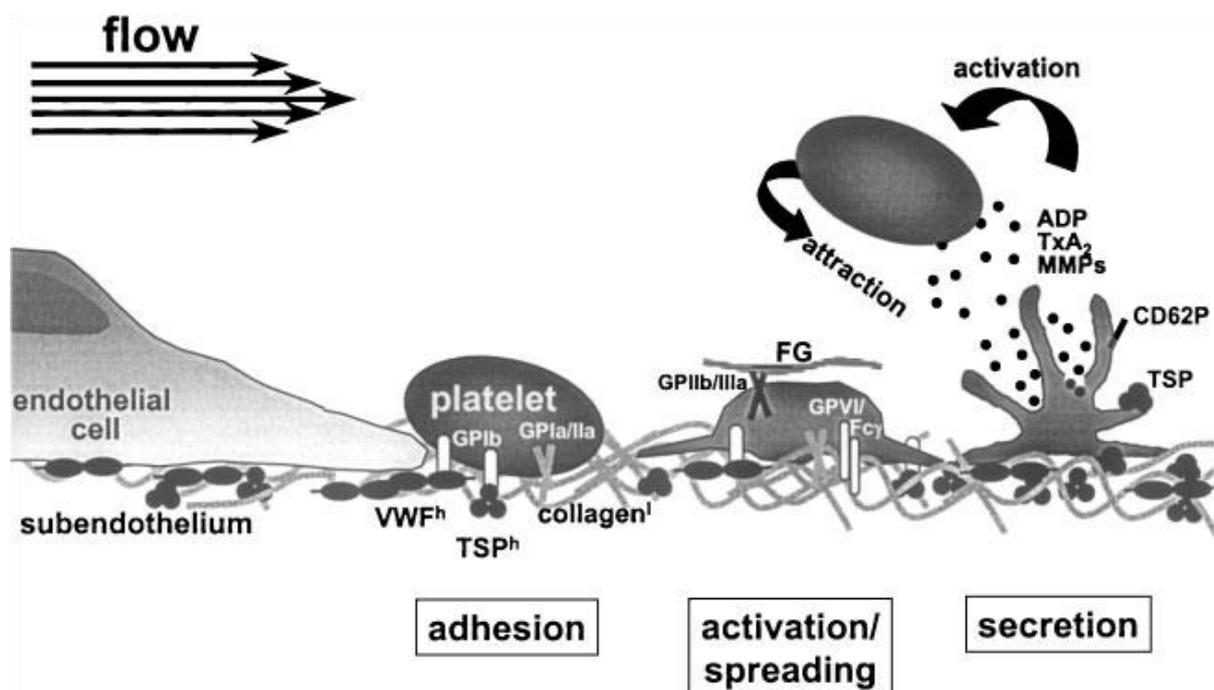
I processi coinvolti nel corso dell'emostasi primaria possono variare in base alle condizioni di flusso sanguigno locale. In generale si considerano condizioni di alto taglio quelle presenti in arterie di piccole o medie dimensioni mentre vengono dette condizioni di basso taglio quelle presenti in arterie di grandi dimensioni o vene [6].

L'adesione delle piastrine alla matrice endoteliale è la prima fase dell'emostasi primaria e inizia con il rilascio del fattore di von Willebrand (vWF) da parte delle cellule endoteliali. Il vWF è una proteina plasmatica multimerica ad alto peso molecolare che viene rilasciata a

seguito della lesione e che si lega al collagene presente nella matrice extracellulare. Questa proteina funge da substrato per l'adesione piastrinica in condizioni di alto taglio e si lega alle piastrine che si trovano nel flusso sanguigno tramite la glicoproteina Ib (GpIb) permettendo così la cattura delle piastrine. In condizioni di basso taglio, invece, le piastrine aderiscono prevalentemente al collagene [8].

A seguito dell'adesione, le piastrine iniziano il processo di attivazione. In questa fase esse subiscono un cambiamento conformazionale passando da una forma discoidale a una piatta, aumentano la loro area superficiale e formando ponti intraplastrinici. Il processo di attivazione piastrinica può essere favorito da molte sostanze tra cui calcio, trombina, collagene, ADP e trombossano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Il cambiamento di forma porta al rilascio dei granuli secretori (sia alfa che densi) delle piastrine. Tra le sostanze rilasciate sono presenti sostanze come l'ADP e il TXA<sub>2</sub>, che sono in grado di attirare sul sito di lesione ulteriori piastrine e ne inducono l'adesione e l'attivazione. L'ADP agisce da promotore dell'attivazione piastrinica in condizioni di alto taglio mentre il TXA<sub>2</sub> agisce da promotore in condizioni di basso taglio. Il promotore più potente dell'attivazione piastrinica è, però, la trombina che può agire in entrambe le condizioni di taglio [6].

Le sostanze rilasciate durante l'attivazione (in particolare ADP, TXA<sub>2</sub> e trombina) favoriscono l'aggregazione delle piastrine presenti nel flusso sanguigno che vengono attratte e accumulate sul sito della lesione e successivamente attivate. In condizioni di alto taglio, il vWF funge da mediatore dell'aggregazione piastrinica mentre in condizioni di basso taglio è il fibrinogeno ad assumere questo ruolo. L'aggregazione delle piastrine porta a completamento il tappo piastrinico. Quando il tappo formato ha colmato lo spazio tra le cellule endoteliali, queste rilasciano prostaciclina. Questa sostanza favorisce la vasodilatazione e inibisce l'aggregazione piastrinica evitando che il tappo emostatico cresca fuori controllo [6].



**Figura 1.1:** Schema illustrativo del processo di emostasi primaria [8]

### 1.1.2 Emostasi secondaria

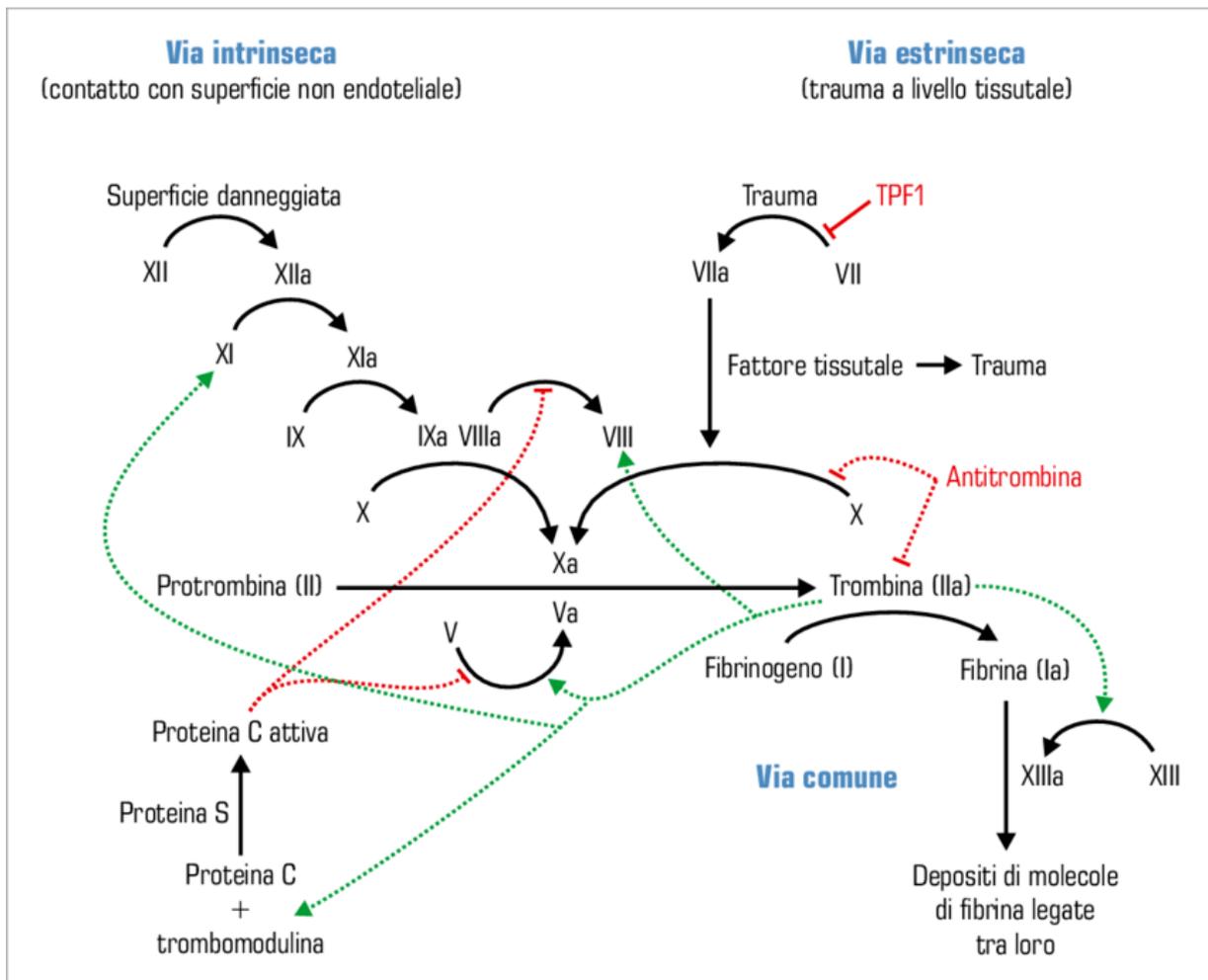
L'emostasi secondaria è un processo che permette di stabilizzare e rafforzare il tappo piastrinico formatosi durante l'emostasi primaria grazie all'attivazione della fibrina. L'emostasi secondaria viene anche chiamata cascata di coagulazione in quanto coinvolge molti fattori che vengono attivati con un effetto a cascata. Questi fattori sono detti fattori coagulanti e sono 13 in tutto. Ognuno di essi è identificato da un numero romano.

La descrizione classica della cascata di coagulazione prevede la presenza di due vie, intrinseca ed estrinseca, che vengono attivate a seguito della lesione e confluiscono in una via comune con l'attivazione del fattore X. La via comune consentirà, poi, di formare una rete di fibrina insolubile che stabilizza il tappo piastrinico [2]. In Figura 1.2 è riportato uno schema che illustra l'emostasi secondaria secondo il modello a due vie [9].

La via intrinseca, detta anche via di attivazione per contatto, viene avviata quando, a seguito della lesione, il fattore XII, una proteina plasmatica detta anche fattore di Hageman, viene in contatto con una superficie non endoteliale caricata negativamente. Il contatto permette l'attivazione del fattore XII che inizia l'effetto a cascata e porta l'attivazione in successione dei fattori XI e IX. Il fattore IX attivato forma il complesso tenasi insieme al fattore VIII attivato. Questo complesso permette l'attivazione del fattore X facendo confluire la via intrinseca in quella comune [2], [7].

La via estrinseca viene anche detta via del fattore tissutale in quanto inizia quando il fattore tissutale, un complesso proteico presente nel tessuto subendoteliale, viene esposto al sangue a causa della lesione ai vasi sanguigni. A seguito dell'esposizione, il fattore tissutale in presenza di ioni calcio ( $Ca^{2+}$ ) attiva il fattore VII. Il fattore tissutale si lega al fattore VII attivato e agli ioni calcio per attivare il fattore X [2], [7].

Con l'attivazione del fattore X, la via intrinseca e la via estrinseca si uniscono in una via comune. Il fattore X attivato forma il complesso protrombinasi legandosi con il fattore V attivato e gli ioni calcio. Questo complesso permette la conversione di protrombina in trombina. La trombina consente la conversione del fibrinogeno (solubile) in fibrina (insolubile). La fibrina grazie al fattore XIII attivato e agli ioni calcio forma lunghi filamenti che permettono di stabilizzare e rafforzare il tappo piastrinico [2].



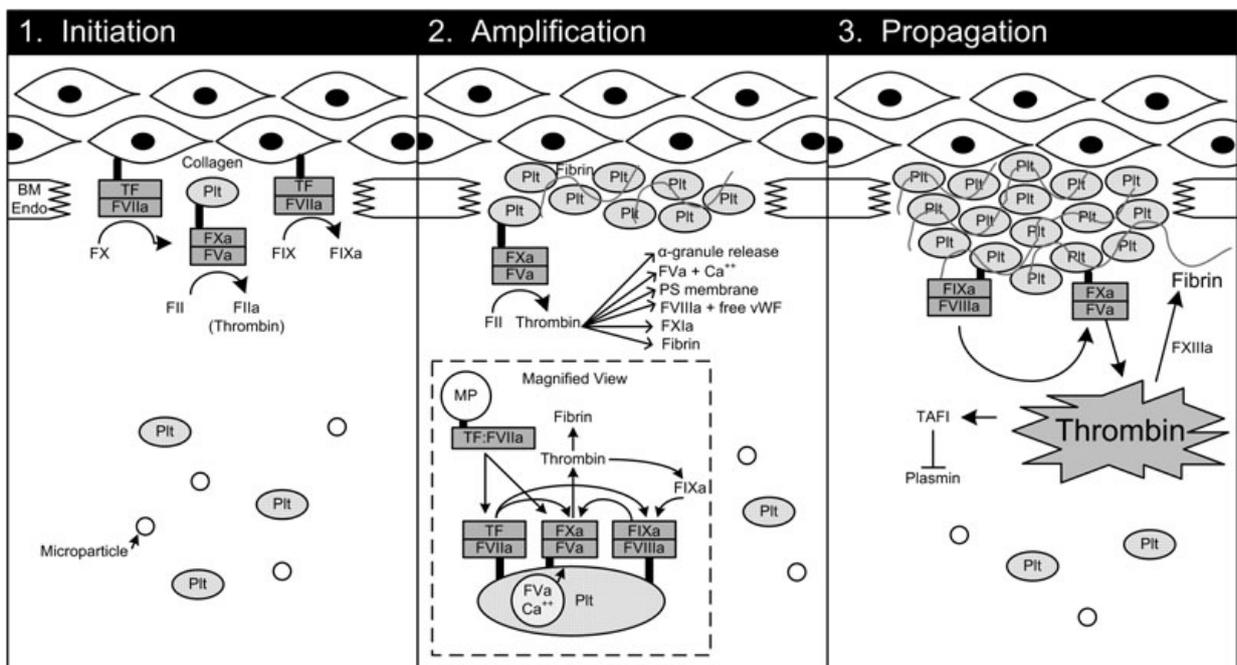
**Figura 1.2:** Schema illustrativo della cascata di coagulazione secondo il modello a due vie, intrinseca ed estrinseca [9]

Il modello delle vie intrinseca ed estrinseca si è però dimostrato imperfetto per alcune tipologie di test in vivo e si è iniziato ad adottare un nuovo metodo che evidenzia la centralità del fattore tissutale come iniziatore della coagulazione. Secondo questo modello, il fattore IX sarebbe attivato dal complesso formato da fattore tissutale e fattore VII attivato. Questo permetterebbe il collegamento tra le vie intrinseca ed estrinseca. Questo modello prevede tre fasi: iniziazione, amplificazione e propagazione [10]. In Figura 1.3 è riportato uno schema che illustra l'emostasi secondaria secondo il modello a tre fasi.

La fase di iniziazione comincia con l'esposizione del fattore tissutale al sangue a seguito di una lesione della parete dei vasi sanguigni. Il fattore tissutale forma un complesso con il fattore VII attivato sulla superficie fosfolipidica della membrana cellulare. Questo complesso attiva i fattori IX e X. L'attivazione del fattore X permette la formazione di piccole quantità di trombina [10].

Nella fase di amplificazione, le tracce di trombina generate nella fase precedente consentono l'attivazione delle piastrine e dei fattori V, VIII e XI. Quest'ultimo attiva il fattore IX che si lega al fattore VIII attivato formando il complesso tenasi che, in presenza di  $Ca^{2+}$ , permette la generazione di grandi quantità di fattore X attivato. La trombina, quindi, è in grado di attivare piastrine e fattori della coagulazione con il fine di incrementare la produzione di trombina stessa [11].

Nella fase di propagazione, il fattore X attivato forma il complesso protrombinasi con il fattore V attivato e gli ioni calcio. Questo complesso consente la produzione di una grande quantità di trombina fino a raggiungere la quantità necessaria per convertire il fibrinogeno in fibrina. La trombina consente, inoltre, l'attivazione del fattore XIII, che permette di ottenere filamenti di fibrina che formano una rete di fibrina in grado di stabilizzare il coagulo [10], [11].



**Figura 1.3:** Schema illustrativo della cascata di coagulazione secondo il modello a tre fasi [10]

## 1.2 Materiali emostatici

Il processo coagulativo è un processo molto complesso che richiede del tempo per essere completato. Nel caso di emorragie è importante riuscire a controllare il processo di emostasi per evitare di causare seri danni all'organismo. Per permettere un controllo efficace delle emorragie si stanno sviluppando dei materiali emostatici. Questi materiali devono essere efficaci nel controllo del processo di emostasi per ridurre il tempo necessario per completare la coagulazione ed arrestare l'emorragia. Questi materiali devono inoltre risultare sicuri per l'organismo per evitare effetti collaterali indesiderati. Tra i materiali emostatici più utilizzati si possono trovare i polimeri naturali, i polimeri sintetici e i materiali inorganici [1].

I materiali emostatici possono essere distinti anche in base alla forma con cui vengono preparati. La scelta della forma può dipendere da vari fattori come il materiale utilizzato, il processo di realizzazione o l'applicazione per cui verrà utilizzato il prodotto. Ogni forma possiede vantaggi e svantaggi, che devono essere valutati in base al contesto clinico. Le principali forme sono [1]:

- Nanofibre: offrono un'elevata superficie specifica e porosità, promuovono l'aggregazione piastrinica e favoriscono la rigenerazione dei tessuti. Sono prodotte tramite elettrofilatura e vengono utilizzate per ferite irregolari e profonde.
- Idrogel: composti da una rete tridimensionale in grado di assorbire l'acqua concentrando localmente piastrine e fattori di coagulazione. Aderiscono ai tessuti e sono difficili da rimuovere in caso di utilizzo su ferite profonde.
- Spugne: consentono l'assorbimento del sangue e la compressione meccanica. Vengono utilizzate in situazioni chirurgiche o per lesioni traumatiche.
- Nanoparticelle: sono utilizzate per ferite profonde o irregolari. Sono però difficili da rimuovere e possono lasciare dei residui. Possono essere caricate con agenti emostatici o antimicrobici.
- Adesivi e sigillanti: colle o film che vengono applicati direttamente sulla ferita per sigillarla rapidamente e ridurre il sanguinamento.

### 1.2.1 Materiali emostatici a base di polimeri naturali

I polimeri naturali possiedono caratteristiche molto interessanti per l'emostasi e per questo motivo c'è un forte interesse nel loro utilizzo come agenti emostatici. Essi possiedono infatti buona biocompatibilità, buona biodegradabilità e non sono tossici per l'essere umano. Questi materiali favoriscono il processo di emostasi e contribuiscono anche nel processo di rigenerazione dei tessuti. Ci sono però alcune limitazioni nell'utilizzo dei polimeri naturali come materiali emostatici dovute alle loro scarse proprietà meccaniche o alle possibili reazioni allergiche che possono provocare. Un altro svantaggio è l'alto costo di produzione. Tra i polimeri naturali impiegati come agenti emostatici ricordiamo [1]:

- Chitosano: questo polimero naturale è in grado di favorire l'aggregazione piastrinica aumentando la concentrazione cellulare di  $Ca^{2+}$ . Per migliorarne le proprietà e l'efficacia è possibile modificarlo chimicamente.
- Cellulosa: questo polimero è facilmente ricavabile in natura grazie alla sua abbondanza. La cellulosa permette di favorire il processo di emostasi assorbendo l'acqua presente nel sangue e creando una compressione meccanica sul sito di lesione. Questo

materiale presenta, però, degli svantaggi dovuti alla lenta degradazione e alle possibili reazioni infiammatorie che può generare.

- Acido ialuronico: questo materiale presenta caratteristiche interessanti per l'emostasi grazie alla sua capacità di legarsi all'acqua permettendo un aumento della concentrazione delle piastrine e dei fattori di coagulazione.
- Alginato: questo materiale è altamente assorbente ed è in grado di aumentare la concentrazione locale di calcio.
- Collagene: questo materiale consente la formazione di una rete in grado di sigillare le ferite. Il collagene è inoltre in grado di attivare le piastrine. Questo materiale possiede, però, una lenta degradazione e può causare reazioni allergiche.
- Fibrina: questo materiale intrappola le piastrine e le cellule del sangue favorendo la formazione di coaguli.

### 1.2.2 Materiali emostatici a base di polimeri sintetici

I polimeri sintetici costituiscono un'altra interessante categoria di materiali emostatici. A differenza di quelli naturali, i polimeri sintetici risultano più facili da personalizzare e da produrre. Essi presentano, inoltre, migliori proprietà meccaniche rispetto a quelli naturali. Risulta inoltre più facile modificarne le proprietà chimiche. I polimeri sintetici però presentano talvolta una scarsa bioattività anche se è possibile incrementarla combinandoli con quelli naturali. Questi materiali possono essere realizzati in diverse forme come idrogel, nanofibre, spugne e adesivi in base alle esigenze. I polimeri di sintesi più utilizzati come agenti emostatici sono [1]:

- Peptidi auto-assemblanti: questi polimeri sono in grado di formare idrogel auto-organizzati a contatto con il sangue. Promuovono il processo di aggregazione piastrinica e di riparazione delle ferite. Sono materiali molto costosi e difficili da produrre.
- Poli(etilenglicole) (PEG): polimero utilizzato per formare idrogel in grado di assorbire i liquidi aumentando la concentrazione dei fattori di coagulazione. Possiede una lenta degradazione che può causare reazioni da corpo estraneo.
- Poliuretano (PU): materiale usato sotto forma di spugne che trattengono l'umidità della ferita e ne favoriscono la guarigione. Presenta però una lenta degradazione.
- Poli(vinil alcol) (PVA): polimero utilizzato per realizzare spugne emostatiche grazie all'eccellente idrofilia e capacità di assorbimento. Questo materiale non contiene componenti pro-coagulanti.
- Poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL): polimero spesso combinato con chitosano o collagene per migliorarne l'adesione e la riparazione dei tessuti.
- Polimeri acrilici: polimeri utilizzati come adesivi tissutali in chirurgia grazie alla loro rapida adesione e forte resistenza.
- Poli(ossido di etilene) (PEO): polimero biocompatibile e non tossico che non possiede attività emostatica intrinseca. Viene usato principalmente come additivo per migliorare la lavorazione di materiali come il chitosano.

### 1.2.3 Materiali emostatici inorganici

L'utilizzo di polimeri, sia naturali che sintetici, come materiali emostatici può risultare complesso a causa dei loro difetti. Come detto precedentemente, i polimeri naturali sono

costosi da lavorare e possiedono scarse proprietà meccaniche mentre quelli sintetici possiedono una scarsa bioattività. Per questi motivi hanno incominciato a suscitare notevole interesse i materiali inorganici. Questi sono risultati molto efficienti nel promuovere il processo emostatico. I materiali inorganici possiedono, infatti, molte proprietà interessanti come la capacità di assorbire l'acqua, attivare le piastrine e favorire la cascata di coagulazione [12].

Tra i materiali inorganici più utilizzati per favorire l'emostasi è possibile trovare le zeoliti, minerali che fanno parte degli alluminosilicati. Questi possiedono una struttura cristallina microporosa che permette loro di essere degli ottimi setacci molecolari. Sono materiali che permettono di assorbire grandi quantità d'acqua, scambiare ioni con l'ambiente circostante e non hanno tossicità biologica. Queste caratteristiche li rendono adatti per le applicazioni emostatiche. L'assorbimento dell'acqua consente di concentrare i fattori di coagulazione e le piastrine per accelerare il processo di emostasi. Le zeoliti consentono anche di accelerare la via intrinseca della cascata coagulativa. Il loro inconveniente più importante è dovuto all'esotermicità del processo di assorbimento di acqua. La quantità di calore generata durante l'assorbimento è, infatti, in grado di causare ustioni ai tessuti circostanti [13]. La zeolite può, inoltre, causare reazioni da corpo estraneo [12].

Tra i materiali inorganici che è possibile utilizzare per arrestare le emorragie si possono trovare quelli a base di argilla. Questi sono in grado di attivare la via intrinseca della coagulazione grazie alla loro superficie caricata negativamente. Le argille assorbono, inoltre, in maniera rapida l'acqua dal sangue incrementando la concentrazione di piastrine e fattori della coagulazione. Due principali categorie di argille vengono utilizzate come agenti emostatici: il caolino e la smectite. Queste due categorie differiscono per la struttura, il che conferisce loro caratteristiche e prestazioni diverse. Il limite principale dovuto all'utilizzo delle argille come agenti emostatici è dovuto alla loro non biodegradabilità. L'utilizzo di argille in casi di emorragie deve prevedere, infatti, una loro rimozione manuale a seguito dell'utilizzo. Eventuali residui rimasti nella ferita potrebbero causare infiammazioni o infezioni [13].

Un altro materiale inorganico utilizzato per le sue proprietà emostatiche è il biovetro. Questo materiale è costituito da ossidi di silicio, calcio e fosforo. La sua azione emostatica avviene tramite il rilascio di ioni che favoriscono la coagulazione. Possiede un'elevata biocompatibilità ed è capace di supportare la riparazione tissutale. Viene utilizzato sotto forma di spugne o idrogel. Il difetto principale del biovetro è la sua lenta velocità di degradazione che può portare a reazioni infiammatorie e danni ai tessuti [12].

I polifosfati sono materiali inorganici che facilitano l'attivazione dei fattori della coagulazione e la stabilizzazione della rete di fibrina. I polifosfati sono, però, dei materiali molto instabili e tendono a idrolizzare facilmente. Questa caratteristica ne rende difficile l'impiego e per risolvere questo problema si stanno studiando soluzioni promettenti come quella di integrare i polifosfati in idrogel compositi [12].

I materiali a base carbonio, come il grafene e i nanotubi di carbonio, possiedono proprietà importanti per il processo coagulativo. Hanno un'alta conducibilità elettrica, possiedono proprietà antimicrobiche e favoriscono il processo di aggregazione piastrinica. Questi composti non possono, però, essere utilizzati singolarmente come materiali emostatici ma vengono utilizzati per la realizzazione di strutture composite principalmente sotto forma di spugne o idrogel [12].

Oltre ai materiali tradizionali, stanno emergendo soluzioni innovative che imitano le funzioni biologiche per migliorare il processo di emostasi, favorire la guarigione e offrire proprietà antimicrobiche. Alcuni esempi di queste innovazioni sono le nanoparticelle derivate da piastrine, i mimetici piastrinici e gli idrogel biomimetici. Queste soluzioni sono, però, fortemente limitate dagli alti costi e dalla complessità produttiva che ne limitano la diffusione [1].

Per favorire la coagulazione è possibile anche implementare l'inserimento di ioni metallici all'interno dei materiali inorganici. Questi metalli sono in grado di attivare il processo emostatico e possono inoltre possedere proprietà antimicrobiche o essere in grado di favorire la rigenerazione dei tessuti. L'utilizzo di questi metalli deve però essere controllato perché un loro utilizzo eccessivo può causare tossicità o infiammazioni locali. I principali metalli utilizzati nei materiali emostatici sono [1]:

- Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ): lo ione calcio è fondamentale nel processo di coagulazione in quanto consente l'attivazione dei fattori X e XIII.
- Argento ( $\text{Ag}^+$ ): possiede proprietà antimicrobiche, previene le infezioni e promuove la guarigione delle ferite.
- Zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ): favorisce l'adesione e l'attivazione piastrinica e possiede proprietà antimicrobiche.
- Rame ( $\text{Cu}^{2+}$ ): possiede attività antimicrobica e favorisce la rigenerazione tissutale.
- Ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ): riduce i tempi di coagulazione promuovendo la concentrazione locale dei componenti del sangue. Può effettuare anche un'efficace azione battericida anche contro alcuni batteri.

I materiali emostatici inorganici prima citati possiedono proprietà emostatiche interessanti. Tuttavia, ciascuno di loro presenta dei difetti che ne limitano l'utilizzo. Le zeoliti producono una grande quantità di calore, le argille e il biovetro sono difficili da degradare, i polifosfati sono instabili, i materiali a base carbonio non possono essere usati singolarmente e quelli più innovativi sono molto costosi da produrre. Per questo motivo la ricerca scientifica sta valutando l'utilizzo della silice mesoporosa come materiale emostatico. Si tratta di un materiale inorganico che ha presentato ottime caratteristiche emostatiche senza i difetti che caratterizzano gli altri materiali inorganici. Nel capitolo seguente la silice mesoporosa verrà presentata più in dettaglio, approfondendo le sue caratteristiche come materiale emostatico.



## 2. Silice mesoporosa

La silice mesoporosa (SM) si è fortemente distinta fra i materiali emostatici grazie alle sue eccellenti proprietà. Ad esempio, la possibilità di regolare la dimensione dei pori (nella SM può variare da 2 a 50 nm), la possibilità di funzionalizzare la superficie facilmente, l'elevata stabilità e l'inerzia fisiologica rendono la SM un eccellente materiale per accelerare il processo di coagulazione. La SM è, inoltre, stata dichiarata non tossica dalla FDA (Food and Drug Administration) e dall'EFSA (European Food Safety Authority). Queste caratteristiche rendono, quindi, la SM un materiale molto promettente per il controllo delle emorragie [14].

Questo capitolo si concentrerà sulla SM, i suoi metodi di sintesi e le sue proprietà. Verranno poi affrontate le applicazioni biotecnologiche in cui viene impiegata, con particolare attenzione alla sua applicazione come materiale emostatico. Verranno, infine, affrontati i metodi di funzionalizzazione della silice, in particolare quelli relativi agli ioni zinco, che sono elementi che posseggono importanti proprietà antibatteriche.

### 2.1 Sintesi e proprietà

Nonostante la SM sia stata sintetizzata precedentemente, essa inizia a diffondersi solo a partire dal 1992. In quell'anno nei laboratori della Mobil Corporation, *Kresge et al.* [15] riescono a sintetizzare per la prima volta MCM-41 (Mobil Composition of Matter No. 41), un campione di SM che viene inizialmente studiato per via delle sue proprietà come setaccio molecolare. A seguito della scoperta di MCM-41 si continua la ricerca sulla SM per studiarne le caratteristiche e le proprietà. Viene scoperta la possibilità di manipolare alcune caratteristiche del materiale come la forma, il diametro dei pori e la connettività. Questa scoperta avvia la ricerca sulla SM per poterla impiegare anche in altri ambiti. Vengono sintetizzate nuove famiglie di SM in tutto il mondo. Fra questi, uno dei campioni più importanti è quello ottenuto per la prima volta all'Università di Santa Barbara in California, denominato SBA-15 (Santa Barbara Amorphous No. 15). SBA-15 è un campione di silice che presenta caratteristiche diverse da quelle di MCM-41. Presenta, infatti, un diametro dei pori più grande, una parete più spessa e una maggiore stabilità idrotermale. Queste caratteristiche consentono a SBA-15 di avere maggiori prospettive di applicazione rispetto a MCM-41 e, di conseguenza, si genera un sempre maggiore interesse della ricerca proprio nei confronti di quest'ultima famiglia di silici. Con il passare del tempo, la ricerca sulla SM è avanzata e si sono riusciti ad ottenere dei campioni con caratteristiche tali da renderli idonei ad applicazioni biologiche. Si sono, ad esempio, riusciti a creare campioni di SM con la capacità di immagazzinare farmaci oppure in grado di biodegradarsi *in vivo* [14].

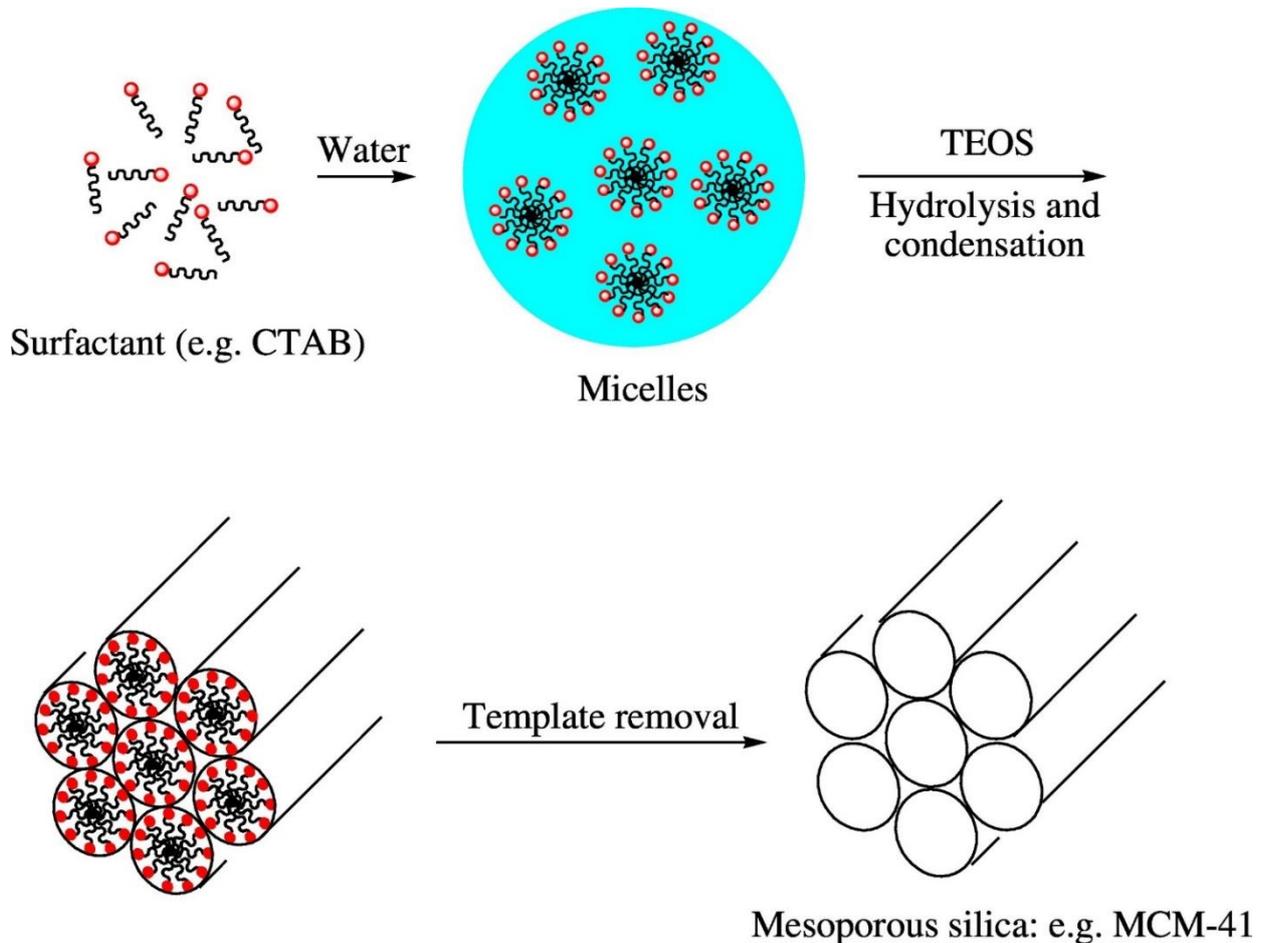
Come già detto in precedenza, la SM possiede interessanti proprietà che possono essere utili per diverse applicazioni. Fra queste, le più interessanti sono l'elevata area superficiale, la possibilità di controllare la dimensione dei pori e la morfologia, l'elevata stabilità termica e meccanica, la facilità di preparazione, la possibilità di funzionalizzare le superfici interne ed esterne, l'elevata biocompatibilità e la biodegradabilità. Tutte queste proprietà sono modificabili andando ad intervenire sul processo di sintesi della SM [16].

### Sintesi

Le particelle di SM vengono principalmente sintetizzate utilizzando una modifica del metodo Stober. Questa tecnica prevede la combinazione di due metodi: il metodo sol-gel (basato sulla

reazione di Stober) e il soft templating. Nel processo di sintesi viene inizialmente disciolto un tensioattivo, come ad esempio il bromuro di esadeciltrimetilammonio (CTAB), in acqua. Le molecole di tensioattivo presenti nell'acqua si aggregano formando delle micelle, che serviranno, poi, come supporto per la formazione della SM [14], [17]. Per far avvenire l'aggregazione micellare, è necessario che la concentrazione del tensioattivo superi un valore di concentrazione critica [18]. Una volta che si è formato il modello micellare, vengono inseriti nella soluzione i cosolventi, se la sintesi li richiede, e le fonti di silicio. Le fonti di silicio sono necessarie per la formazione della silice e, solitamente, viene scelto come precursore il tetraetil ortosilicato (TEOS). Altri possibili precursori sono il tetrapropil ortosilicato (TPOS) e il tetrametil ortosilicato (TMOS). Il TEOS è però il precursore della silice preferito perché risulta più facile controllare l'esito della reazione [14], [17]. Il processo utilizzato per sintetizzare la SM si basa sulla reazione sol-gel. Questa reazione prevede due fasi: l'idrolisi e la condensazione dei precursori della silice attorno al modello micellare formato dal tensioattivo [16], [19]. La silice viene quindi sintetizzata ma è necessario rimuovere il tensioattivo per riuscire a massimizzare il volume dei pori efficaci. Si possono usare diversi metodi per la rimozione del tensioattivo ma i più utilizzati sono la calcinazione ad alte temperature, il lavaggio (generalmente con acqua o etanolo), la dialisi e l'estrazione con solvente [16], [17], [20]. Il metodo di sintesi sopra descritto, nel corso del tempo, ha subito alcune variazioni che hanno permesso di ottenere dei campioni di SM con caratteristiche differenti [19]

Come accennato in precedenza, uno dei campioni di silice più rilevanti per quanto riguarda la ricerca scientifica è MCM-41. Il processo di sintesi di MCM-41 può avvenire sia in condizioni alcaline che acide in base alle specifiche esigenze; solitamente, però, l'approccio più diffuso è quello in ambiente alcalino. Le condizioni di pH, temperatura e tensioattivo possono influenzare la struttura delle micelle e la deposizione della silice sul modello micellare [14]. Un precursore della silice alternativo al TEOS per la sintesi di MCM-41 è il metasilicato di sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) [18]. In Figura 2.1 è riportato uno schema illustrativo della sintesi di MCM-41.



**Figura 2.4:** Schema illustrativo del meccanismo di formazione della silice mesoporosa MCM-41 [20]

Un altro campione di SM molto interessante è MCM-48. Questo campione appartiene alla stessa famiglia di MCM-41 e ha suscitato molto interesse a causa dei suoi canali bidirezionali che lo rendono un materiale promettente per quanto riguarda la somministrazione di farmaci. I canali bidirezionali consentono, infatti, un rapido trasporto molecolare e una facile accessibilità molecolare. MCM-41 risulta invece meno interessante per questo tipo di applicazione perché i suoi canali unidirezionali risultano meno efficienti. La sintesi di MCM-48 prevedeva inizialmente l'utilizzo di tensioattivi cationici-anionici come template. La reazione, inoltre, richiedeva lunghi tempi e alte temperature. La sintesi risultava così troppo complicata e il risultato erano particelle troppo grandi per essere utilizzate per la somministrazione dei farmaci. Il metodo di sintesi è stato quindi modificato (reazione di Stober modificata). La nuova sintesi prevede l'utilizzo del copolimero triblocco pluronico F127 come tensioattivo e la reazione avviene a temperatura ambiente. Grazie a questa tecnica di sintesi è possibile ottenere particelle sferiche con dimensioni inferiori rispetto a quelle che si ottenevano tramite il processo di sintesi originale [18].

Come è già stato spiegato, SBA-15 rappresenta un'evoluzione importante della SM in quanto possiede una struttura più robusta e versatile rispetto a quella di MCM-41. Questa caratteristica consente a SBA-15 di poter essere impiegata in applicazioni che richiedono una maggiore stabilità termica e meccanica. Il processo di sintesi di SBA-15 si basa sulla reazione di Stober ed è simile al templating micellare utilizzato per la formazione di MCM-41. Esistono però delle differenze, come, per esempio, il tensioattivo utilizzato. Per la sintesi di

SBA-15, infatti, non si utilizza il CTAB, bensì il Pluronic P123. Si tratta di un copolimero triblocco che consente la formazione di micelle più grandi e strutture autoassemblate più stabili. L'utilizzo del Pluronic P123 consente anche di ottenere particelle con dimensioni dei pori più grandi rispetto a MCM-41. La fonte di silicio generalmente utilizzata per la sintesi di SBA-15 è il TEOS, analogamente alla sintesi di MCM-41. Il TEOS tramite reazione sol-gel idrolizza e condensa sulle micelle formando la silice. Anche per quanto riguarda la rimozione del tensioattivo utilizzato non ci sono sostanziali differenze rispetto a quanto accadeva per MCM-41. Anche in questo caso, infatti, il Pluronic P123 viene rimosso tramite calcinazione ad alte temperature oppure tramite estrazione con solvente. Una differenza sostanziale riguarda, invece, il pH dell'ambiente. Infatti, mentre per la sintesi di MCM-41 si utilizza generalmente un ambiente alcalino, quella di SBA-15 viene condotta in un ambiente acido [14], [18].

Oltre alle famiglie M41S (di cui fanno parte MCM-41 e MCM-48) e SBA (di cui fa parte SBA-15), sono presenti altre famiglie di SM che vengono studiate in letteratura. Si tratta delle famiglie HMS, FSM, MSU, KIT, FDU, JLU, TUD, COK e HMM. Queste sono ancora oggi in fase di studio da parte dei ricercatori per studiarne il possibile utilizzo in molte applicazioni [14]. Ricordiamo poi le silici appartenenti alle famiglie IBN e FDU-n che hanno dimostrato un grande potenziale per le applicazioni biomediche [18].

I ricercatori stanno studiando anche particelle di SM che possiedano delle strutture speciali che consentano di aumentare le loro prestazioni in diversi campi. In particolare, hanno suscitato molto interesse le particelle cave e quelle rattle-like (di tipo sonaglio). Le particelle cave sono costituite da un guscio mesoporoso e uno spazio interstiziale cavo. Questo tipo di particelle possiede una bassa densità e un'elevata area specifica. Esse sono ideali per la somministrazione dei farmaci perché la loro struttura consente di caricare grandi quantità di farmaco. La sintesi avviene utilizzando il metodo del doppio template. Come dice il nome, il metodo prevede l'utilizzo di due template per la formazione delle particelle. Il primo, chiamato rigid template, consente la formazione dell'interno cavo mentre il secondo, chiamato soft template, consente di formare i mesopori. Le particelle rattle-like, invece, vengono chiamate in questo modo perché possiedono una forma che ricorda quella di un sonaglio. In questo tipo di silici viene realizzato un rivestimento multi-step sulle particelle del nucleo per formare uno strato intermedio rimovibile. La sintesi risulta però molto complessa e costosa e, per questo motivo sono in fase di sviluppo nuove tecniche come il soft templating [18].

### **Parametri di sintesi che influiscono sulle proprietà finali**

Il metodo di sintesi delle particelle di SM influisce fortemente sulle loro proprietà finali. Parametri della reazione come il pH, la temperatura e la velocità di agitazione possono variare caratteristiche come la forma, la porosità o la dimensione delle particelle. Queste possono variare anche in base al tensioattivo o ai cosolventi scelti [17]. Andando ad agire, quindi, sulle condizioni di sintesi e sulle sostanze utilizzate è possibile ottenere materiali con caratteristiche diverse. Si possono ottenere particelle con diverse dimensioni, dalla scala nanometrica fino ad arrivare a quella micrometrica. Variando le condizioni di reazione si possono ottenere particelle con diverse morfologie. Le forme più comuni sono quella sferica, a bastoncino, ellissoidale e piastrinica. La scelta della forma può influire fortemente sull'applicazione biologica. Si possono anche ottenere diverse dimensioni dei pori. Generalmente i pori possiedono diametri che vanno da 2 a 30 nm. La dimensione dei pori influisce sulla capacità delle particelle di immagazzinare al loro interno sostanze chimiche. Una dimensione dei pori

elevata può consentire di ospitare al loro interno anche sostanze di grandi dimensioni come le proteine. Oltre ai pori, si possono modificare le proprietà superficiali delle particelle andando ad intervenire sui gruppi silanoli presenti sulla superficie. Questi gruppi possono infatti modificare le caratteristiche delle particelle rendendole ad esempio idrofobiche o idrofile. Agendo sulla sintesi è possibile anche modificare la disposizione dei pori ottenendo, ad esempio, pori con disposizione esagonale (come in MCM-41 e SBA-15) oppure a disposizione cubica (come in MCM-48). La scelta delle caratteristiche delle particelle influirà poi sulle proprietà come la biocompatibilità e la possibilità o meno di funzionalizzare la superficie [20].

Il metodo di rimozione del templante può causare significativi cambiamenti nella struttura finale della silice. *Thananukul et al.* [21] hanno confrontato gli effetti della calcinazione e dell'estrazione con solvente su alcuni campioni di silice a schiuma mesocellulare. Si tratta di un materiale poroso a base di silice con una struttura di pori mesocellulari. Per la sintesi è stato utilizzato il Pluronic P-123 come templante. La calcinazione ha permesso di ottenere una silice con una struttura dei pori più ordinata e una superficie con una maggiore concentrazione di gruppi silanoli. L'estrazione con solvente ha, invece, permesso di ottenere una silice con pori più definiti e morfologia più spugnosa.

I cosolventi utilizzati sono i principali fattori che determinano la forma dei pori. La forma dei pori a nido d'ape, ovvero quella che viene ritenuta la forma standard, si ottiene solitamente in presenza di basi forti come NaOH. L'utilizzo di altri cosolventi nella reazione può portare ad una diversa forma dei pori. Un esempio è la trietanolammina (TEA) che permette generare pori a wormhole. Le particelle presentano degli spazi dei pori più ristretti e delle sospensioni colloidali meno stabili rispetto a quelle ottenute con pori a nido d'ape. I pori a wormhole possiedono dei vantaggi per quanto riguarda il rilascio delle molecole caricate sulla superficie. Risulta, infatti, più facile controllare il rilascio utilizzando dei pori a wormhole rispetto a quelli a nido d'ape. Questo è dovuto alla minore dimensione dei pori. Una diminuzione della dimensione dei pori contribuisce, infatti, ad un miglior controllo sul rilascio delle molecole caricate sulla superficie [17].

Il tipo di tensioattivo utilizzato per il templating è in grado di influenzare la dimensione dei pori delle particelle di SM. Nel caso delle particelle di MCM-41, per esempio, l'utilizzo del CTAB genera un diametro dei pori che varia da 2 a 6 nm [22]. Per la sintesi di particelle di SBA-15 l'uso del Pluronic P123 porta alla formazione di particelle di SBA-15 con dimensione che varia dai 4 ai 13 nm [22]. Le dimensioni dei pori di SBA-15 risultano, dunque, maggiori di quelle di MCM-41. Il Pluronic P123 è un copolimero a blocchi e generalmente l'utilizzo di questo tipo di tensioattivi genera pori più grandi rispetto a quelli ottenuti utilizzando tensioattivi di alchilammonio come il CTAB. Si possono incrementare ulteriormente le dimensioni dei pori utilizzando degli espansori micellari. Gli espansori micellari sono composti organici come il benzene e i suoi derivati, idrocarburi lineari e ciclici o ammine a lunga catena. L'utilizzo di espansori micellari può incrementare la dimensione dei pori fino a 40 nm [20].

*Jana et al.* [23] hanno studiato l'influenza del tensioattivo nella sintesi di MCM-41. In particolare, è stata valutata la variazione della dimensione dei pori a seguito di una variazione della lunghezza della catena alchilica del tensioattivo. Lo studio ha riportato un aumento della dimensione dei pori da 1,6 nm a 4,2 nm passando da una catena a 8 atomi di carbonio ad una a 22 atomi di carbonio. La regolarità strutturale, invece, si è mantenuta sempre molto elevata

a prescindere dalla lunghezza della catena alchilica. La scelta del tensioattivo può, quindi, rappresentare una valida soluzione per il controllo della dimensione dei pori.

## **Ruolo della dimensione delle particelle**

Anche la dimensione delle particelle assume un ruolo importante nelle diverse applicazioni che coinvolgono la SM. La dimensione nanometrica comporta, per esempio, una migliore disperdibilità e un rapido trasporto di massa. Diversi parametri del processo di sintesi possono influenzare la dimensione delle particelle e vanno quindi scelti con cura per ottenere la tipologia dimensionale desiderata. Un parametro molto importante è il pH. Una sua variazione è in grado di influenzare fortemente le velocità di idrolisi e di condensazione del precursore della silice utilizzato. Per quanto riguarda il TEOS, ad esempio, si osserva un aumento monotono della velocità di idrolisi all'aumentare del pH. La situazione cambia invece quando si considera la velocità di condensazione del TEOS. Questa, infatti, aumenta fino ad un valore di pH di 8,4 e diminuisce in seguito. Conoscendo quindi le velocità di idrolisi e condensazione del TEOS a diversi valori di pH si può scegliere il pH adatto per ottenere le particelle della dimensione desiderata [20].

Anche la temperatura è un parametro che influisce sulla dimensione delle particelle. Essa, infatti, influisce sia sulla velocità di idrolisi che su quella di polimerizzazione del precursore della silice. Un aumento di temperatura genera infatti un incremento di entrambe le velocità, favorendo, così la velocità di crescita e permettendo di ottenere particelle più grandi [20]. *Ly et al.* [24] hanno studiato gli effetti della temperatura di reazione sulla dimensione delle particelle. Lo studio ha confermato che l'aumento della temperatura causa anche un aumento della dimensione delle particelle. Passando infatti da una temperatura di 40°C a una di 95°C, la dimensione delle particelle aumenta da 21 nm a 38 nm.

Oltre a pH e temperatura, anche la velocità di agitazione del sistema è un importante parametro che influisce sulla dimensione delle particelle [20]. Infine, la dimensione può essere controllata tramite la scelta del precursore della silice. *Yamada et al.* [25] hanno valutato l'utilizzo di diversi tetraalcoossilani come precursori, scoprendo che la diversa velocità di idrolisi è in grado di influenzare la dimensione delle particelle. I tetraalcoossilani che idrolizzano più velocemente (come il tetrametossilano) permettono la formazione di molti nuclei a discapito del fenomeno di accrescimento, permettendo di ottenere particelle più piccole. I precursori con una bassa velocità di idrolisi (come il tetrabutossilano), invece, favoriscono la fase di crescita rispetto a quella di nucleazione portando alla formazione di particelle più grandi.

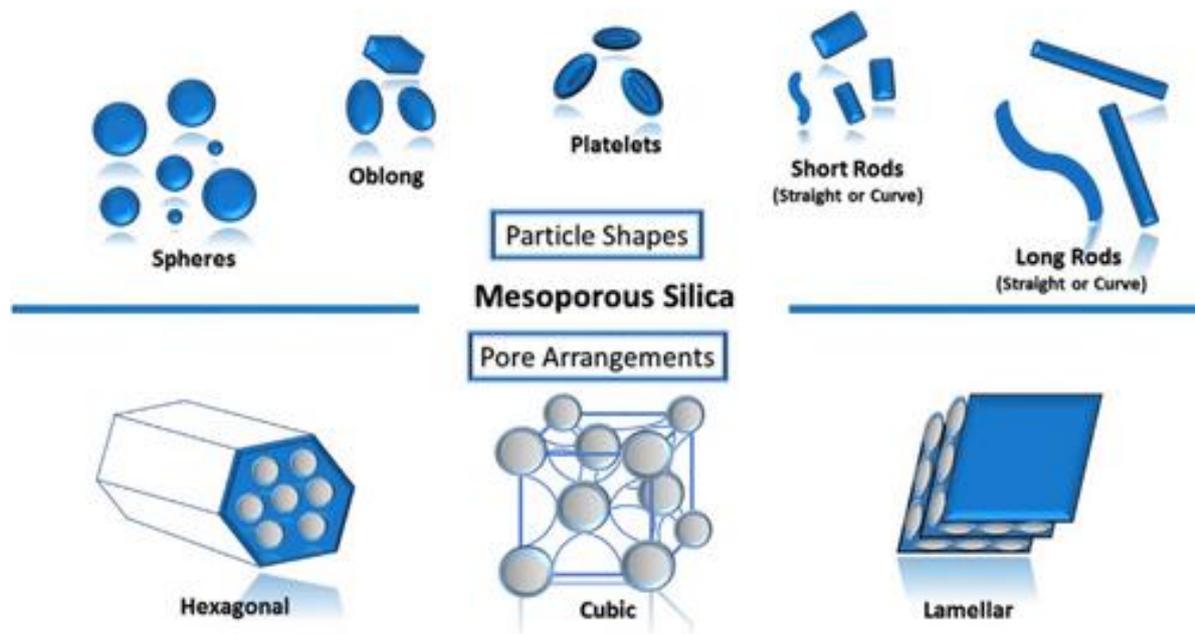
## **Ruolo della morfologia delle particelle e della geometria dei pori**

Un'altra caratteristica importante che deve essere presa in considerazione nella sintesi di SM è la forma delle particelle. Questa, infatti, può influire molto sull'efficacia del materiale in determinate applicazioni biologiche. Le morfologie più comuni sono quella sferica, a bastoncino, ellissoidale, a pellicola, a piastra e a cubo. In Figura 2.2 sono riportate le principali forme delle particelle di SM. La forma può essere influenzata da diversi fattori come la composizione della miscela di reazione, il pH, la velocità di agitazione e gli additivi [20].

*Naik et al.* [26] hanno studiato la dipendenza della morfologia delle particelle dalle condizioni di pH. In particolare, è stato evidenziato che per valori di pH bassi la velocità di

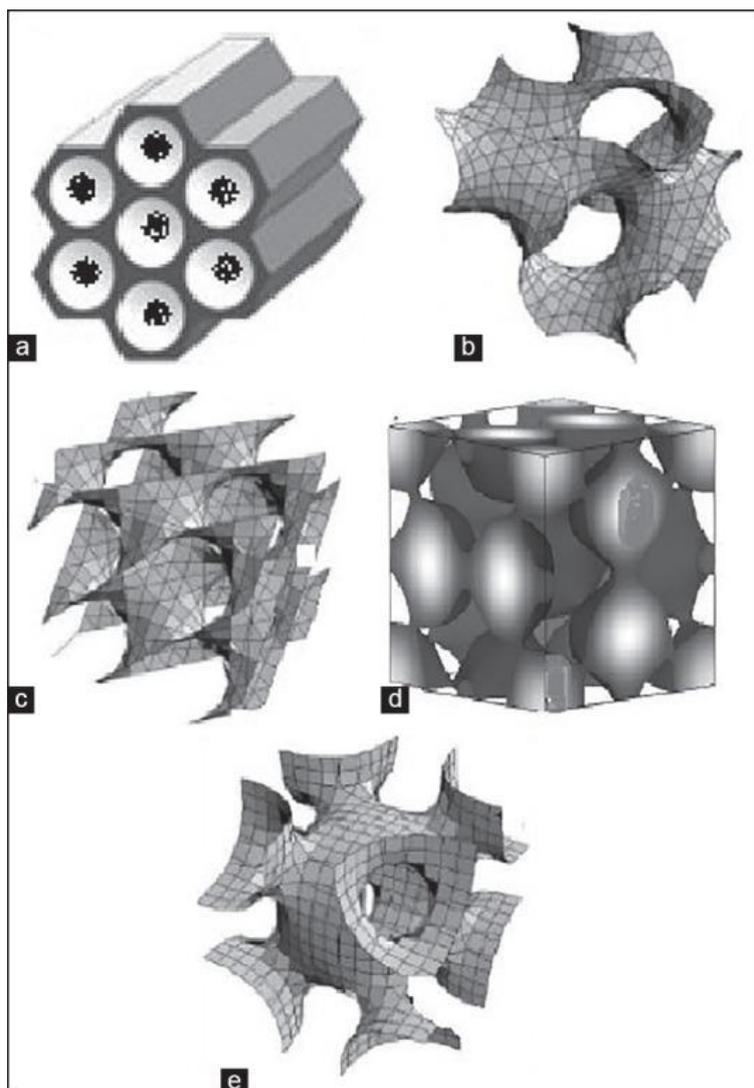
condensazione della silice è minore. Questo causa una variazione nella forma portando alla sintesi di particelle con morfologie più curve come sfere o discoidi.

La morfologia delle particelle di SM può essere regolata tramite l'utilizzo di additivi. Questi additivi possono essere inorganici (principalmente sali), organici (come gli alcani) e organoalcoossilani [20]. *Zhao et al.* [27] hanno utilizzato come additivo  $MgSO_4$  nel processo di sintesi di SBA-15. La presenza di questo sale ha permesso di ottenere delle particelle discoidali mentre in sua assenza si ottenevano particelle con strutture simili a corde.



**Figura 2.5:** Forma delle particelle e disposizione dei pori della silice mesoporosa [22]

Le particelle di SM possono distinguersi anche per le geometrie che costituiscono i pori. Le principali geometrie sono riportate in Figura 2.3. Se si considera MCM-41, per esempio, si possono osservare dei pori a struttura esagonale bidimensionale con simmetria  $p6mm$ . Altre possibili strutture osservabili nelle particelle di SM sono quella cubica bicontinua e quella a gabbia. La struttura cubica bicontinua possiede una rete continua senza separazione netta tra le fasi. La struttura a gabbia viene invece chiamata in questo modo in quanto si presenta come una gabbia tridimensionale. Le diverse strutture possono poi essere a loro volta differenziate a seconda della disposizione dei pori [28]. MCM-41 e SBA-15 possiedono una diversa struttura dei pori che conferisce ai due materiali proprietà diverse. Entrambi possiedono una disposizione esagonale bidimensionale di pori cilindrici con dimensioni uniformi. MCM-41 possiede una struttura uniforme con un canale unidirezionale, pori esagonali medi e una distribuzione ristretta della dimensione. SBA-15 possiede invece pori bidimensionali, cilindrici e paralleli disposti in una cella unitaria di forma esagonale [22].



**Figura 2.6:** Schema illustrativo rappresentante le diverse geometrie dei pori (a) 2D esagonale  $p6mm$ , (b) cubica bicontinua  $Ia3d$ , (c) cubica bicontinua  $Pn3m$ , (d) a gabbia  $pm3n$ , (e) a gabbia  $Im3m$  [28]

### **Relazione tra le proprietà della silice e la sua tossicità**

Per l'utilizzo della SM in applicazioni cliniche occorre valutare attentamente la sua tossicità. Questa dipende dalle proprietà intrinseche della SM che dovranno quindi essere scelte con attenzione. La dimensione delle particelle e l'area superficiale sono due caratteristiche che possono influenzare significativamente la citotossicità. Una maggiore area superficiale causa una maggiore reattività con le cellule e quindi le particelle con valori alti di area superficiale risulteranno più tossiche di quelle con bassi valori di area superficiale. Per quanto riguarda la dimensione delle particelle, quelle più piccole risultano più tossiche rispetto a quelle più grandi. Questo è dovuto alla maggiore superficie esposta che, come visto precedentemente, causa una maggiore reattività con le cellule. Anche la porosità è un parametro in grado di influenzare la tossicità delle particelle. In particolare è stato scoperto che particelle di SM ad alta porosità presentano una citotossicità minore rispetto alla silice non porosa convenzionale [22].

Per l'utilizzo di un materiale in applicazioni biomediche occorre anche che questo possa essere eliminato dall'organismo tramite vie non tossiche come, ad esempio, la degradazione

biologica. La SM non è chimicamente stabile quando si trova in mezzi acquosi in quanto tende ad essere idrolizzata e a formare acido ortosilicico [29]. L'acido ortosilicico viene poi metabolizzato ed espulso dall'organismo principalmente tramite urina [30]. La degradazione della SM è stata valutata in diversi mezzi come fluidi corporei simulati, tamponi fisiologici e altri mezzi biologici. In base alle condizioni sperimentali e alle caratteristiche strutturali della silice, la dissoluzione poteva durare da alcune ore a diversi giorni. *Bindini et al.* [29] hanno studiato l'influenza dei parametri strutturali e di sintesi sulla degradazione della SM. I risultati ottenuti dalla ricerca mostrano che il parametro principale che influenza il tempo di degradazione è l'area superficiale. Una maggiore area superficiale permette infatti una migliore diffusione molecolare favorendo il processo di dissoluzione.

## *2.2 Applicazioni biotecnologiche*

Le caratteristiche precedentemente osservate rendono la SM un eccellente materiale per diverse applicazioni biotecnologiche. Qui di seguito sono presentate alcune delle principali applicazioni.

### **Somministrazione di farmaci**

Le particelle di SM possono essere utilizzate come vettori per il trasporto e il rilascio controllato di farmaco in un sito bersaglio. L'elevata area superficiale della SM consente infatti di incorporare il farmaco che verrà poi trasportato fino al bersaglio insieme alle particelle di SM e qui rilasciato. L'uso della SM come vettore consente un'alta specificità in quanto evita di rilasciare il farmaco in zone lontane dal bersaglio, zone in cui il farmaco potrebbe causare effetti indesiderati. La SM permette, inoltre, di proteggere il farmaco da degradazione. Grazie alla sua struttura porosa e l'elevata superficie specifica la silice è in grado di caricare grandi quantità di farmaco. Le particelle possono, inoltre, essere funzionalizzate per direzionare più facilmente il farmaco verso i tessuti bersaglio. Si può anche progettare la SM in modo che questa abbia effetti sinergici con il farmaco. D'altro canto, però, bisogna valutare attentamente le caratteristiche delle particelle perché queste possono variare l'efficacia del trattamento. In particolare, il tipo di silice, la dimensione dei pori e l'eventuale funzionalizzazione possono variare l'adsorbimento e il rilascio del farmaco. Attualmente la ricerca che vede l'utilizzo della SM come carrier per farmaci riguarda prevalentemente la terapia del cancro [14], [31].

### **Bioimaging cellulare**

Le particelle di SM possono essere impiegate per il bioimaging cellulare. La struttura porosa della silice consente, infatti, di incorporare al suo interno agenti di contrasto e molecole fluorescenti. La SM è ideale per questo tipo di applicazioni grazie alla sua biocompatibilità, che può essere ulteriormente incrementata se si funzionalizza la superficie del materiale con gruppi chimici specifici. Questi gruppi chimici possono, inoltre, essere implementati anche per incrementarne la selettività verso le cellule bersaglio. La SM può, infine, essere caricata con particelle in grado di emettere luce visibile quando vengono colpite da radiazioni infrarosse. In questo modo è possibile ottenere un imaging profondo dei tessuti, riducendo al contempo il possibile danno delle radiazioni ai tessuti stessi [14], [31].

## **Vettori per fotosensibilizzatori**

I fotosensibilizzatori sono molecole che generano specie reattive dell'ossigeno dopo essere state attivate dalla luce. Queste specie reattive permettono di distruggere le cellule tumorali. Affinché questo avvenga, però, le specie reattive devono essere incorporate su un opportuno vettore per poter raggiungere l'obiettivo. Le particelle di SM sono degli ottimi vettori perché consentono di incorporare una grande quantità di fotosensibilizzatori e ne consentono il rilascio controllato in risposta a stimoli specifici. L'incapsulamento impedisce, inoltre, ai fotosensibilizzatori di attivarsi lontano dai siti tumorali aumentando la selettività del trattamento [31].

## **Sviluppo di vaccini**

Le particelle di SM possono essere utilizzate come piattaforme innovative nello sviluppo di vaccini. Le particelle possono infatti essere utilizzate per incapsulare antigeni proteici o peptidici consentendo un rilascio controllato e una protezione dalla degradazione. La SM può anche agire da adiuvante aumentando la risposta immunitaria. La selettività e quindi l'efficacia del vaccino possono essere, poi, aumentate tramite funzionalizzazione della silice. La ricerca che vede coinvolto l'utilizzo della SM in questo settore si sta attualmente occupando dello sviluppo di vaccini contro tubercolosi e cancro [31].

## **Biosensori**

Le particelle di SM possono essere usate nello sviluppo di biosensori per rilevare biomolecole specifiche. La SM può essere, infatti, in grado di rilevare con un'alta sensibilità biomolecole come proteine o acidi nucleici grazie all'elevata area superficiale e alla funzionalità della superficie [14].

## **Rigenerazione tissutale**

La struttura della SM può essere progettata per mimare il comportamento della matrice extracellulare favorendo così l'adesione e la proliferazione cellulare. Questa sua capacità può essere utilizzata per la crescita cellulare e la rigenerazione tissutale. Per fare ciò, la silice viene solitamente funzionalizzata con elementi bioattivi che vengono sviluppati per migliorare la rigenerazione dei tessuti e la guarigione delle ferite [14].

## **Sistemi di rilascio stimolo-responsivi**

Un settore di ricerca emergente è quello relativo allo sviluppo di veicoli di rilascio che rispondono a stimoli specifici. La SM è uno dei materiali studiati in questo tipo di ricerca. Lo scopo è quello di attivare il meccanismo di rilascio delle sostanze presenti all'interno della silice solo in presenza di stimoli precisi come pH, luce, ultrasuoni e campi magnetici [14].

## **Materiale emostatico**

La capacità della SM di assorbire rapidamente l'acqua del sangue permette di velocizzare il processo di coagulazione. In combinazione con particelle come argento o altri metalli, la silice può agire anche come materiale antibatterico [14]. L'utilizzo della SM per il controllo delle

emorragie e le sue proprietà emostatiche verranno discusse in maniera più approfondita nel paragrafo seguente.

### 2.3 Attività emostatica

I materiali emostatici sono materiali in grado di promuovere il processo di emostasi ma il modo con cui il processo di coagulazione viene accelerato dipende dalle caratteristiche del materiale stesso. Si parla di emostasi fisica quando il materiale emostatico è in grado di assorbire una grande quantità di acqua dal sangue. L'assorbimento dell'acqua permette di ridurre la fluidità del sangue e causa, inoltre, un rigonfiamento del materiale emostatico che diventa così in grado di coprire la ferita. I materiali emostatici chimici, invece, sono in grado di favorire l'emostasi grazie alle interazioni elettrostatiche che si generano tra la carica superficiale del materiale e i componenti del sistema emostatico. Infine, è possibile anche classificare i materiali emostatici come fisiologici. Questa classe di materiali è in grado di favorire la coagulazione simulando i passaggi naturali della cascata coagulativa. Questi materiali sono anche in grado di favorire la vasocostrizione [22].

Come detto precedentemente, la SM possiede promettenti proprietà che la rendono un efficace materiale emostatico. Una delle più importanti è la sua elevata area superficiale. Questa, infatti, consente di assorbire una grande quantità di acqua dal sangue. Grazie all'assorbimento dell'acqua, la concentrazione dei fattori di coagulazione e delle piastrine aumenta favorendo la formazione di coaguli [2]. L'assorbimento dell'acqua, inoltre, non comporta una generazione elevata di calore come invece accade quando vengono utilizzati materiali emostatici come le zeoliti, rendendo quindi la SM più sicura rispetto a questo altro tipo di materiali [22].

Altri fattori importanti che determinano le capacità emostatiche della SM sono la porosità e la dimensione dei pori. In particolare è stato dimostrato che ad un aumento della dimensione dei pori è associata sia una diminuzione del tempo di coagulazione sia una maggiore biocompatibilità [2]. *Chen et al.* [32] hanno studiato gli effetti della variazione della dimensione dei pori e di quella delle particelle sulla velocità di coagulazione. I test di coagulazione sono stati effettuati su plasma di coniglio. Per quanto riguarda la dimensione dei pori, questa è stata variata fra i 5 nm e i 15 nm riscontrando una significativa influenza sulla velocità di coagulazione. Le particelle con dimensioni dei pori comprese tra 10 e 15 nm hanno dimostrato una velocità di formazione del coagulo maggiore e anche una maggiore resistenza del coagulo stesso. Le particelle con dimensioni dei pori maggiori hanno, inoltre, consentito anche una maggiore diffusione di fattore XII al loro interno laddove avviene la sua attivazione prima che questo diffonda all'esterno. Per quanto riguarda la dimensione delle particelle, invece, non si è notata una significativa variazione della velocità di coagulazione passando da 60 nm a 220 nm.

L'emostasi può anche essere influenzata dalla forma delle particelle. Questo argomento è stato oggetto dello studio di *Ostomel et al.* [33]. Nella loro ricerca gli autori hanno evidenziato come la morfologia delle particelle di SM può influire significativamente sull'efficacia dell'azione emostatica. In questo studio le particelle di forma sferica si sono dimostrate più efficaci nel facilitare la formazione di coaguli di sangue rispetto a quelle di forma irregolare perché queste sono in grado di fornire una maggiore superficie disponibile al sangue.

Un altro effetto determinante nel processo di coagulazione è dovuto alla forma del materiale emostatico utilizzato. *Hong et al.* [34] hanno studiato l'efficacia della SM in polvere. In particolare, hanno riscontrato alcuni difetti nel loro utilizzo. Esse non possono essere immerse rapidamente nel sangue. Inoltre, a causa della loro scarsa fluidità e della loro bassa densità, possono essere lavate via facilmente nel caso di un rapido sanguinamento. Quando vengono mescolate con il sangue, le polveri possono, inoltre, formare un callo così spesso da rendere difficile la rimozione dei tessuti danneggiati ostacolando la guarigione della ferita. Per correggere i difetti appena descritti, gli autori hanno implementato la granulazione delle particelle. Sono stati così realizzati diversi tipi di granuli sferici tramite metodi di miscela a secco e granulazione a umido utilizzando particelle di SM, poliuretano, pirofosfato di sodio e argilla. I granuli ottenuti si sono dimostrati un eccellente procoagulante in grado di ridurre notevolmente il tempo di coagulazione.

*Zhang et al.* [35] hanno immobilizzato le particelle di SM su fibre di cotone e ne hanno confrontato l'effetto emostatico con la polvere di SM. Il composito di cotone e SM era stato inizialmente realizzato con lo scopo di ottenere un materiale facilmente utilizzabile in caso di situazioni di emergenza. Oltre alla facilità di utilizzo, il composito ha dimostrato una migliore efficacia rispetto alla polvere di SM. Il composito nei test effettuati ha riportato infatti tempi di coagulazione del sangue inferiori e minori perdite di sangue. Inoltre, la superficie della ferita al termine del test presentava una minor quantità di residuo rispetto alla polvere.

La SM è in grado di favorire il processo di emostasi anche grazie alla sua carica superficiale. Questa infatti è in grado di promuovere i parametri della coagulazione e favorisce l'assorbimento delle piastrine [22].

Altre caratteristiche che rendono la silice un ottimo materiale emostatico sono la biocompatibilità e la facilità di funzionalizzazione [22]. In particolare, quest'ultima è una caratteristica molto importante perché permette di ottenere particelle di SM con superfici che presentano gruppi funzionali che incrementano l'efficacia emostatica. La SM può anche essere funzionalizzata con sostanze antibatteriche che possono prevenire possibili infezioni [2].

Infine, *Mohamed et al.* [4] hanno realizzato delle particelle di SM caricate con acido tranexamico con lo scopo di ottenere un materiale che combinasse l'azione emostatica effettuata dalla SM con l'attività antifibrinolitica dell'acido tranexamico.

#### *2.4 Silice mesoporosa funzionalizzata per attività antibatterica*

La funzionalizzazione della SM è un processo che permette di modificare la superficie delle particelle con dei gruppi funzionali. Esistono diversi tipi di gruppi funzionali con cui è possibile funzionalizzare la superficie della silice e in base al gruppo funzionale utilizzato possono variare le caratteristiche della silice che può diventare più compatibile con determinate sostanze o può acquisire nuove proprietà. La possibilità di funzionalizzare le particelle di SM rende quindi queste ultime molto interessanti per diverse applicazioni [36].

La funzionalizzazione della silice può essere effettuata sia durante la sintesi che dopo la formazione iniziale. Nel primo caso si parla di co-condensazione mentre nel secondo di innesto post-sintesi. La funzionalizzazione può avvenire anche utilizzando altri metodi come la click chemistry e l'assemblaggio elettrostatico [36].

La co-condensazione consente di incorporare i gruppi funzionali direttamente sulla superficie durante la sintesi delle particelle di SM. Durante la co-condensazione, gli organosilani assumono un ruolo chiave perché i gruppi alcossilici dei loro precursori co-reagiscono con il precursore della silice e formano legami Si-O-Si permettendo di legare covalentemente i gruppi funzionali organici alla silice. La co-condensazione permette di funzionalizzare in maniera uniforme tutta la superficie e di regolare la densità dei gruppi funzionali dosando la quantità di precursore organosilano. Un altro vantaggio della co-condensazione è la possibilità di implementare una vasta gamma di gruppi funzionali variando la composizione del precursore. Bisogna però valutare con attenzione il precursore da utilizzare perché questo potrebbe compromettere le proprietà del materiale in maniera negativa andando, per esempio, a modificare la struttura dei pori [36].

L'innesto post-sintesi consente invece di innestare gruppi funzionali su particelle di SM già formate. Per fare ciò si utilizzano i gruppi silanoli (Si-OH) presenti sulla superficie del materiale che, reagendo con gli agenti di accoppiamento, consentono di legare i gruppi reattivi alla silice. Uno dei vantaggi dell'innesto post-sintesi è la possibilità di separare la sintesi e la funzionalizzazione potendo così funzionalizzare un ampio spettro di particelle e con diversi metodi. L'innesto post-sintesi può però generare una distribuzione non uniforme dei gruppi funzionali che vanno a legarsi principalmente sulla superficie esterna. Inoltre è possibile che l'innesto dei gruppi funzionali causi il restringimento o l'ostruzione dei pori [36].

La click chemistry consente di funzionalizzare particelle pre-modificate. Questa tecnica si basa su reazioni specifiche ed efficienti che consentono di accoppiare gruppi funzionali complementari sulla superficie della silice e sulle molecole target. Questa tecnica consente di preservare le biomolecole e avere un maggiore controllo sulle proprietà finali della silice [36].

L'assemblaggio elettrostatico consente, infine, di funzionalizzare le particelle di silice sfruttando le forze di attrazione tra cariche opposte. Questa tecnica permette di legare biomolecole sensibili alla superficie carica della silice preservando la bioattività. Le interazioni che si formano però sono deboli e necessitano di una adeguata densità di carica superficiale [36].

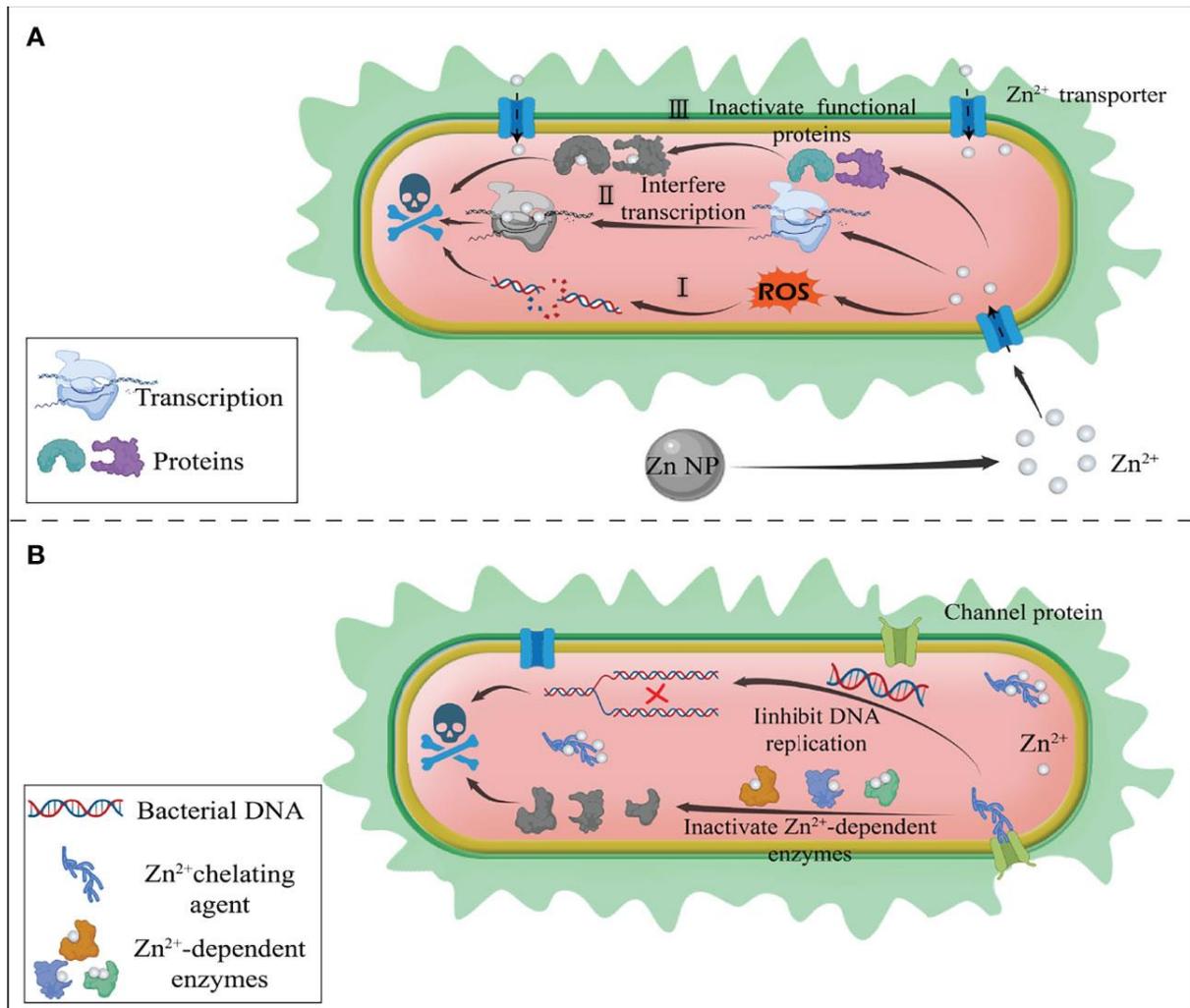
Tramite funzionalizzazione è possibile ottenere facilmente particelle di SM con proprietà antimicrobiche. Ciò è fondamentale se si desidera utilizzare questo materiale per applicazioni mediche o biologiche. La funzionalizzazione con ioni metallici ha permesso di ottenere dei risultati interessanti per quanto riguarda l'attività antimicrobica. Gli ioni metallici possiedono infatti proprietà che permettono loro di essere degli efficaci agenti antimicrobici contro una vasta gamma di batteri. Essi sono anche in grado di agire per un periodo di tempo ampio, sono materiali molto sicuri e poco tossici. Possono essere immobilizzati sulla superficie della SM tramite adsorbimento fisico o scambio ionico. La SM consente inoltre un rilascio controllato degli ioni metallici incorporati sulla sua superficie. Gli ioni argento, rame e zinco sono quelli più utilizzati come agenti antibatterici [3].

Gli ioni argento sono molto utilizzati perché possono agire su una vasta gamma di batteri come *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Questi presentano, inoltre, una bassa tossicità ed è possibile ottenere una buona attività antibatterica con un costo relativamente basso. Le nanoparticelle di argento tendono, però, a formare degli aggregati e questo difetto ne limita l'utilizzo [3]. Di recente, inoltre, è stato dimostrato che i batteri stanno diventando resistenti agli ioni argento e ne stanno di conseguenza riducendo la potenza antibatterica [37].

Anche gli ioni rame possono essere utilizzati come agenti antibatterici. Questi possiedono proprietà antibatteriche simili a quelle degli ioni argento ma, a differenza di questi ultimi, possiedono un costo inferiore e una capacità antibatterica superiore. Gli ioni rame esercitano la loro azione antibatterica rompendo inizialmente la membrana batterica esterna. Gli ioni rame entrano poi all'interno del microrganismo e lo inibiscono [3].

Gli ioni zinco sono ampiamente utilizzati come antibatterici. Il loro impiego è dovuto principalmente al meccanismo con cui essi interagiscono con i batteri per inibirli. Gli ioni zinco vengono infatti adsorbiti nelle pareti cellulari dei batteri generando, così, un eccesso di zinco all'interno del microrganismo. L'accumulo di zinco all'interno dei batteri è in grado di inibire gli enzimi respiratori. Questo genera una discrepanza nel trasferimento di elettroni della catena respiratoria che causa la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) come il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e i radicali idrossilici ( $\cdot OH$ ). Queste specie sono in grado di causare danni al DNA e inducono la perossidazione lipidica delle membrane. Il sovraccarico di ioni zinco genera anche altri effetti nocivi per il batterio in quanto interferisce nella regolazione trascrizionale batterica, inattiva le proteine funzionali causando una disfunzione metabolica e compromette la struttura e la funzione della membrana cellulare. La combinazione di tutti questi effetti conduce inevitabilmente alla morte i microrganismi colpiti. L'utilizzo degli ioni zinco deve però essere controllato perché questi ioni possono risultare tossici se rilasciati in maniera incontrollata [3], [37].

Il sovraccarico di zinco non è l'unico modo con cui è possibile utilizzare questi ioni per effettuare un'azione antibatterica. Si può, infatti, esercitare un effetto antibatterico limitando la quantità di ioni zinco a disposizione dei microrganismi. Privando i batteri degli ioni zinco si interrompe il processo di omeostasi di questo elemento. Di conseguenza, questi microrganismi non sono più in grado di svolgere i loro processi vitali perché vengono inibiti gli enzimi il cui funzionamento dipendeva dagli ioni zinco. Numerosi processi vitali sono coinvolti dal sequestro degli ioni zinco come la replicazione e stabilità del DNA o la regolazione di trascrizione, traduzione e stabilità strutturale della cromatina. La privazione degli ioni zinco permette anche di causare disfunzioni metaboliche destabilizzando proteine e cofattori essenziali dei batteri. Molti batteri patogeni, inoltre, utilizzano sistemi di trasporto specifici per ottenere ioni zinco dall'ambiente. La privazione dello zinco rende però questi sistemi inefficaci. La mancanza di questi ioni riduce, inoltre, l'adesione batterica e la capacità di causare malattie. Per ridurre la quantità di zinco a disposizione dei batteri si utilizzano molecole chelanti come l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) e l'aspergillomarasmine A (AMA). Queste molecole complessano selettivamente lo zinco impedendone l'utilizzo da parte dei batteri e consentono, inoltre, di inibire gli enzimi responsabili della resistenza agli antibiotici. Uno dei vantaggi di questa tecnica è quello di rendere i batteri più suscettibili ai farmaci. L'azione effettuata dagli agenti chelanti deve, però, essere mirata ai batteri ed evitare di causare effetti collaterali alle cellule umane. Uno degli svantaggi di questa tecnica è rappresentato dall'inefficacia di molti chelanti nei confronti dei batteri Gram-negativi a causa della natura della loro membrana esterna [37]. In Figura 2.4 sono riportati i meccanismi antibatterici basati su sovraccarico e privazione degli ioni zinco.



**Figura 2.4:** Meccanismi antibatterici degli ioni zinco. (A) Strategia del sovraccarico di ioni zinco. (B) Strategia della privazione di ioni zinco [37]

Si può esercitare un'azione battericida utilizzando lo zinco non solo in forma ionica ma anche sotto forma di ossido di zinco (ZnO). Anche il meccanismo battericida dell'ossido di zinco prevede la formazione di specie reattive dell'ossigeno, come  $O_2^-$ ,  $OH^-$  e  $H_2O_2$ . Il contributo principale all'azione antibatterica è effettuato dal perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Questa molecola, infatti, è in grado di perforare la membrana citoplasmatica e uccidere le cellule batteriche. Oltre alla formazione di ROS vengono anche rilasciati ioni zinco  $Zn^{2+}$ . L'azione combinata di ROS e ioni zinco consente un miglior effetto battericida. L'ossido di zinco possiede una tossicità adatta ad impedire la crescita microbica ma non risulta tossico per la salute umana, se somministrato in quantità limitata in quanto possiede una buona biocompatibilità con i tessuti umani. L'uso di quantità elevate di ossido di zinco può, però, causare effetti dannosi all'organismo ed è necessario quindi limitarne l'utilizzo [38].

L'implementazione degli ioni zinco sulla superficie della SM è stata oggetto di alcuni studi. *Majidi et al.* [39] hanno realizzato delle nanoparticelle di SM drogate con ioni zinco e funzionalizzate con gruppi carbossilici ( $-COOH$ ) tramite post-innesto. Lo scopo degli ioni zinco era quello di fornire un'azione antibatterica mentre la funzionalizzazione con i gruppi carbossilici era stata effettuata per incrementare l'attività emostatica. In effetti i campioni funzionalizzati presentavano prestazioni emostatiche migliori rispetto a quelle riportate dalla SM non funzionalizzata. I campioni ottenuti hanno agito attivando la via intrinseca della

cascata di coagulazione e favorendo l'adesione piastrinica. Nei test emostatici, inoltre, gli ioni zinco rilasciati hanno mostrato una potente attività battericida contro *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. I campioni funzionalizzati hanno mostrato una buona biocompatibilità ed emocompatibilità.

*Hou et al.* [40] hanno sintetizzato silicato di zinco-calcio mesoporoso per il controllo delle emorragie. I test effettuati hanno evidenziato le proprietà antibatteriche di questo materiale. In particolare, è stato mostrato che questo è in grado di inibire la crescita di microrganismi come *Escherichia coli*. Si è osservato, inoltre, che i rapporti antibatterici aumentavano con l'aumentare della quantità di materiale utilizzato. Il silicato prodotto ha presentato anche attività emostatica e questo lo rende promettente per il controllo delle emorragie.

*Caramella* [41] ha studiato come i metodi e le condizioni di sintesi delle particelle di SM caricate con ioni zinco potessero influire sul rilascio di questo metallo. Il nitrato di zinco esaidrato è stato il precursore impiegato. Lo studio ha rivelato che temperature di calcinazione più elevate hanno consentito un maggiore rilascio di ioni zinco a pH acido mentre, al contrario, questo diminuisce a pH neutro. Le temperature di calcinazione elevate permettono, quindi, di migliorare la stabilità degli ioni metallici nella struttura della silice riducendone il rilascio quando si trovano in condizioni fisiologiche. Lo studio ha inoltre evidenziato quale metodo di incorporazione dei precursori metallici fornisca i risultati migliori. Si è potuto osservare che il metodo di sintesi diretta ha permesso di ottenere particelle con un quantitativo di zinco superiore e una migliore distribuzione rispetto ai metodi di caricamento post-sintesi.

Lo zinco non possiede però solo un'azione antibatterica ma può anche contribuire nel processo di emostasi e favorire alcuni dei processi della coagulazione. Gli ioni zinco, infatti, favoriscono l'aggregazione piastrinica, modulano l'attività della trombina, favoriscono la polimerizzazione del fibrinogeno in fibrina e riducono la fibrinolisi per mantenere stabile il coagulo [42]. Gli ioni zinco sono, inoltre, in grado di accelerare la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti [37].

Sebbene l'ossido di zinco possa essere utilizzato come agente antibatterico, il suo utilizzo per applicazioni emostatiche può causare tempi di coagulazione maggiori. In uno studio effettuato da *Yang et al.* [43] sono stati valutati i tempi di coagulazione a seguito dell'utilizzo di nanoparticelle di ZnO. I risultati confermavano un allungamento del tempo di coagulazione. Le nanoparticelle di ossido di zinco sono infatti in grado di adsorbire i fattori di coagulazione rendendoli indisponibili per la cascata coagulativa. L'ossido di zinco, inoltre, riduce il potenziale di generazione della trombina. Nella realizzazione di materiali emostatici bisogna, quindi, valutare con attenzione l'utilizzo di ossido di zinco come agente battericida perché, sebbene fornisca al materiale proprietà antimicrobiche, può ridurre l'efficacia emostatica del materiale.

### 3. Materiali e metodi

In questo capitolo sono riportati i materiali utilizzati e i metodi impiegati per sintetizzare, funzionalizzare con gli ioni zinco, caratterizzare e testare i campioni di silice mesoporosa. Per la funzionalizzazione sono stati utilizzati tre diversi precursori dello zinco per verificare se la scelta del precursore possa incidere sulle proprietà del materiale. La caratterizzazione dei campioni consente di valutare se la funzionalizzazione causa modifiche alle caratteristiche del materiale. I test effettuati servono a verificare le proprietà emostatiche e antibatteriche dei campioni. Per quanto riguarda le proprietà antibatteriche, in particolare, sono stati effettuati dei test di tipo preliminare. Si tratta di test di rilascio degli ioni zinco che permettono di valutare la potenziale attività antibatterica dei campioni. Per accertare l'effettiva attività antibatterica sarà, tuttavia, necessario eseguire dei test di tipo biologico.

#### 3.1 Materiali

Acqua deionizzata (grado LC-MS) Merck®, Acido cloridrico (HCl, 37%) Sigma-Aldrich®, Cloruro di potassio (KCl, in polvere, cristallino,  $\geq 99\%$ ) Sigma-Aldrich®, 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®, Mesitilene (1,3,5-trimetilbenzene, C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>, 98%) Sigma-Aldrich®, Ortosilicato tetraetile (TEOS, Si<sub>3</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> 99,999%) Sigma-Aldrich®, Nitrato di zinco esaidrato (Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, in polvere, 98%) Sigma-Aldrich®, Acetato di zinco diidrato ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn · 2H<sub>2</sub>O, in polvere,  $\geq 98\%$ ) Sigma-Aldrich®, Cloruro di zinco (ZnCl<sub>2</sub>, in polvere,  $\geq 98\%$ ) Sigma-Aldrich®, Plasma bovino (Fonte SLCM4897) Sigma-Aldrich®, Cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub>, in polvere,  $>99,999\%$ ) Sigma-Aldrich®.

#### 3.2 Sintesi della silice mesoporosa

Per la sintesi della silice mesoporosa (SM) si utilizza il processo descritto da *Mohamed et al.* [4]. All'interno di un becher vengono inseriti 120 g di acqua distillata a temperatura ambiente. Si inseriscono poi 23,6 g di soluzione di acido cloridrico, 6,1 g di cloruro di potassio e 4 g di Pluronic P123. Il Pluronic P123 è l'agente templante che permetterà la formazione del modello micellare. La soluzione viene miscelata per 1 ora a 35°C alla velocità di 300 rpm tramite l'utilizzo di un agitatore magnetico. Al termine, vengono aggiunti alla soluzione 3 g di mesitilene affinché agisca come fattore rigonfiante. Dopo l'aggiunta del mesitilene, la soluzione viene lasciata in agitazione a 300 rpm e 35°C per altre 2 ore trascorse le quali vengono aggiunti 8,5 g di TEOS goccia a goccia. Il TEOS è la fonte di silicio che è stata scelta come precursore della silice. Una volta aggiunto il TEOS, la soluzione viene lasciata in agitazione a 500 rpm per 10 minuti a 35°C prima di essere trasferita in un bagno d'olio dove viene lasciata in condizioni statiche per 24 ore a 35°C. Al termine delle 24 ore, la temperatura del bagno d'olio viene aumentata fino a 100°C e la soluzione viene quindi lasciata a questa temperatura per altre 24 ore sempre in condizioni statiche. La soluzione viene poi filtrata tramite una pompa a vuoto utilizzando dei filtri di carta e acqua distillata. Al termine della filtrazione si ottiene una polvere che viene fatta riposare in stufa a 60°C per una notte con lo scopo di farla essiccare. Il giorno seguente la polvere viene sottoposta a calcinazione a 500°C per 6 ore con un aumento di temperatura ad una velocità di 1°C/min. L'obiettivo della calcinazione è la rimozione dell'agente templante utilizzato per la sintesi. Al termine della calcinazione il processo di sintesi è completato e ha permesso di ottenere circa 2 g di SM.

### 3.3 Funzionalizzazione con ioni zinco

Le particelle di SM precedentemente sintetizzate sono state funzionalizzate ottenendo diversi campioni che differiscono tra loro per i precursori dello zinco utilizzati. Sono stati impiegati, infatti, tre diversi precursori, ovvero il nitrato di zinco, l'acetato di zinco e il cloruro di zinco. Per ogni precursore sono stati ottenuti dei campioni funzionalizzati a diverse concentrazioni di zinco. Il processo di funzionalizzazione utilizzato è quello descritto da *Catillon-Mucherie et al.* [5] a cui sono state apportate delle modifiche dovute principalmente al precursore utilizzato e alla concentrazione di zinco desiderata.

#### **Funzionalizzazione con nitrato di zinco**

Utilizzando come precursore il nitrato di zinco sono stati realizzati tre campioni a tre diverse concentrazioni di zinco, ovvero al 5% (Nt-Zn 5%@SM), al 10% (Nt-Zn 10%@SM) e al 15% (Nt-Zn 15%@SM). Per Nt-Zn 5%@SM, l'impregnazione è avvenuta mescolando 0,1138 g di nitrato di zinco esaidrato con 0,4754 g di SM e aggiungendo successivamente 1,5 ml di acqua deionizzata. Per Nt-Zn 10%@SM si mescolano 0,2272 g di nitrato di zinco esaidrato, 0,4505 g di SM e successivamente 1,5 ml di acqua deionizzata mentre per Nt-Zn 15%@SM si mescolano 0,3422g di nitrato di zinco esaidrato, 0,4251 g di SM e in un secondo momento 1,5 ml di acqua deionizzata. Al termine dell'impregnazione, i tre campioni sono stati fatti riposare per 24 ore per rimuovere l'umidità. Trascorso questo tempo, i campioni sono stati inseriti in muffola per essere sottoposti a calcinazione a 500°C per 2 ore alla velocità di 1°C/min.

#### **Funzionalizzazione con acetato di zinco**

Utilizzando come precursore l'acetato di zinco sono stati preparati due campioni, rispettivamente al 5% (Ac-Zn 5%@SM) e al 10% (Ac-Zn 10%@SM) di concentrazione di ioni zinco. L'impregnazione di Ac-Zn 5%@SM è avvenuta mescolando 0,0844 g di acetato di zinco diidrato, 0,4755 g di SM e aggiungendo successivamente 1,5 ml di acqua deionizzata mentre quella di Ac-Zn 10%@SM con 0,1680 g di acetato di zinco diidrato, 0,4498 g di SM e in un secondo momento 1,5 ml di acqua deionizzata. Entrambi i campioni vengono poi lasciati a riposare per 24 ore e, successivamente, sottoposti a calcinazione secondo le stesse modalità dei campioni del nitrato di zinco.

#### **Funzionalizzazione con cloruro di zinco**

Anche per l'impregnazione con il cloruro di zinco sono stati realizzati due campioni, uno al 5% (Cl-Zn 5%@SM) e l'altro al 10% (Cl-Zn 10%@SM) di concentrazione di ioni zinco. Cl-Zn 5%@SM è stato ottenuto mescolando 0,1039 g di cloruro di zinco, 0,95 g di SM e aggiungendo successivamente 3 ml di acqua deionizzata mentre Cl-Zn 10%@SM si ottiene mescolando 0,2078 g di cloruro di zinco, 0,9 g di SM e, in un secondo momento, 3 ml di acqua deionizzata. Le quantità di campione realizzate sono il doppio rispetto ai campioni degli altri precursori perché metà dei campioni ottenuti dal cloruro di zinco subiscono lo stesso trattamento di calcinazione subito dagli altri campioni mentre l'altra metà viene sottoposta a lavaggio con acqua distillata. Questo permette di valutare come il diverso processo possa incidere sul prodotto finale.

## Campioni di riferimento

Sono stati prodotti due campioni di silice non funzionalizzata da utilizzare come riferimento. Per ognuno dei due campioni, 0,5 g di SM è stata mescolata con 1,5 ml di acqua deionizzata. Uno dei due campioni è stato poi sottoposto allo stesso processo di calcinazione utilizzato precedentemente mentre l'altro è stato sottoposto al trattamento di lavaggio adottato per i campioni funzionalizzati con cloruro di zinco. Questi due campioni sono stati preparati come riferimento per confrontare i campioni di silice funzionalizzata con campioni di silice non funzionalizzata che abbiano subito lo stesso processo.

### 3.4 Caratterizzazione

#### 3.4.1 Fisisorbimento di azoto

L'analisi di fisisorbimento di azoto è un'analisi che consente di ottenere informazioni sul materiale analizzato come la superficie specifica, la distribuzione dei pori, la dimensione media dei pori e il volume totale dei pori. Lo strumento con cui è stata effettuata è l'ASAP 2020 Plus della Micrometrics. L'analisi viene effettuata tramite l'utilizzo di azoto liquido. Per effettuare la misura è necessario utilizzare almeno 50 mg di polvere del campione da analizzare. Il processo di analisi prevede una fase iniziale di degasaggio a 150°C per 2 ore. Questa operazione preliminare consente la rimozione di eventuali sostanze adsorbite o inquinanti presenti sulla superficie delle particelle. La superficie specifica delle particelle è ottenuta utilizzando il modello BET (Brauner-Emmet-Teller). La distribuzione dei pori viene ricavata invece utilizzando il modello DFT (Density Functional Theory). Conoscendo la distribuzione dei pori si riesce poi a ricavare la loro dimensione media.

#### 3.4.2 Diffrazione a raggi X (XRD)

La diffrazione a raggi X è una tecnica utilizzata per analizzare materiali cristallini. Questa tecnica permette di effettuare analisi su questo tipo di materiali grazie all'alta frequenza e all'elevata capacità penetrativa dei raggi X. I raggi X possiedono, infatti, una lunghezza d'onda comparabile con la distanza che separa i piani cristallini dei materiali. Quando questi raggi vengono emessi verso il campione, si verifica il fenomeno della diffrazione che devia il fascio di raggi X incidente. Un detector posizionato all'estremità opposta dello strumento rileva il fascio di raggi X diffratto e ne misura l'intensità. Dai dati raccolti dal detector si ottiene un grafico, chiamato diffrattogramma, che mette in relazione il doppio dell'angolo tra il fascio e il materiale ( $2\theta$ ) e l'intensità del fascio. Nel diffrattogramma i materiali cristallini presentano dei picchi per valori di angolo specifici del materiale mentre i materiali amorfi non producono alcun picco specifico [44]. Lo strumento utilizzato per effettuare la diffrazione a raggi X è il diffrattometro Panalytical X'Pert<sup>3</sup> Powder (Cu K $\alpha$  radiation). Tale strumento possiede un portacampioni in alluminio in cui viene inserita la polvere di SM da analizzare. L'analisi viene effettuata per valori dell'angolo  $2\theta$  che vanno da 5° a 60°.

#### 3.4.3 Microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo FESEM e spettroscopia EDX

La microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo (FESEM) è una tecnica di microscopia che permette l'osservazione diretta del campione analizzato. La spettroscopia EDX (Energy Dispersive X-ray Spectrometry) invece è una tecnica spettroscopica che permette di ottenere informazioni che riguardano la composizione del campione. Sia per la

microscopia FESEM che per la spettroscopia EDX è stato utilizzato lo strumento FESEM Zeiss Merlin. Prima dell'analisi è stato necessario procedere con la metallizzazione dei campioni con platino. Sono state ottenute delle immagini con ingrandimenti delle particelle da 1000X fino a 100000X. La microscopia FESEM utilizza un catodo a emissione di campo per generare un fascio di elettroni che penetra nel campione e consente l'imaging ad alta risoluzione e alto contrasto delle caratteristiche del campione. La spettroscopia EDX utilizza un fascio di elettroni accelerato incidente sul campione. Il fascio di elettroni è in grado di eccitare gli atomi del campione che emettono raggi X. I raggi X emessi dagli atomi vengono rilevati da un detector ed analizzati per ottenere informazioni sulla composizione [45].

#### 3.4.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è una tecnica microscopica che si basa sull'utilizzo di un fascio di elettroni ad alta energia per esaminare la struttura interna dei materiali a livello atomico. L'utilizzo di elettroni e della loro lunghezza d'onda estremamente corta (circa 2 pm) consente di ottenere una forte interazione con la materia e di poter analizzare volumi di materiale molto piccoli. L'utilizzo di lenti elettromagnetiche che focalizzano gli elettroni trasmessi e diffusi consente di ottenere sia immagini della struttura interna del materiale che il pattern di diffrazione [46]. Lo strumento utilizzato per effettuare questo tipo di analisi è TALOS F200X, prodotto da Thermo Scientific.

#### 3.4.5 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) è una tecnica che permette di identificare gruppi funzionali o atomi presenti nel campione analizzato. Questa tecnica utilizza la radiazione infrarossa per far emettere ai gruppi funzionali presenti nel materiale uno spettro caratteristico che ne permette l'identificazione. Questo spettro viene rappresentato su un grafico che mette in relazione il numero d'onda della radiazione con l'assorbanza. Lo strumento usato è lo spettrofotometro Bruker Equinox 55 con detector MCT, con risoluzione di  $2\text{ cm}^{-1}$  e raffreddamento ad azoto liquido. Per analizzare il campione è necessario realizzare, tramite l'utilizzo di una pressa idraulica, una pastiglia contenente la polvere del campione. Dopo aver inserito la pastiglia in una bustina d'oro dotata di un foro centrale, questa viene alloggiata in una cella con finestre di KBr permeabili ai raggi infrarossi. Il campione viene degasato a 0,1 Pa per 30 minuti a temperatura ambiente e, infine, inserito nello spettrofotometro dove avviene l'analisi.

### 3.5 Test emostatici

I test emostatici servono a valutare l'attività emostatica dei campioni di SM realizzati. I test vengono effettuati utilizzando plasma bovino, di cui viene valutato il tempo di coagulazione. La procedura utilizzata è quella descritta da *Mohamed et al.* [4]. All'inizio 2,5 mg di campione vengono inseriti all'interno di una provetta eppendorf. La provetta viene riscaldata a  $37^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti. Trascorso questo tempo, 0,25 ml di plasma bovino vengono inseriti all'interno della provetta che viene, quindi, nuovamente riscaldata a  $37^{\circ}\text{C}$  per 3 minuti prima di aggiungere 25  $\mu\text{l}$  di soluzione di  $\text{CaCl}_2$  0,2 M. L'aggiunta del  $\text{CaCl}_2$  permette di avviare il processo di coagulazione. Si inizia a misurare il tempo di coagulazione nel momento in cui viene aggiunto il  $\text{CaCl}_2$ ; il test termina quando si ottiene la coagulazione del plasma. Ogni minuto la provetta viene ribaltata per verificare se la coagulazione è stata completata. La coagulazione è considerata completa quando il plasma smette di essere fluido e di scorrere liberamente. Viene effettuato anche un test di riferimento, chiamato "controllo", in cui non

viene inserito nessun campione all'interno della provetta eppendorf. Il test di controllo permette di valutare il tempo di coagulazione che si ottiene in assenza di alcun tipo di materiale emostatico.

### *3.6 Rilascio ioni zinco*

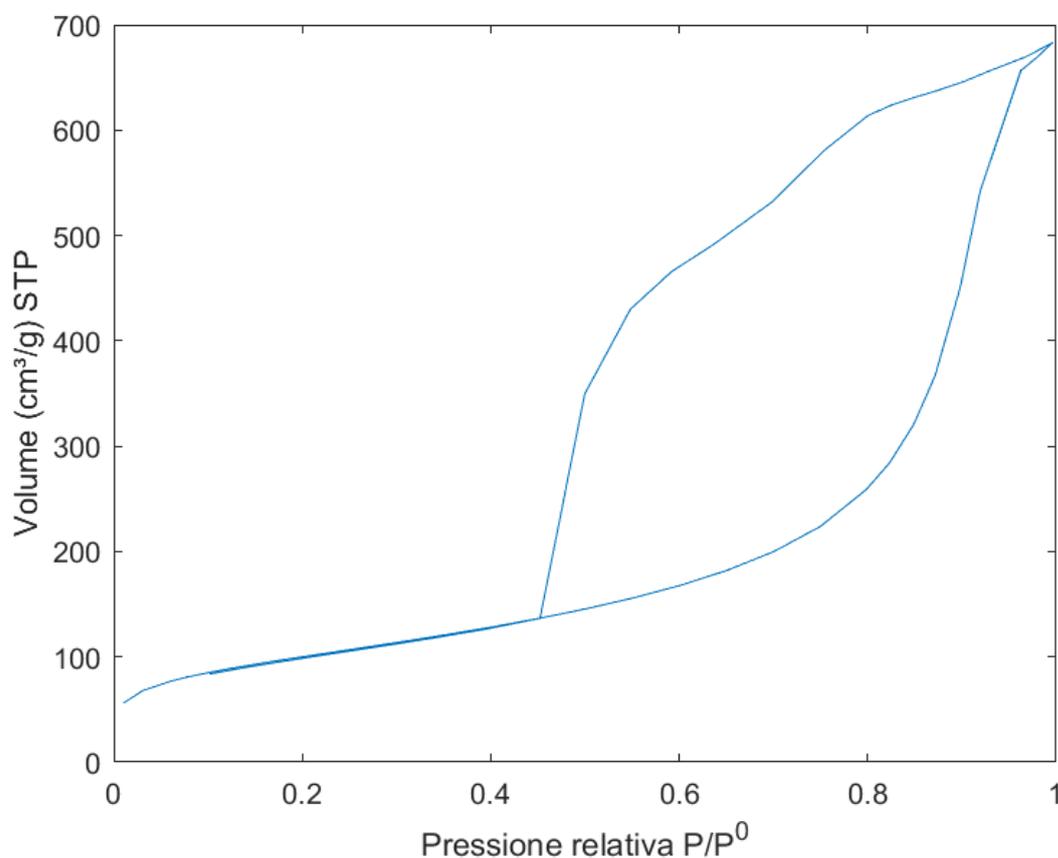
Per valutare in via preliminare le potenziali proprietà antimicrobiche dei campioni di SM ottenuti, è necessario valutare se questi sono in grado di rilasciare gli ioni zinco presenti sulla loro superficie. A tal scopo, sono stati effettuati dei test di rilascio utilizzando la procedura descritta da *Donnadio et al.* [47] con alcune variazioni. Inizialmente 20 ml di una soluzione di NaCl 0,9% w/v vengono inseriti all'interno di un becher. L'utilizzo di questa soluzione permette di simulare il comportamento dei campioni a contatto con un fluido corporeo. All'interno del becher vengono poi aggiunti 40 mg di campione. La soluzione contenente il campione viene, quindi, lasciata in agitazione a 300 rpm per 24 ore ad una temperatura di 37°C. Trascorso questo tempo, il contenuto del becher viene centrifugato per 15 minuti a 4000 rpm. Il processo di centrifugazione consente la separazione delle particelle solide dalla soluzione liquida. La soluzione viene successivamente analizzata tramite spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) per misurare la concentrazione di ioni zinco presente all'interno. Conoscendo la concentrazione degli ioni zinco in soluzione è quindi possibile valutare la capacità di rilascio del campione testato. Le particelle solide separate dalla centrifugazione vengono, invece, analizzate tramite diffrazione a raggi X per identificare la presenza di eventuali sostanze cristalline (come ad esempio dei sali) sulla superficie dei campioni.



## 4. Risultati

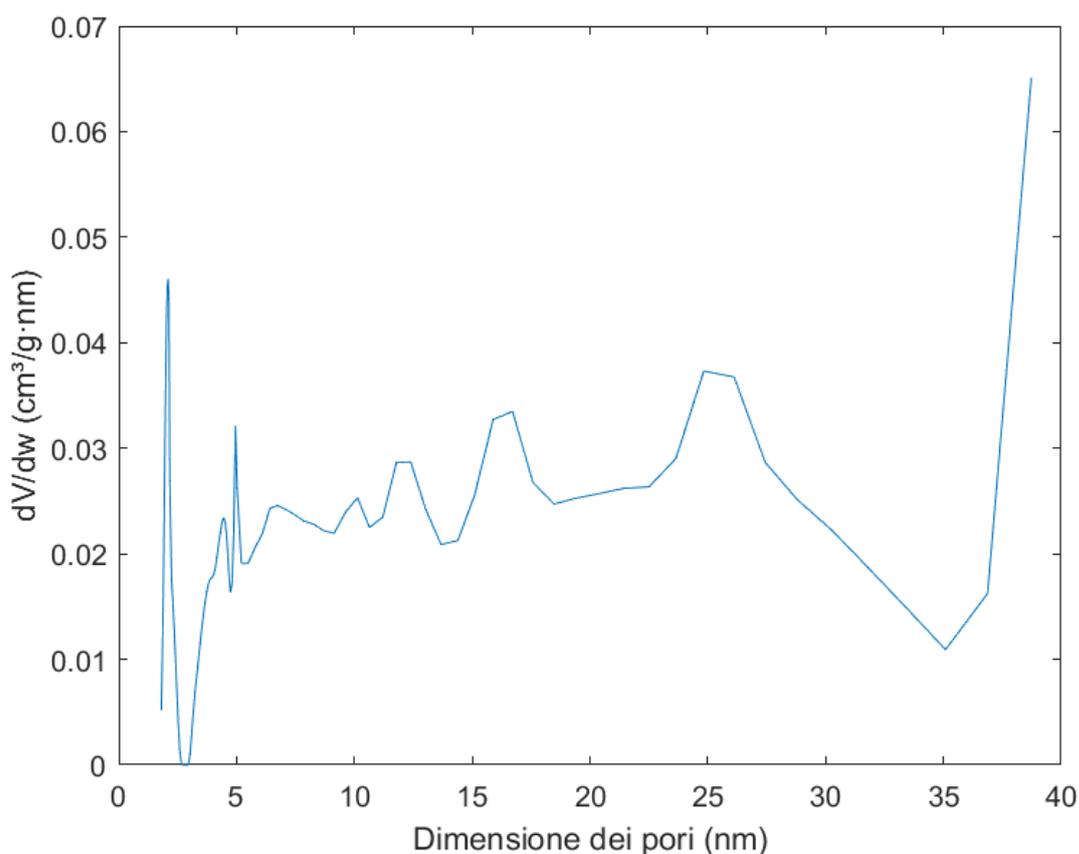
### 4.1 Caratterizzazione di SM

L'analisi di fisisorbimento di azoto ha permesso di ottenere le isoterme di adsorbimento e desorbimento del campione di SM. Le isoterme sono riportate nella Figura 4.1. Le isoterme ottenute sono di tipo IV(a) secondo la classificazione IUPAC. Questo tipo di isoterme è quello tipico dei materiali adsorbenti mesoporosi in cui la condensazione capillare è accompagnata da isteresi. Il coppia di isteresi può essere ricondotto al tipo H2. Questa tipologia è associata a una struttura dei pori complessa con una distribuzione della larghezza del collo molto ampia ed è tipica di alcuni tipi silice mesoporosa o delle schiume di silice mesocellulare [48].



**Figura 4.7:** Isoterme di adsorbimento e desorbimento di azoto di SM ricavate tramite fisisorbimento di azoto

Tramite l'analisi di fisisorbimento di azoto è stata ricavata anche la distribuzione dei pori, riportata nella Figura 4.2. Per ricavare la distribuzione dei pori è stato utilizzato il modello DFT. I risultati ottenuti identificano una distribuzione eterogenea in cui sono presenti diversi picchi come quelli a 17 e 25 nm.



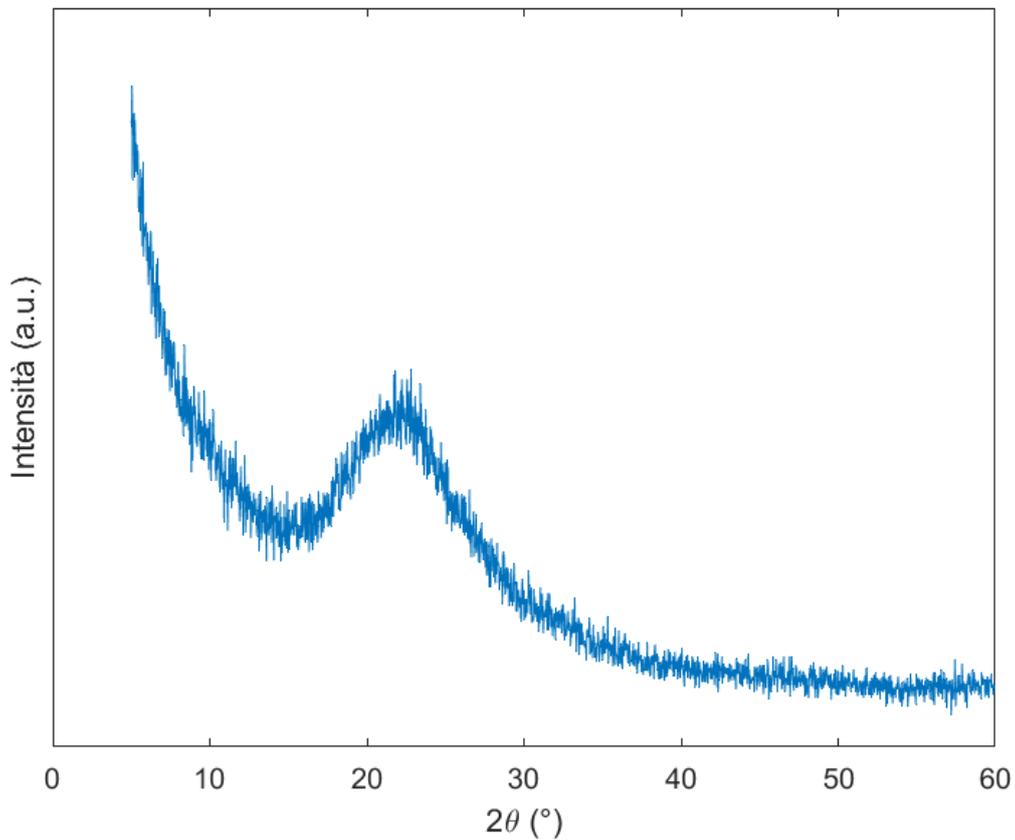
**Figura 4.8:** Distribuzione della dimensione dei pori di SM secondo il modello DFT

L'analisi di fisisorbimento di azoto ha permesso anche di ottenere i valori di area superficiale specifica e di volume poroso del campione di SM utilizzando la teoria BET. I valori sono riportati nella Tabella 4.1.

**Tabella 4.1:** Area superficiale e volume poroso di SM

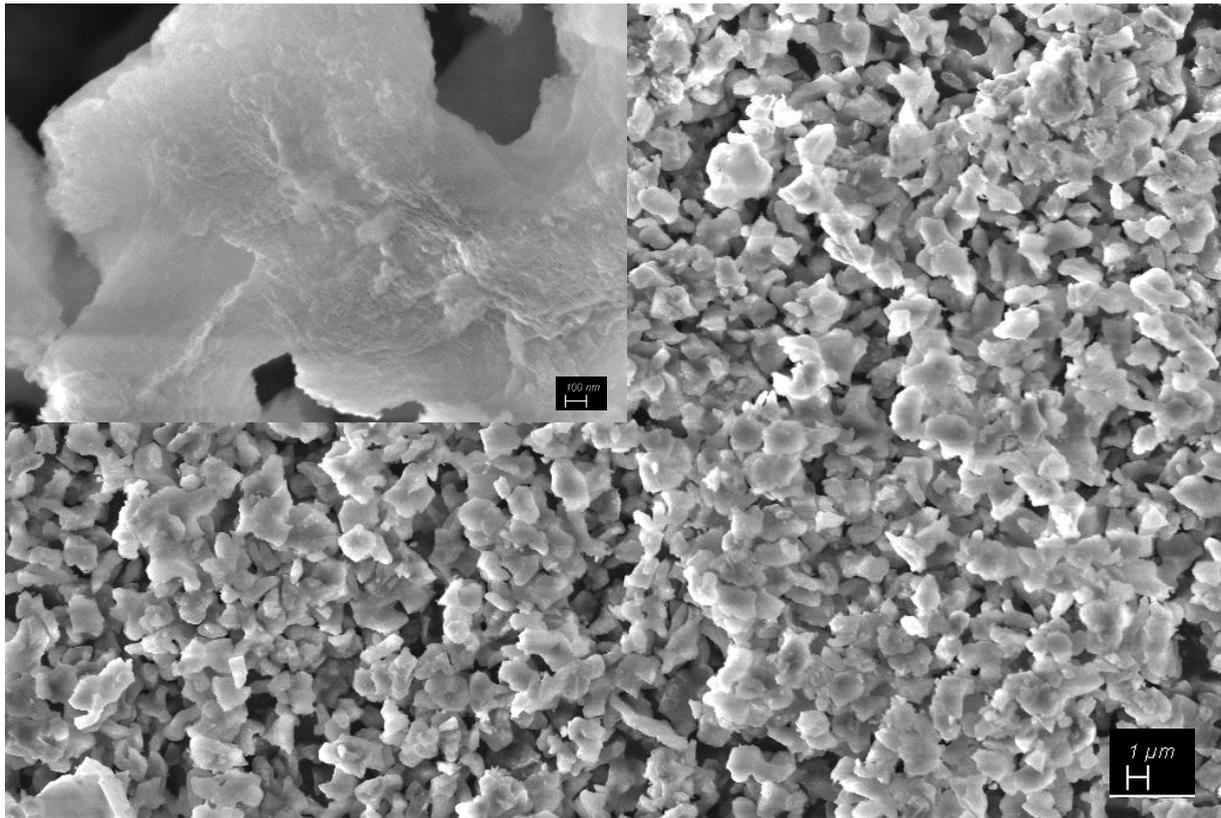
Campione	Area superficiale (m <sup>2</sup> /g)	Volume poroso (cm <sup>3</sup> /g)
SM	361	1,02

Tramite diffrazione a raggi X è stata effettuata un'analisi per valutare la presenza di eventuali materiali cristallini sulla silice amorfa come, ad esempio, residui di sali utilizzati in fase di sintesi. La diffrazione a raggi X è stata effettuata per valori di  $2\theta$  compresi tra  $5^\circ$  e  $60^\circ$ . I risultati dell'analisi sono riportati in Figura 4.3. La curva ottenuta presenta solo un alone allargato caratteristico dei materiali amorfi. Inoltre, non sono visibili picchi attribuibili a sostanze cristalline. Questi risultati confermano la natura amorfa del materiale sintetizzato.



**Figura 4.9:** Spettro XRD di SM

Le particelle di SM sono state valutate tramite microscopia a scansione elettronica a emissione di campo (FESEM). L'analisi ha permesso di ottenere immagini a diversi ingrandimenti. In Figura 4.4 sono riportate le immagini effettuate a ingrandimenti di 5000X e 100000X. Da queste si può osservare che le particelle ottenute presentano morfologie e dimensioni diverse tra loro.



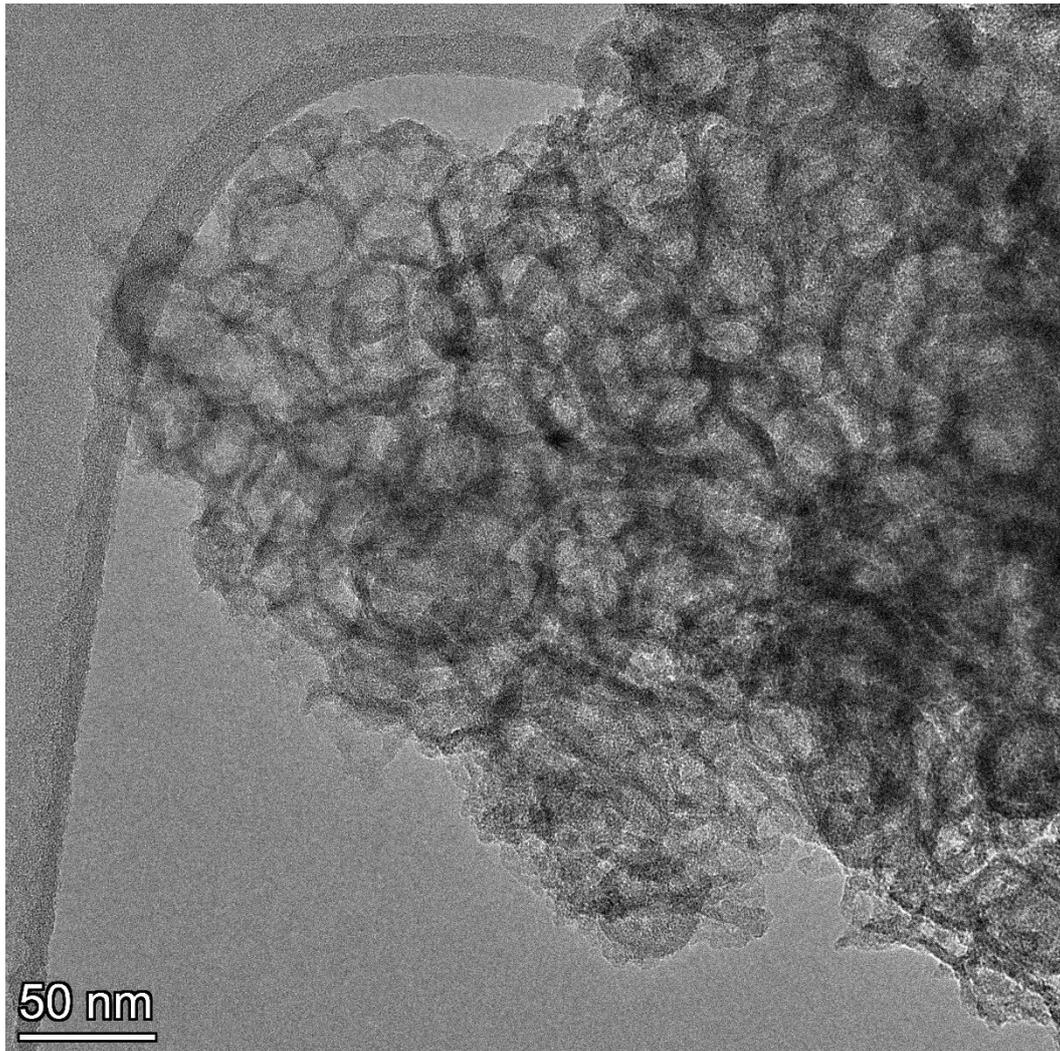
**Figura 4.10:** Immagini FESEM di SM con ingrandimento 100000X e scala 100 nm nell'immagine in alto a sinistra e ingrandimento 5000X e scala 1 μm nell'altra immagine

Utilizzando lo stesso strumento impiegato per la microscopia FESEM è stato possibile effettuare la spettroscopia EDX per conoscere la composizione di SM. Nella Tabella 4.2 sono riportati i risultati ottenuti. Come si poteva ipotizzare, i campioni sono costituiti principalmente da silicio e ossigeno. Nei campioni sono però presenti tracce di cloro e potassio, riconducibili, probabilmente, a residui provenienti dal processo di sintesi.

**Tabella 4.2:** Composizione di SM ricavata tramite spettroscopia EDX

Elemento	SM
O	61.36
Si	37.66
Cl	0.17
K	0.81
Totale	100

Le particelle di SM sono state sottoposte anche a microscopia elettronica a scansione (TEM) che ha permesso di ottenere immagini come quella riportata in Figura 4.5 dove si può notare un'organizzazione casuale dei pori e una struttura complessa ed eterogenea che rende difficile valutare la dimensione dei pori tramite TEM. Osservando questa struttura si può ipotizzare che i campioni di SM ottenuti siano delle schiume di silice mesocellulare [21]. Questa ipotesi può essere avvalorata anche dalla forma delle isoterme ottenute dall'analisi di fisisorbimento di azoto (Figura 4.1), tipica di questo tipo di particelle [48].



**Figura 4.11:** Immagine di SM ricavata tramite microscopia TEM

#### *4.2 Caratterizzazione di Nt-Zn X%@SM*

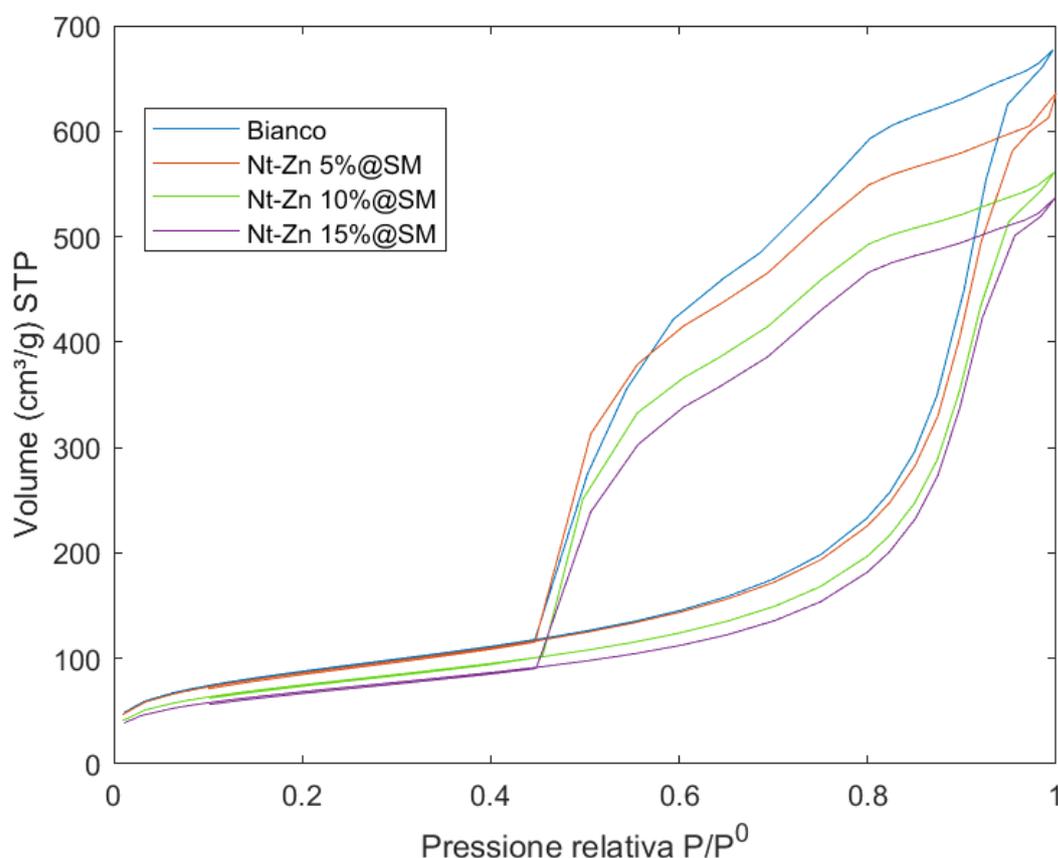
In questa sezione verranno confrontati i tre campioni ottenuti a seguito dell'impregnazione con il nitrato di zinco. Il confronto avverrà anche con un campione definito "bianco" che è stato ottenuto a partire da campioni di SM che hanno subito lo stesso processo di impregnazione subito dai campioni funzionalizzati ma in assenza di nitrato di zinco.

Per quanto riguarda l'analisi di fisisorbimento di azoto, è stato osservato che il processo di impregnazione ha ridotto i valori di area superficiale e volume poroso dei tre campioni funzionalizzati e del bianco rispetto ai valori ottenuti per SM (Tabella 4.1). I valori di area superficiale e volume poroso di questi campioni sono riportati in Tabella 4.3. Da questi dati è possibile anche notare che maggiore è la quantità di zinco maggiore è la diminuzione dell'area superficiale e del volume poroso. Questa diminuzione può essere causata dagli ioni zinco che sono stati adsorbiti sulla superficie della silice riempiendo i pori del materiale.

**Tabella 4.3:** Area superficiale e volume poroso dei campioni funzionalizzati con nitrato di zinco e del rispettivo bianco

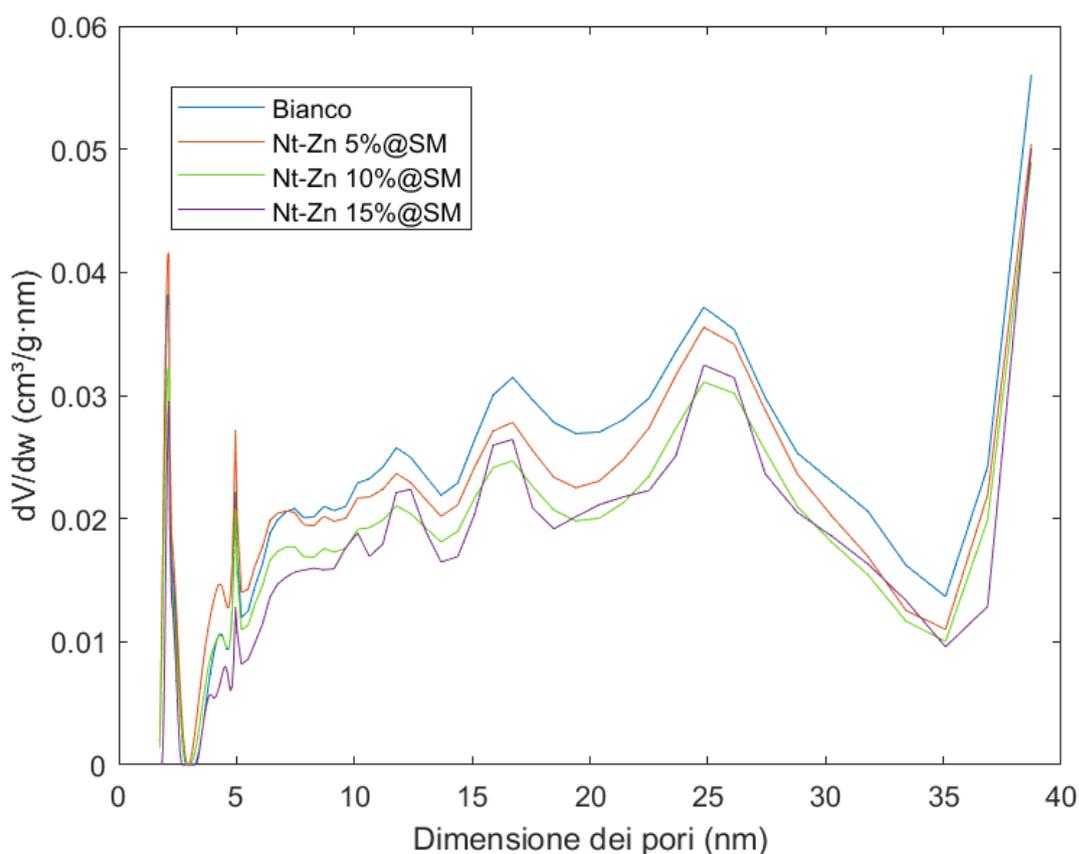
Campione	Area superficiale (m <sup>2</sup> /g)	Volume poroso (cm <sup>3</sup> /g)
Bianco	319	0,97
Nt-Zn 5%@SM	313	0,90
Nt-Zn 10%@SM	271	0,80
Nt-Zn 15%@SM	248	0,78

Le isoterme ottenute dall'analisi di fisisorbimento di azoto sono riportate in Figura 4.6. Le isoterme ottenute sono comparabili con quelle di SM. Possono essere, infatti, ricondotte al tipo IV(a) e possiedono un coppia di isteresi riconducibile a H2. La funzionalizzazione con nitrato di zinco non ha quindi causato modifiche alla forma delle isoterme.



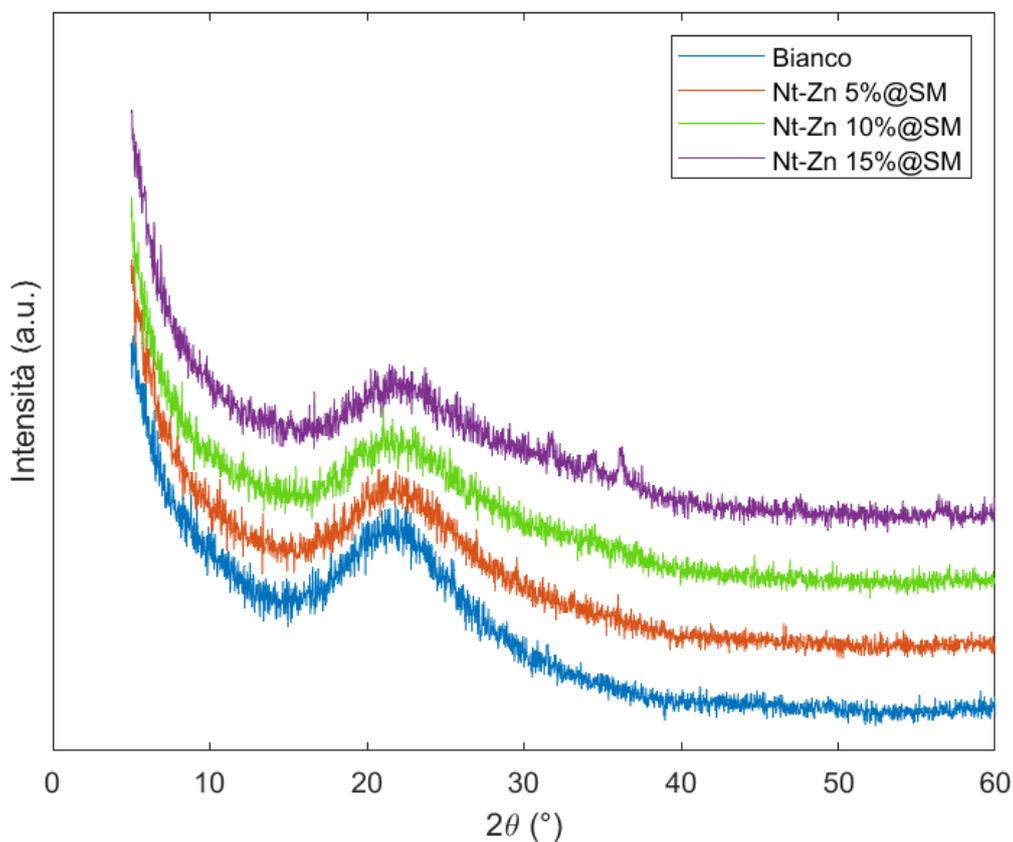
**Figura 4.12:** Isoterme di adsorbimento e desorbimento di azoto di Nt-Zn X%@SM e del rispettivo bianco

Anche per quanto riguarda la distribuzione dei pori, l'analisi di fisisorbimento di azoto ha permesso di ottenere delle distribuzioni simili a quella di SM per tutti i campioni. Le distribuzioni dei pori dei campioni ottenuti dal nitrato di zinco e il bianco sono riportate in Figura 4.7.



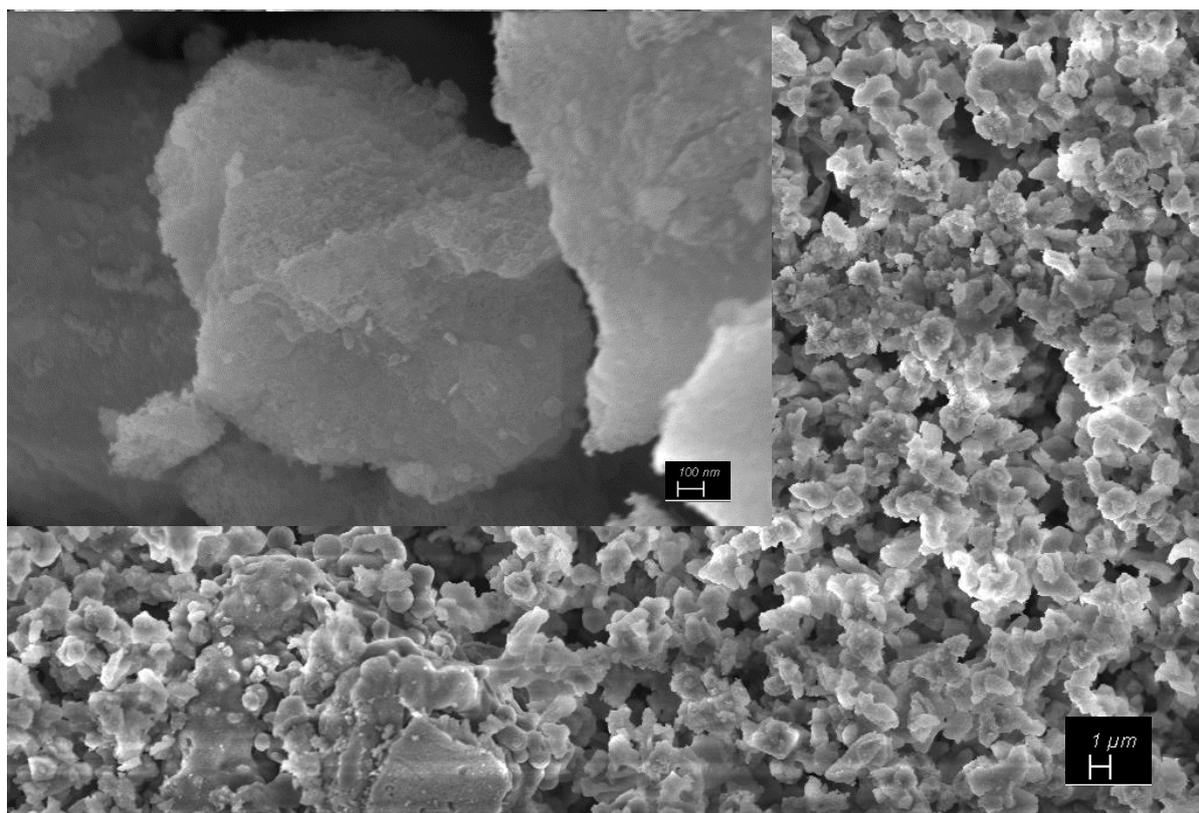
**Figura 4.13:** Distribuzione della dimensione dei pori di Nt-Zn X%@SM e del bianco secondo il modello DFT

Tramite diffrazione a raggi X sono stati analizzati i campioni funzionalizzati per verificare se il processo di impregnazione ha portato alla formazione di sostanze cristalline. Gli spettri ottenuti dall'analisi XRD sono riportati in Figura 4.8 e mostrano che è possibile osservare dei picchi per valori di  $2\theta$  compresi tra  $30^\circ$  e  $40^\circ$ . Questi picchi sono particolarmente visibili sul campione Nt-Zn 15%@SM mentre non sono evidenti negli altri campioni anche a causa del rumore di fondo. Analizzando la posizione dei picchi è stato possibile identificare il materiale cristallino che li ha generati; si tratta di ossido di zinco (ZnO) che si è formato durante il processo di funzionalizzazione.



**Figura 4.14:** Spettri XRD di Nt-Zn X%@SM e del bianco

Per quanto riguarda l'analisi tramite microscopia FESEM, l'unico campione derivante dal nitrato di zinco analizzato è Nt-Zn 10%@SM. Le immagini ottenute sono riportate in Figura 4.9. Il confronto con quelle ottenute con i campioni di SM (Figura 4.4) non mostra differenze significative per quanto riguarda dimensione e morfologia delle particelle. La funzionalizzazione con nitrato di zinco non ha quindi causato alcuna variazione di queste caratteristiche.



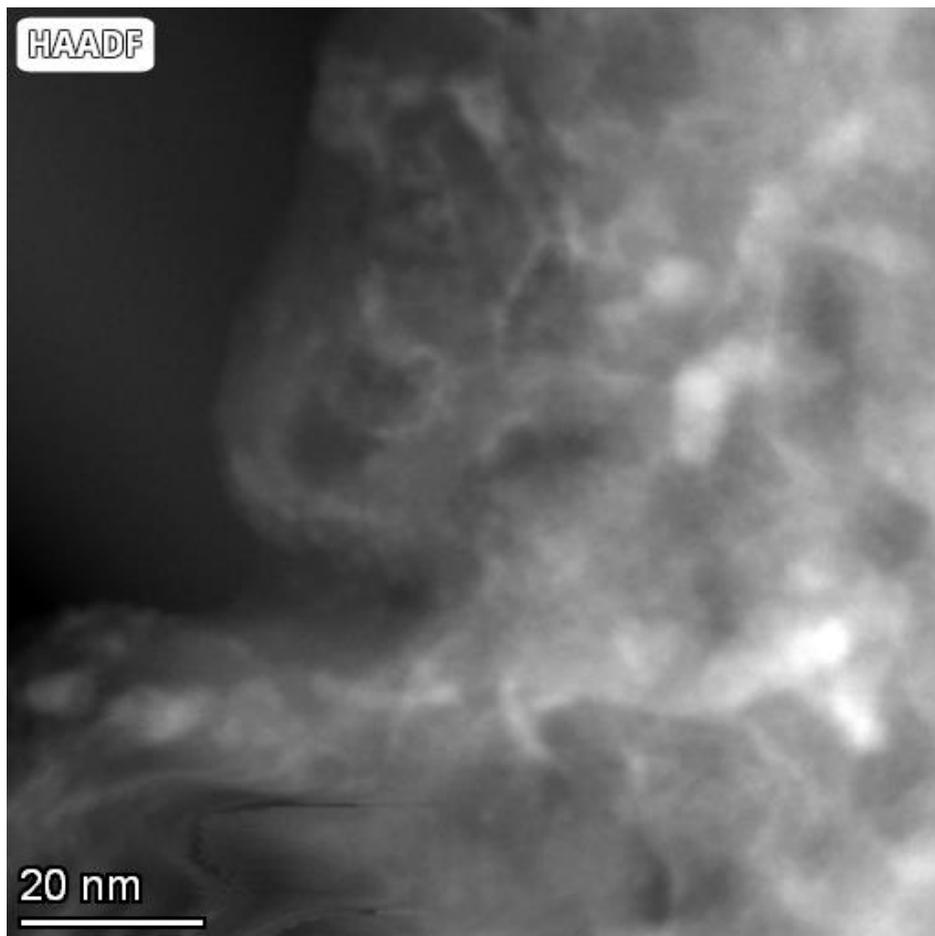
**Figura 4.15:** Immagini FESEM di Nt-Zn 10%@SM con ingrandimento 100000X e scala 100 nm nell'immagine in alto a sinistra e ingrandimento 5000X e scala 1 μm nell'altra immagine

Per Nt-Zn 10%@SM è stata effettuata un'analisi tramite spettroscopia EDX. I risultati sono riportati in Tabella 4.4. Dall'analisi è possibile osservare che Nt-Zn 10%@SM presenta una percentuale di zinco pari a 9,8%, valore molto vicino al valore nominale del 10%, confermando il successo della tecnica di impregnazione adottata. Analizzando la composizione di Nt-Zn 10%@SM e del bianco è, inoltre, possibile osservare che questi campioni presentano le stesse impurezze presenti in SM (Tabella 4.2). La funzionalizzazione non ha quindi apportato ulteriori impurezze nel campione.

**Tabella 4.4:** Composizione di Nt-Zn 10%@SM e del bianco ricavata tramite spettroscopia EDX

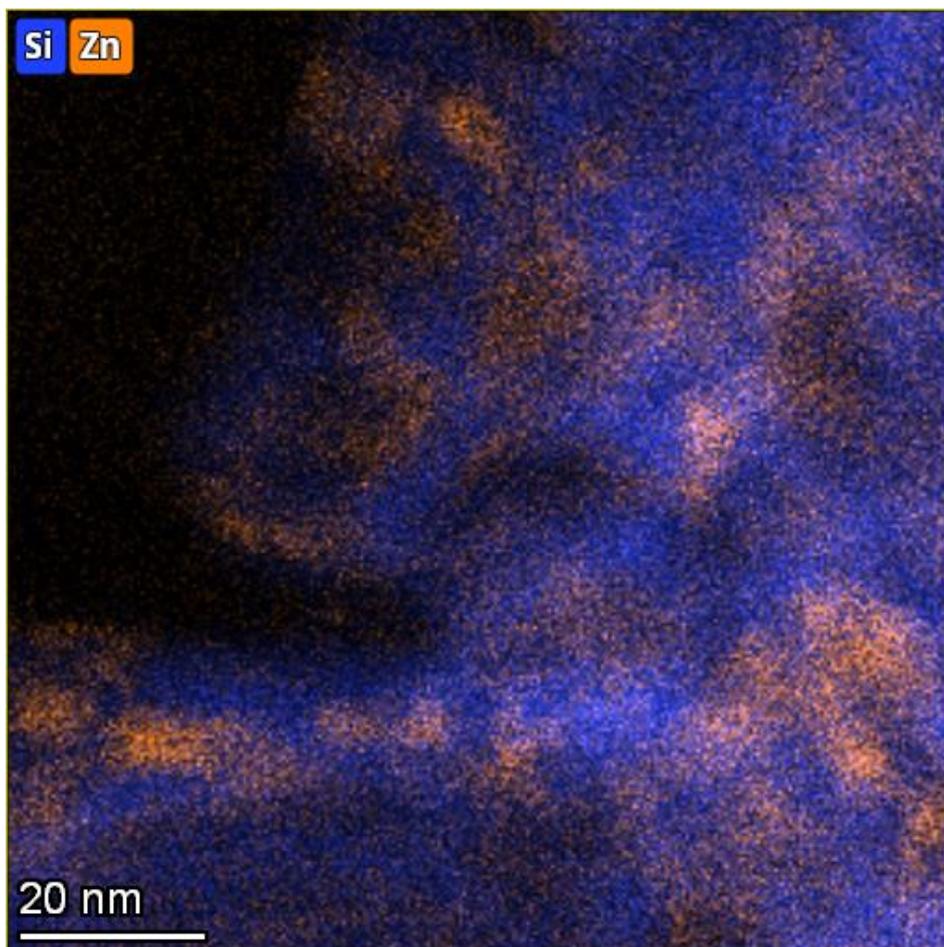
Elemento	Bianco	Nt-Zn 10%@SM
O	66.04	58,27
Si	33.15	31.16
Cl	0.14	0.12
K	0.67	0.65
Zn	0	9.8
Totale	100	100

Nt-Zn 10%@SM è stato analizzato anche tramite microscopia TEM. In Figura 4.10 è possibile osservare l'immagine di un ingrandimento effettuato sul campione. Se confrontata con l'immagine ottenuta per SM (Figura 4.5), non si osservano differenze significative.



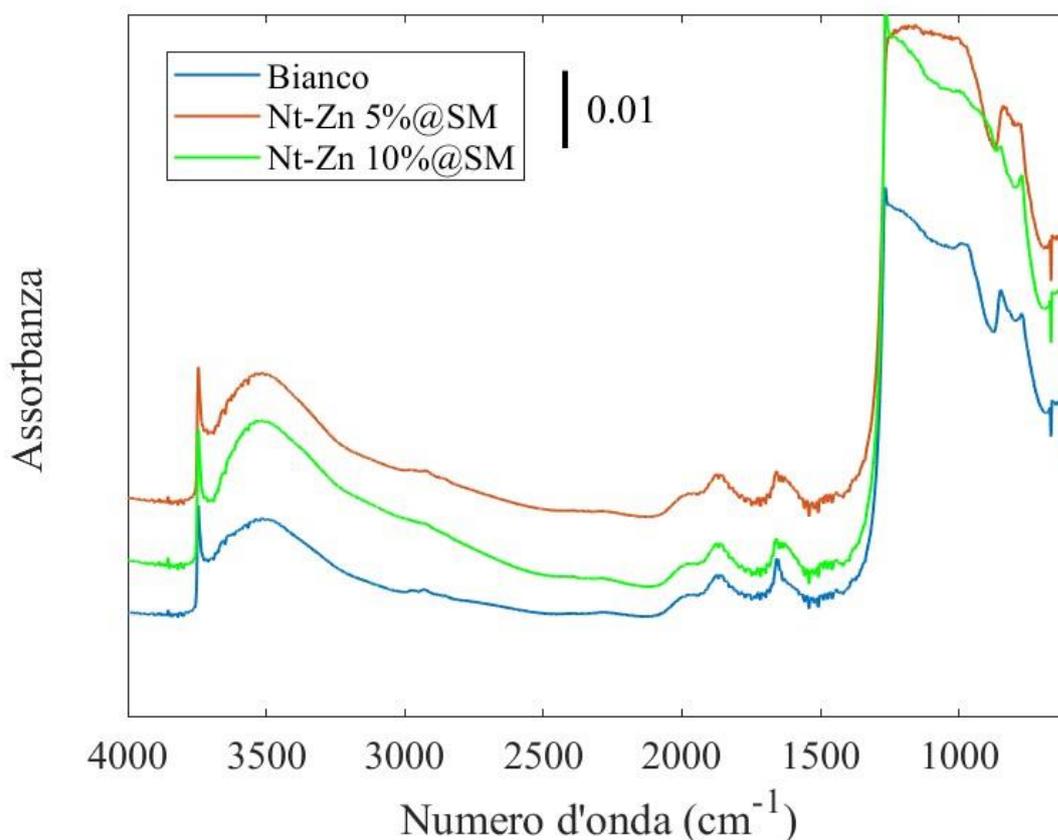
**Figura 4.16:** Immagine di Nt-Zn 10%@SM ricavata tramite microscopia TEM

Dalla microscopia TEM è possibile ottenere informazioni sulla composizione e la distribuzione degli atomi nel campione. Nella Figura 4.11 è riportata la distribuzione di silicio e zinco in Nt-Zn 10%@SM. Dalla figura è possibile osservare che lo zinco è stato distribuito su tutta la superficie della particella. Sono presenti però zone in cui lo zinco è molto concentrato. Queste potrebbero essere cluster di ossido di zinco di dimensione attorno ai 10 nm che si sono formati sulla superficie della particella durante la funzionalizzazione.



**Figura 4.17:** Distribuzione di Si e Zn in Nt-Zn 10%@SM ottenuta tramite TEM

I campioni funzionalizzati con nitrato di zinco sono stati analizzati tramite spettroscopia FT-IR. In Figura 4.12 sono riportati gli spettri ottenuti per Nt-Zn 5%@SM, Nt-Zn 10%@SM e il bianco. Osservando i grafici non sono presenti evidenze riguardo la presenza di nitrati che non sono quindi rimasti presenti nei campioni a seguito della funzionalizzazione. Nei tre spettri è possibile notare un picco stretto intorno a  $3750\text{ cm}^{-1}$  dovuto alla vibrazione di stretching dei silanoli isolati e una banda larga con picco intorno a  $3500\text{ cm}^{-1}$  dovuta allo stretching dei silanoli interagenti per legame a idrogeno [49]. Tra i tre campioni non si notano differenze significative a riguardo dell'intensità e della posizione dei picchi prima menzionati.



**Figura 4.18:** Spettri FT-IR di Nt-Zn 5%@SM, Nt-Zn 10%@SM e il bianco

### 4.3 Caratterizzazione di Ac-Zn X%@SM

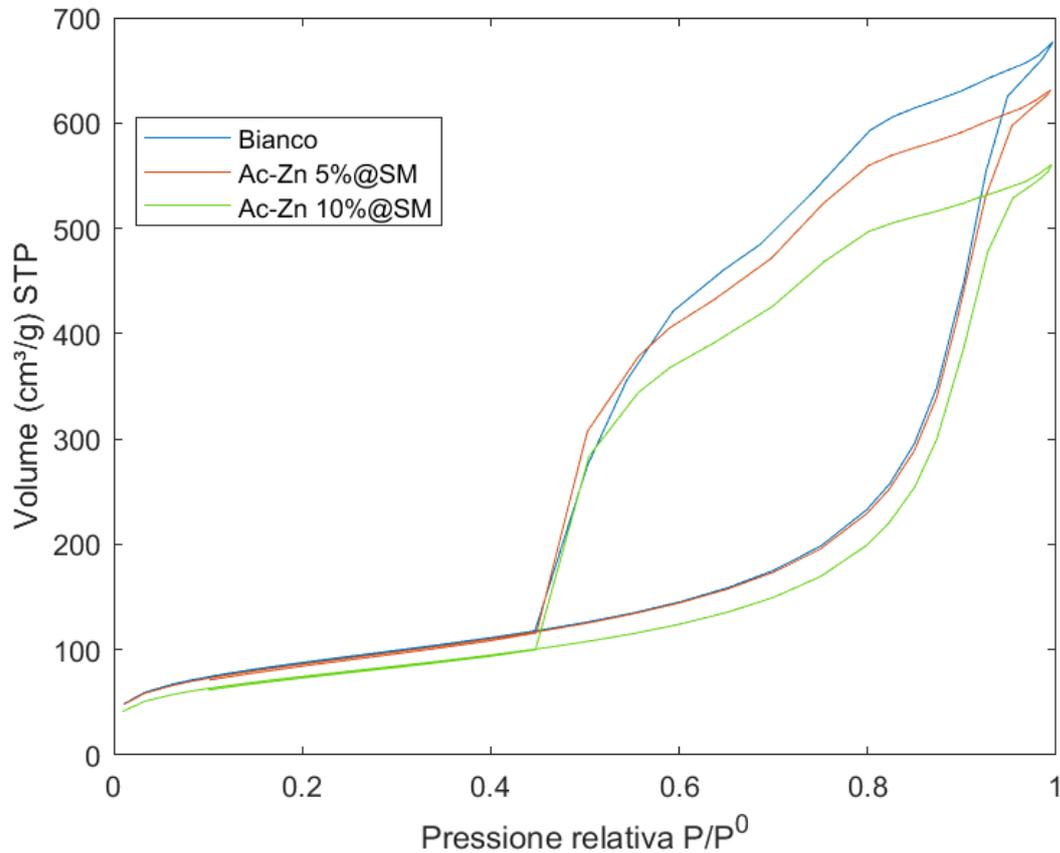
Per i campioni realizzati utilizzando l'acetato di zinco sono state effettuate le stesse analisi effettuate su quelli funzionalizzati con il nitrato di zinco. Poiché la tecnica di impregnazione è la stessa per entrambi i precursori, anche per i campioni derivati dall'acetato di zinco è stato utilizzato lo stesso bianco.

L'analisi di fisisorbimento di azoto ha permesso di ottenere i valori di area superficiale e volume poroso riportati nella Tabella 4.5. Anche in questo caso si osserva una diminuzione dell'area superficiale e del volume poroso con l'aumentare della concentrazione di ioni zinco. Se si confrontano i valori ottenuti per l'acetato di zinco con quelli ottenuti con il nitrato di zinco (Tabella 4.3) a parità di concentrazione, si possono osservare valori molto simili sia per l'area superficiale che per il volume poroso.

**Tabella 4.5:** Area superficiale e volume poroso dei campioni funzionalizzati con acetato di zinco e del rispettivo bianco

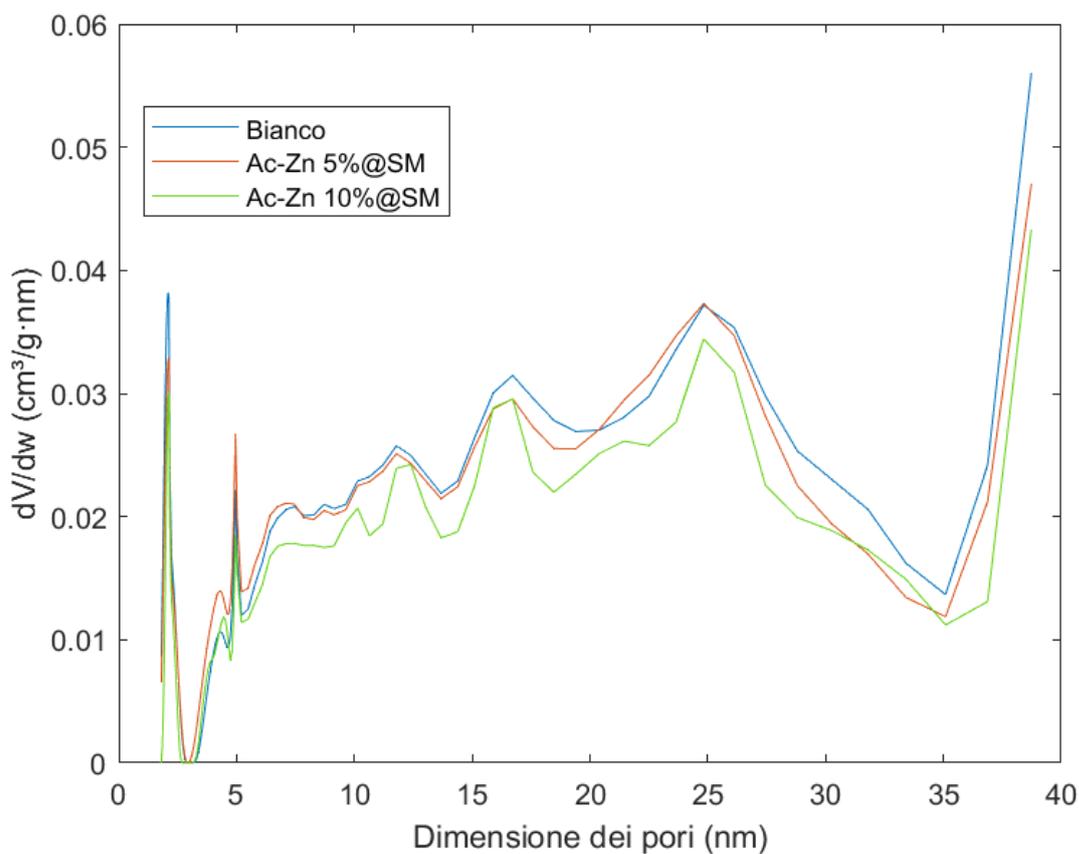
Campione	Area superficiale (m <sup>2</sup> /g)	Volume poroso (cm <sup>3</sup> /g)
Bianco	319	0,97
Ac-Zn 5%@SM	313	0,92
Ac-Zn 10%@SM	270	0,82

Tramite l'analisi di fisisorbimento di azoto sono state ottenute anche le isoterme di adsorbimento-desorbimento dei campioni funzionalizzati con acetato di zinco (Figura 4.13). L'analisi dei risultati mostra che le isoterme presentano la stessa tipologia e lo stesso coppia di isteresi già osservati nei campioni precedenti (Figure 4.1 e 4.6).



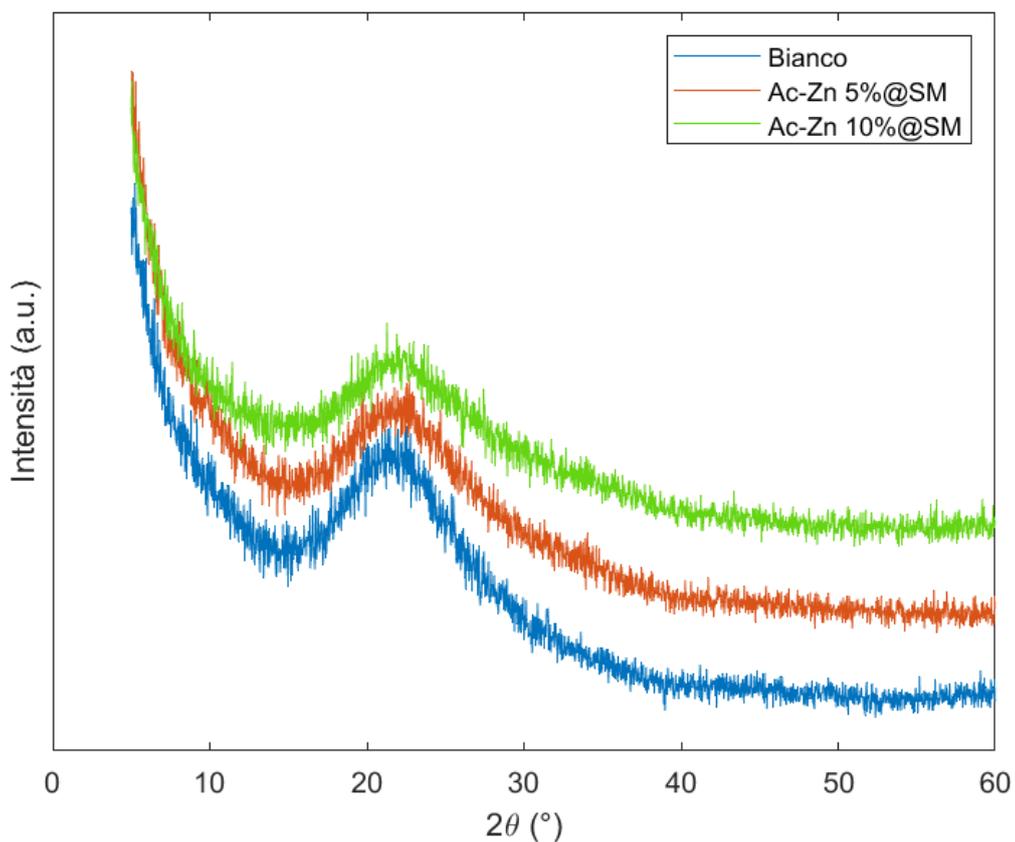
**Figura 4.19:** Isotherme di adsorbimento e desorbimento di azoto di Ac-Zn X%@SM e del rispettivo bianco

Anche la distribuzione dei pori ottenuta per i campioni dell'acetato di zinco e riportata in Figura 4.14, mostra risultati simili a quelli osservati in precedenza (Figure 4.2 e 4.7).



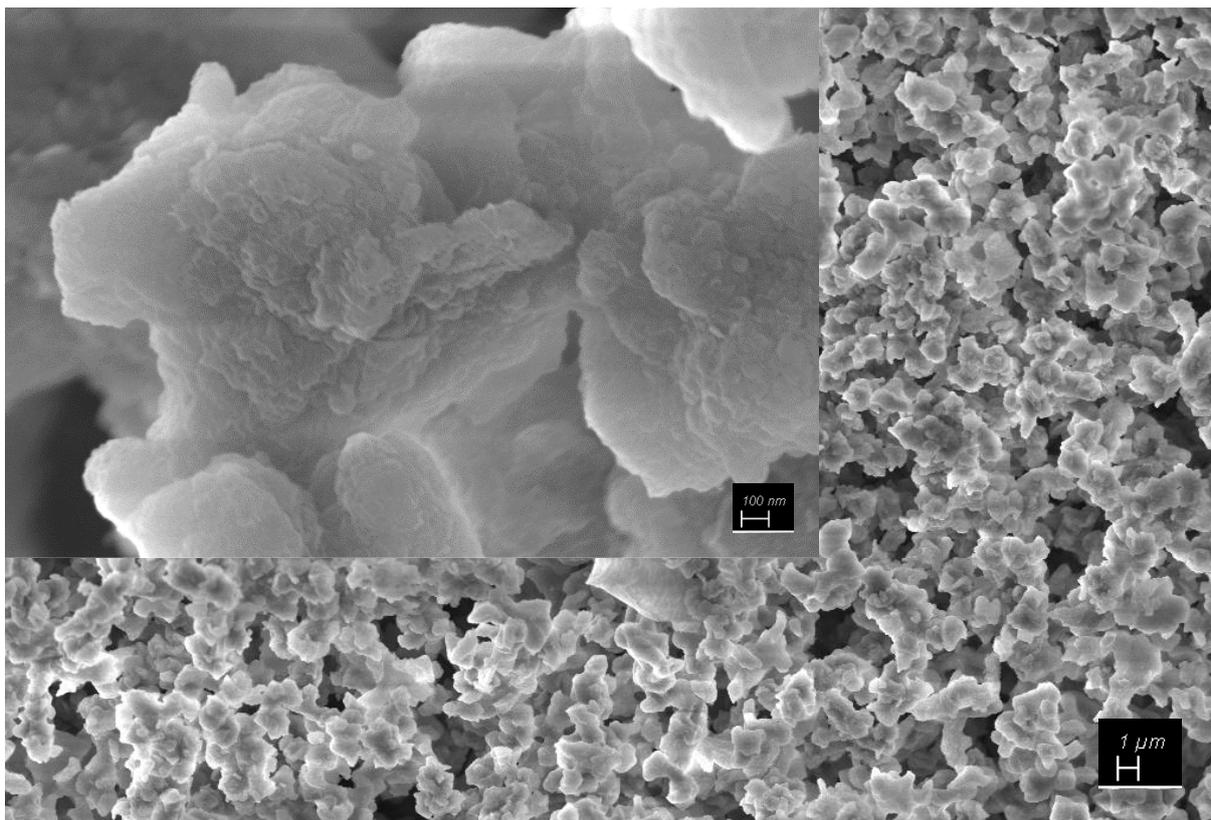
**Figura 4.20:** Distribuzione della dimensione dei pori di Ac-Zn X%@SM e del bianco secondo il modello DFT

La Figura 4.15 riporta i risultati delle analisi tramite diffrazione a raggi X condotte sui campioni funzionalizzati con acetato di zinco. Gli spettri ottenuti non riportano picchi evidenti. Tuttavia, la presenza di ossido di zinco non è da escludere dal momento che la presenza di questo composto è stata rilevata nei campioni funzionalizzati con nitrato di zinco.



**Figura 4.21:** Spettri XRD di Ac-Zn X%@SM e del bianco

Il campione Ac-Zn 10%@SM è stato analizzato tramite microscopia FESEM e le immagini ottenute sono state riportate in Figura 4.16. Non si osservano differenze significative per quanto riguarda morfologia e dimensione rispetto ai campioni di SM e Nt-Zn 10%@SM (Figure 4.4 e 4.9).



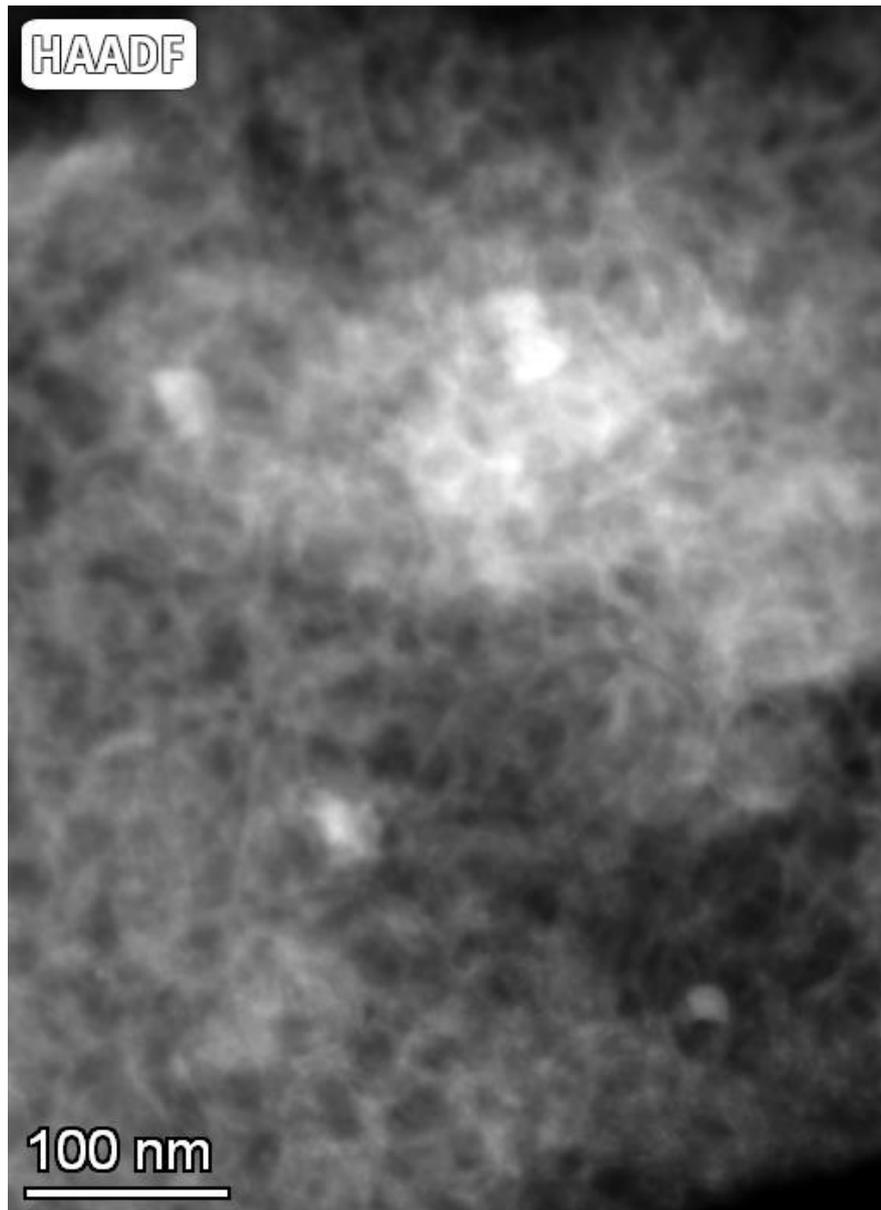
**Figura 4.22:** Immagini FESEM di Ac-Zn 10%@SM con ingrandimento 100000X e scala 100 nm nell'immagine in alto a sinistra e ingrandimento 5000X e scala 1 μm nell'altra immagine

Ac-Zn 10%@SM è stato sottoposto anche a spettroscopia EDX per verificarne la composizione. I risultati sono riportati in Tabella 4.6. La percentuale di zinco misurata nel campione è pari a 10,14%, valore molto simile a quello nominale (10%) e ciò conferma il buon esito del processo di impregnazione. Anche per Ac-Zn 10%@SM si può notare la presenza delle stesse impurezze identificate nei campioni precedentemente analizzati (Tabelle 4.2 e 4.4).

**Tabella 4.6:** Composizione di Ac-Zn 10%@SM e del bianco ricavata tramite spettroscopia EDX

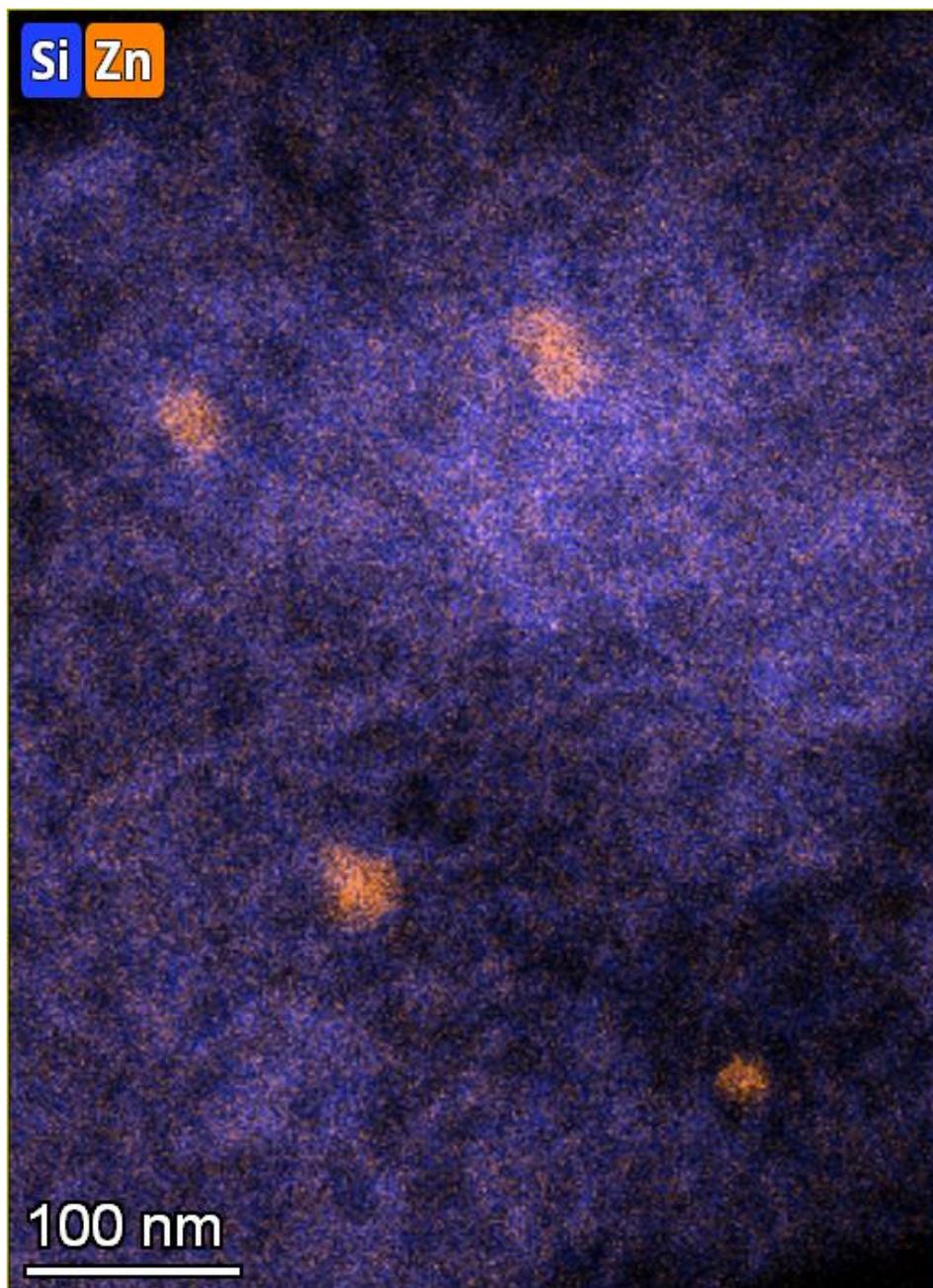
Elemento	Bianco	Ac-Zn 10%@SM
O	66.04	54.46
Si	33.15	34.48
Cl	0.14	0.17
K	0.67	0.75
Zn	0	10.14
Totale	100	100

Ac-Zn 10%@SM è stato osservato tramite microscopia TEM (Figura 4.17). Dal confronto con le immagini degli altri campioni (Figure 4.5 e 4.10) non si notano differenze significative.



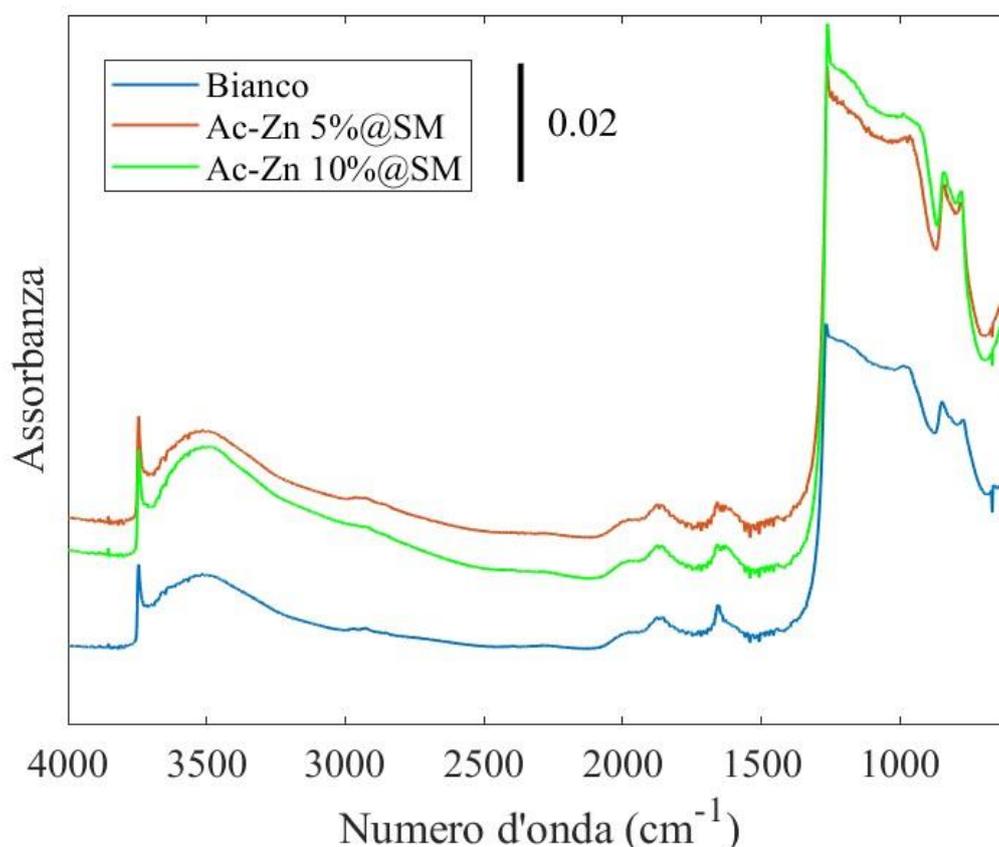
**Figura 4.23:** Immagine di Ac-Zn 10%@SM ricavata tramite microscopia TEM

Tramite microscopia TEM è stato possibile ottenere anche informazioni sulla composizione e sulla disposizione degli atomi presenti sulle particelle di Ac-Zn 10%@SM. In Figura 4.18 è riportata la disposizione del silicio e dello zinco sulla superficie del campione. È possibile osservare la presenza dello zinco su tutta la particella. Inoltre, anche nel campione Ac-Zn 10%@SM sono presenti zone in cui lo zinco è molto più concentrato. Come già osservato per Nt-Zn 10%@SM (Figura 4.11) l'impregnazione potrebbe aver causato la formazione di cluster di ossido di zinco sulla superficie della particella. A differenza di Nt-Zn 10%@SM, però, le dimensioni dei cluster ottenuti su Ac-Zn 10%@SM sono maggiori e si aggirano attorno a valori di circa 30 nm.



**Figura 4.24:** Distribuzione di Si e Zn in Ac-Zn 10%@SM ottenuta tramite TEM

I campioni funzionalizzati con acetato di zinco sono stati, infine, sottoposti ad analisi tramite spettroscopia FT-IR (Figura 4.19). Nei campioni non sono presenti evidenze riguardo la presenza di acetati rimasti sulle particelle in altre forme a seguito della funzionalizzazione. Anche per questi campioni si possono osservare il picco dei silanoli isolati e la banda dei silanoli interagenti. Confrontando inoltre i campioni ottenuti dall'acetato di zinco con quelli ottenuti dal nitrato di zinco (Figura 4.12) non si osservano differenze significative per quanto riguarda la popolazione ossidrilica.



**Figura 4.25:** Spettri FT-IR di Ac-Zn 5%@SM, Ac-Zn 10%@SM e il bianco

#### 4.4 Caratterizzazione di Cl-Zn X%@SM

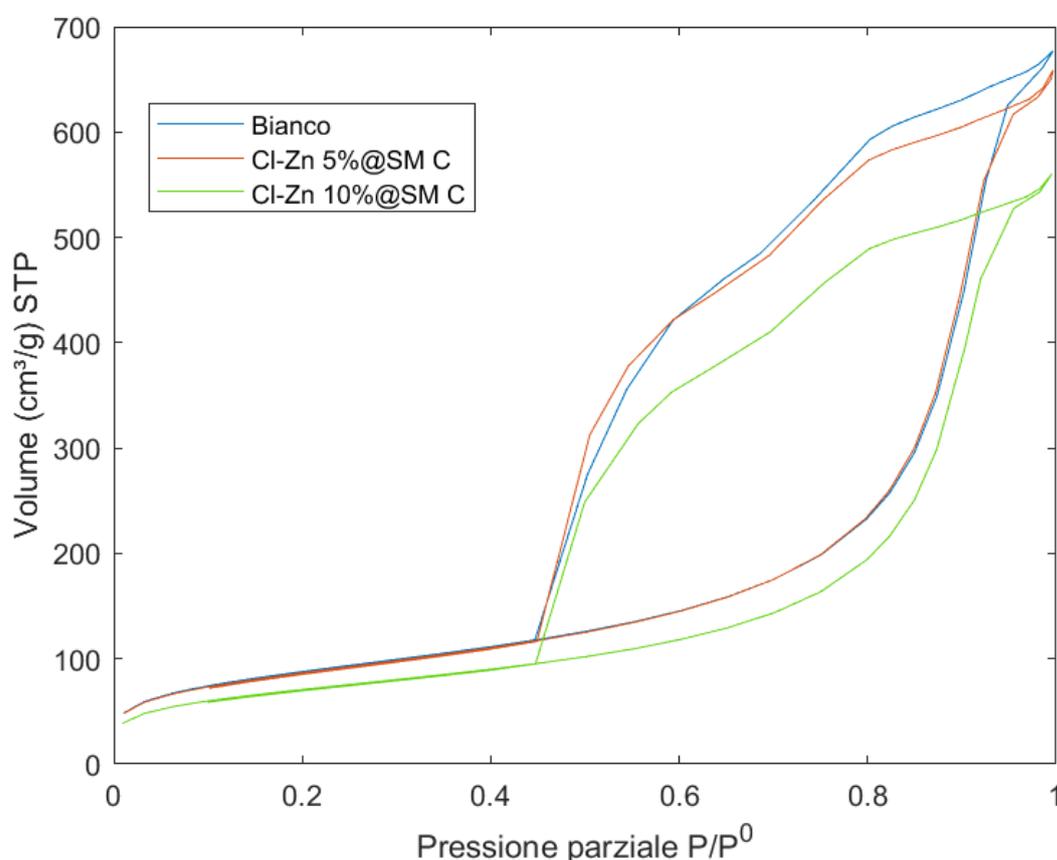
Per quanto riguarda i campioni preparati utilizzando come precursore il cloruro di zinco, verrà fatta una distinzione tra quelli ottenuti tramite calcinazione e quelli ottenuti tramite lavaggio. Verranno, infatti, presentati prima i campioni calcinati (identificati con la lettera “C”) e successivamente quelli lavati (identificati con la lettera “L”). Per entrambe le tipologie sono state effettuate le stesse analisi condotte sui campioni ottenuti con gli altri precursori dello zinco. Per i campioni calcinati il bianco utilizzato come riferimento è lo stesso utilizzato per quelli derivati da nitrato e acetato di zinco mentre per i campioni lavati è stato preparato un altro bianco che ha subito lo stesso processo di impregnazione e lavaggio ma in assenza di cloruro di zinco.

I campioni calcinati, questi sono stati sottoposti all’analisi di fisisorbimento di azoto da cui sono stati ottenuti i valori di area superficiale e volume poroso riportati in Tabella 4.7. Anche in questo caso si può osservare che l’incremento di concentrazione di ioni zinco ha causato una riduzione dell’area superficiale e del volume poroso.

**Tabella 4.7:** Area superficiale e volume poroso dei campioni funzionalizzati con cloruro di zinco e calcinati e del rispettivo bianco

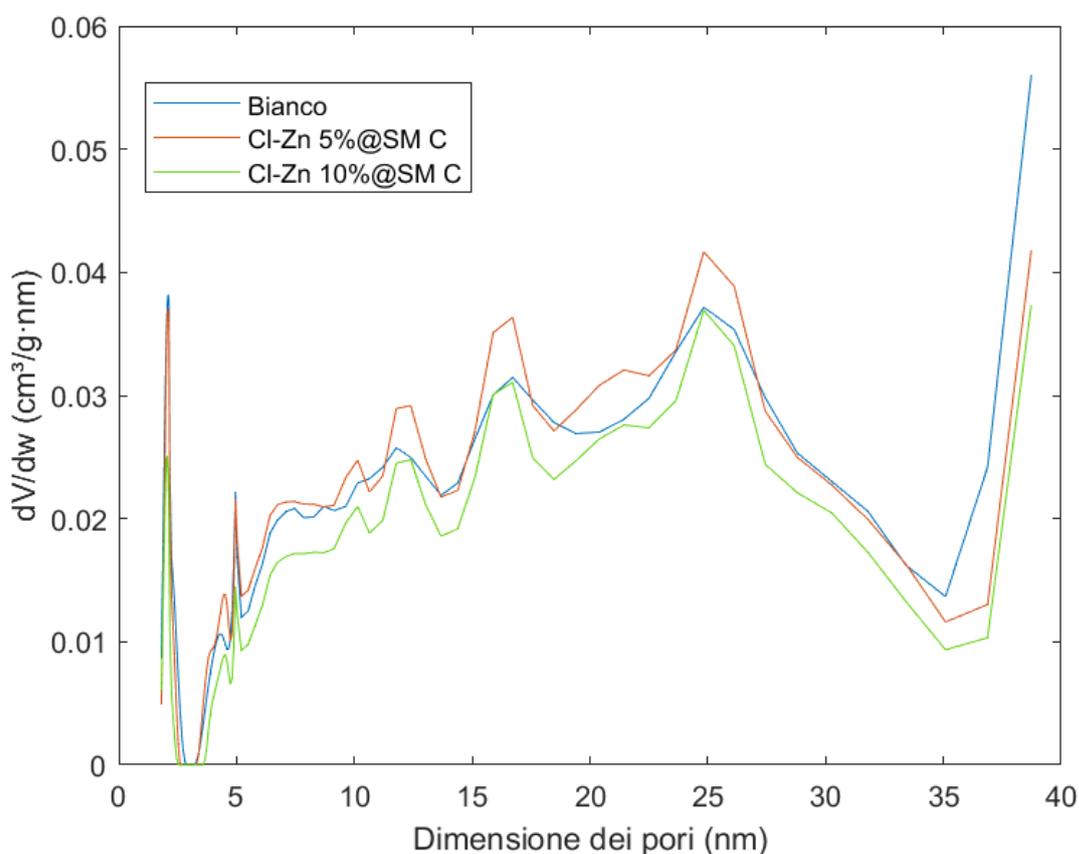
Campione	Area superficiale (m <sup>2</sup> /g)	Volume poroso (cm <sup>3</sup> /g)
Bianco	319	0,97
Cl-Zn 5%@SM C	314	0,95
Cl-Zn 10%@SM C	256	0,82

Dall'analisi di fisisorbimento di azoto sono state ottenute anche le isoterme di adsorbimento-desorbimento dei campioni calcinati (Figura 4.20). Non si notano significative differenze rispetto alle isoterme ottenute per gli altri campioni (Figure 4.1, 4.6 e 4.13). Le isoterme dei campioni calcinati posso infatti essere ricondotte alla stessa tipologia e allo stesso coppia di isteresi osservati nelle isoterme analizzate precedentemente.



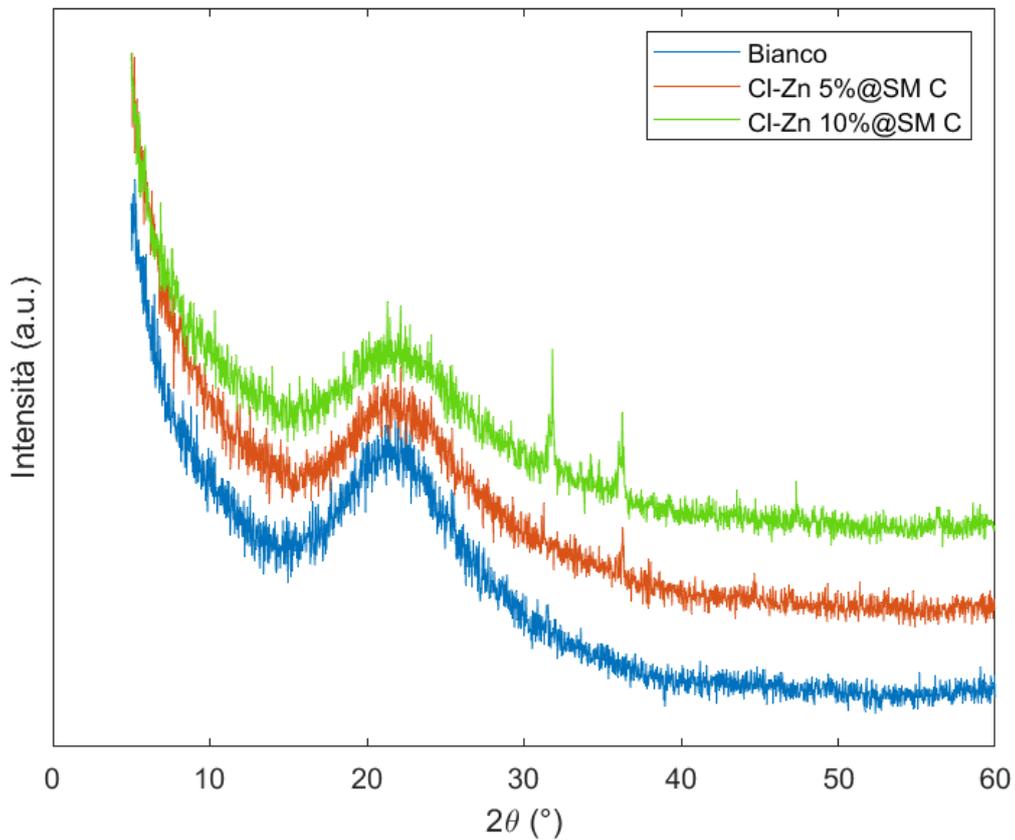
**Figura 4.26:** Isotherme di adsorbimento e desorbimento di azoto di Cl-Zn X%@SM C e del rispettivo bianco

L'analisi di fisisorbimento di azoto ha permesso di ottenere anche la distribuzione dei pori, riportata in Figura 4.21. La distribuzione è eterogenea e non si osservano particolari differenze rispetto ai campioni analizzati precedentemente (Figure 4.2, 4.7 e 4.14).



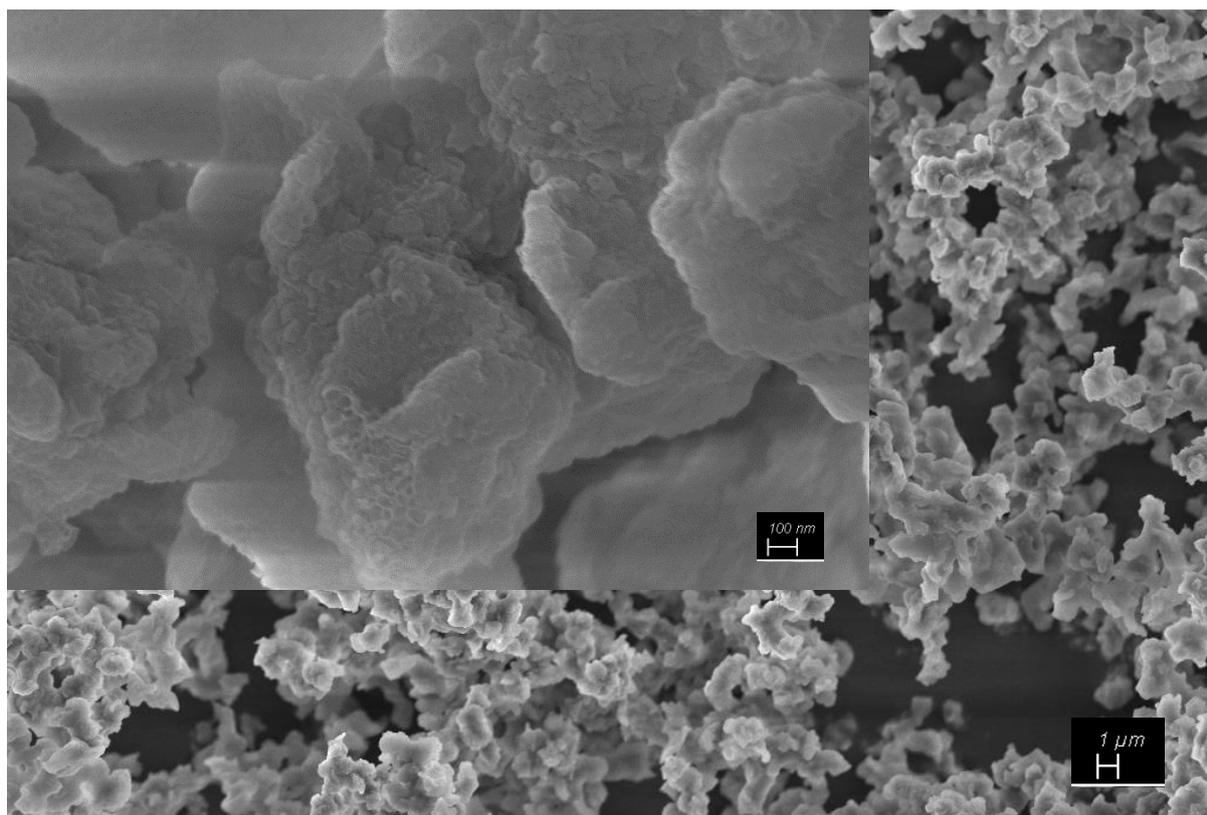
**Figura 4.27:** Distribuzione della dimensione dei pori di Cl-Zn X%@SM C e del bianco secondo il modello DFT

La diffrazione a raggi X effettuata sui campioni calcinati ha consentito di ottenere gli spettri riportati in Figura 4.22. Sia in Cl-Zn 5%@SM C che in Cl-Zn 10%@SM C è possibile osservare dei picchi tra 30° e 40°. Questi picchi sono più evidenti nel campione a più alta concentrazione di zinco. Analizzando la posizione dei picchi si può verificare che essi corrispondono all'ossido di zinco. L'utilizzo di cloruro di zinco come precursore tende, quindi, a formare più facilmente ossido di zinco rispetto al nitrato e all'acetato.



**Figura 4.28:** Spettri XRD di Cl-Zn X%@SM C e del bianco

La microscopia FESEM è stata utilizzata per analizzare il campione Cl-Zn 10%@SM C; le immagini ottenute sono riportate in Figura 4.23. Esse mostrano che non vi sono differenze significative nella dimensione o nella morfologia rispetto agli altri campioni (Figure 4.4, 4.9 e 4.16).



**Figura 4.29:** Immagini FESEM di Cl-Zn 10%@SM C con ingrandimento 100000X e scala 100 nm nell'immagine in alto a sinistra e ingrandimento 5000X e scala 1 μm nell'altra immagine

Tramite spettroscopia EDX sono state ottenute informazioni sulla composizione di Cl-Zn 10%@SM C. I dati ottenuti sono riportati in Tabella 4.8. La percentuale di zinco presente nel campione è pari a 7,18%, molto inferiore rispetto al valore nominale del 10%. L'impregnazione con il cloruro di zinco non ha quindi permesso di ottenere la concentrazione desiderata. Si può, invece, osservare che le impurezze presenti sul campione sono le stesse di SM (Tabella 4.2).

**Tabella 4.8:** Composizione di Cl-Zn 10%@SM C e del bianco ricavata tramite spettroscopia EDX

Elemento	Bianco	Cl-Zn 10%@SM C
O	66.04	58.27
Si	33.15	32.8
Cl	0.14	1.07
K	0.67	0.68
Zn	0	7.18
Totale	100	100

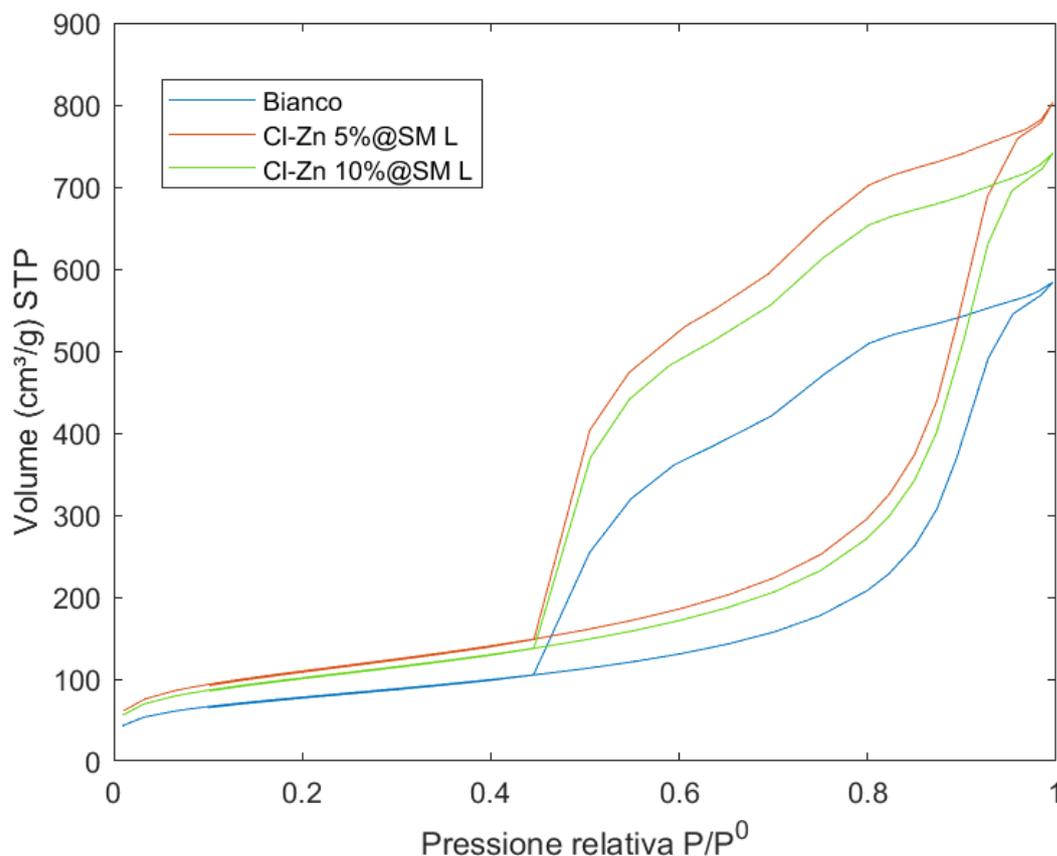
Per quanto riguarda i campioni lavati, l'analisi di fisisorbimento di azoto ha permesso di ottenere dei risultati sorprendenti. Osservando, infatti, la Tabella 4.9 dove sono riportati i valori di area superficiale e volume poroso di questi campioni, si può notare come il lavaggio abbia permesso di ottenere valori molto diversi rispetto a quelli ottenuti dalla calcinazione

(Tabella 4.7). Sebbene il bianco lavato presenti valori di area superficiale e volume poroso inferiori rispetto a quello calcinato, i campioni funzionalizzati e lavati presentano dei valori molto superiori rispetto a quelli calcinati. Questi valori sono anche maggiori rispetto a quelli di SM (Tabella 4.1). Questi andamenti anomali potrebbero essere dovuti ad errori durante il processo di lavaggio o durante l'analisi e bisognerebbe effettuare ulteriori indagini per scoprirne la causa.

**Tabella 4.9:** Area superficiale e volume poroso dei campioni funzionalizzati con cloruro di zinco e lavati e del rispettivo bianco

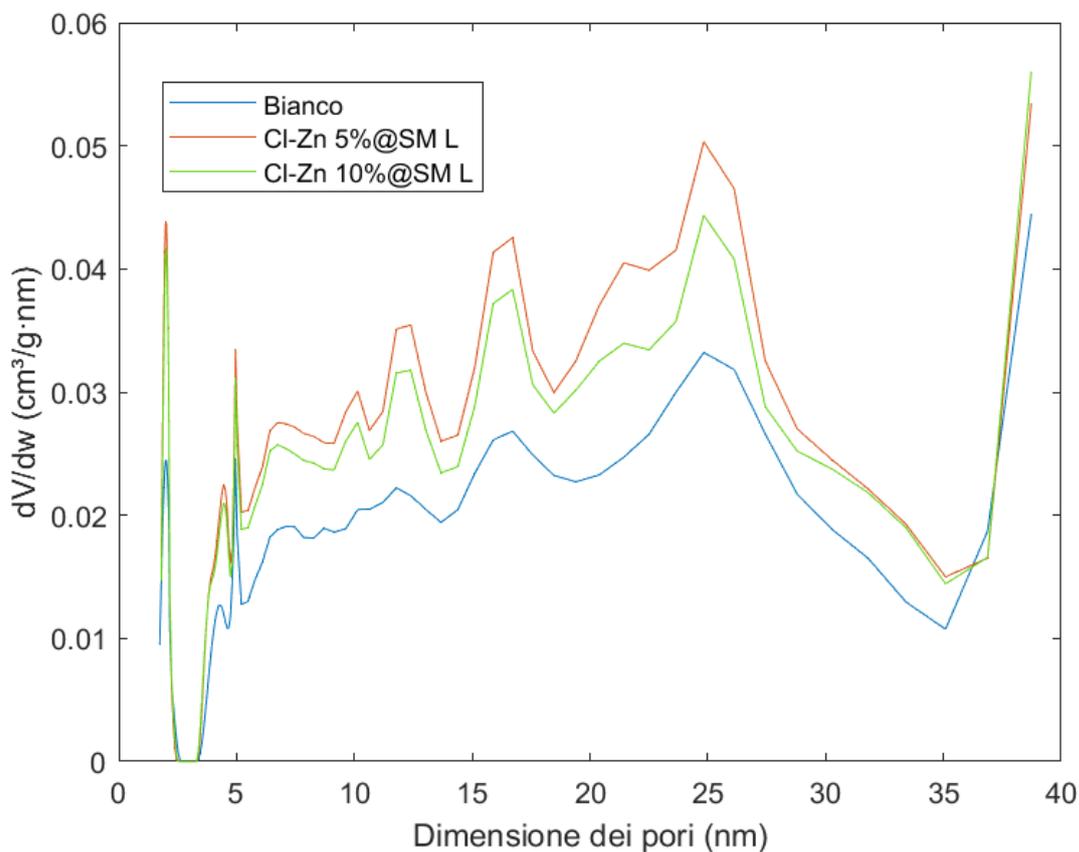
Campione	Area superficiale (m <sup>2</sup> /g)	Volume poroso (cm <sup>3</sup> /g)
Bianco	281	0,84
Cl-Zn 5%@SM L	396	1,17
Cl-Zn 10%@SM L	366	1,08

Dall'analisi di fisisorbimento di azoto sono state ottenute anche le isoterme di adsorbimento-desorbimento dei campioni lavati (Figura 4.24). Sebbene la tipologia e il coppia di isteresi siano i medesimi degli altri campioni (Figure 4.1, 4.6, 4.13 e 4.20), il confronto tra le isoterme mostra che questi presentano volumi maggiori a parità di pressione relativa rispetto a quelle del bianco. Nei precedenti confronti invece il bianco presentava sempre volumi maggiori a parità di pressione relativa rispetto ai campioni funzionalizzati. Anche in questo caso, ulteriori indagini sarebbero necessarie per scoprire la causa di questi andamenti.



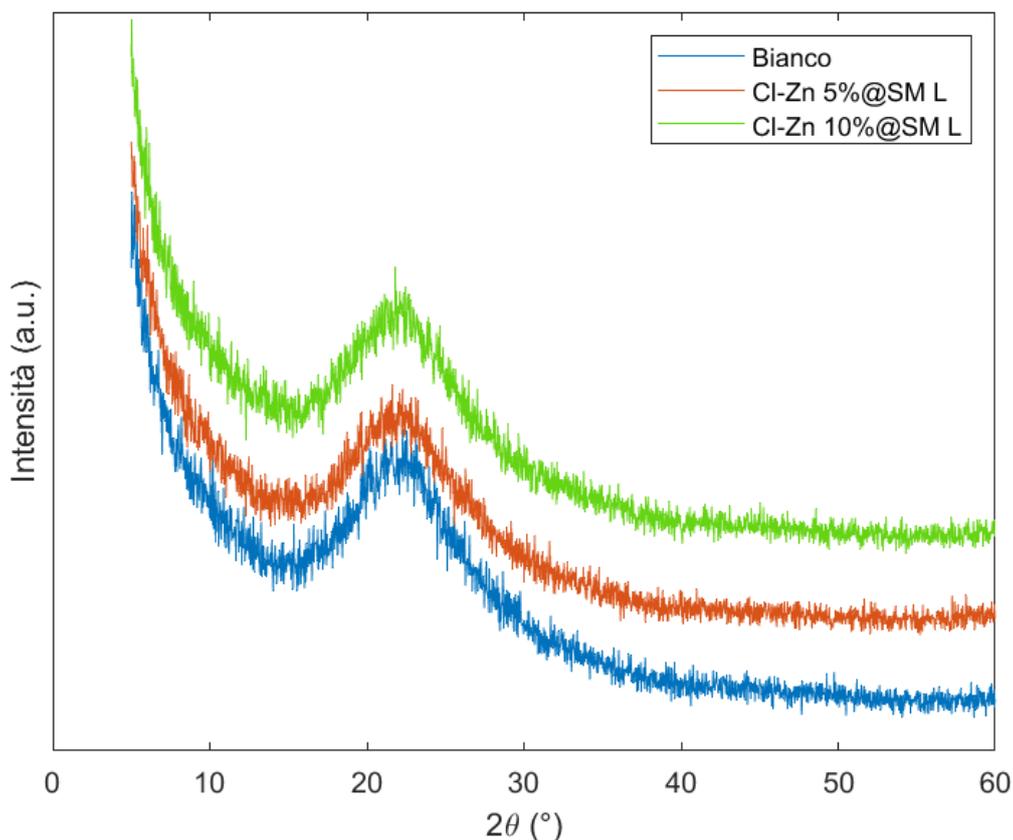
**Figura 4.30:** Isoterme di adsorbimento e desorbimento di azoto di Cl-Zn X%@SM L e del rispettivo bianco

L'analisi di fisisorbimento di azoto ha permesso di ottenere anche la distribuzione dei pori dei campioni lavati (Figura 4.25). Dai risultati ottenuti è possibile osservare che Cl-Zn 5%@SM L e Cl-Zn 10%@SM L presentano una distribuzione eterogenea dei pori con pori più grandi rispetto a quelli degli altri campioni (Figure 4.2, 4.7, 4.14 e 4.21).



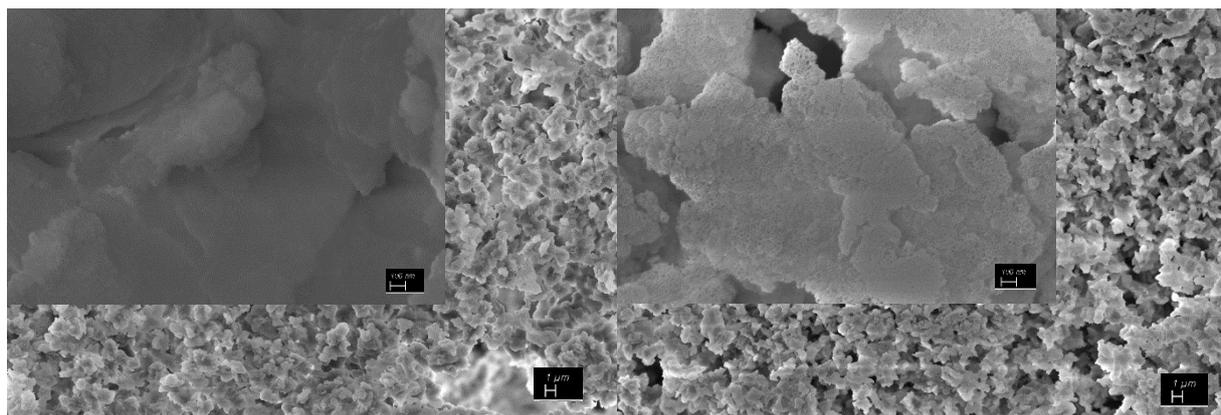
**Figura 4.31:** Distribuzione della dimensione dei pori di Cl-Zn X%@SM L e del bianco secondo il modello DFT

La diffrazione a raggi X ha fornito gli spettri dei campioni lavati (Figura 4.26). Analizzando gli spettri, non è possibile osservare la presenza di picchi. A differenza, quindi, dei corrispettivi campioni calcinati, l'analisi XRD non ha permesso di identificare la presenza di ossido di zinco.



**Figura 4.32:** Spettri XRD di Cl-Zn X%@SM L e del bianco

Tramite microscopia FESEM è stato possibile analizzare Cl-Zn 5%@SM L e Cl-Zn 10%@SM L. Le immagini ottenute sono riportate in Figura 4.27. I campioni presentano morfologia e dimensioni simili e non si notano significative differenze con i campioni precedenti (Figure 4.4, 4.9, 4.16 e 4.23).



**Figura 4.33:** Immagini FESEM di Cl-Zn 5%@SM L (a sinistra) e Cl-Zn 10%@SM L (a destra) con ingrandimento 100000X e scala 100 nm nell'immagine in alto a sinistra e ingrandimento 5000X e scala 1 μm nell'altra immagine

Cl-Zn 5%@SM L e Cl-Zn 10%@SM L sono stati analizzati anche tramite spettroscopia EDX e i risultati sono riportati in Tabella 4.10. La percentuale di zinco nei due campioni è rispettivamente pari a 1,14% e 0,99%. I valori ottenuti sono molto inferiori rispetto a quelli nominali del 5% e del 10%. Questo indica che la funzionalizzazione non ha avuto successo.

Probabilmente il lavaggio ha rimosso gli ioni zinco che erano stati adsorbiti sulla silice. Per quanto riguarda le impurezze presenti, in Cl-Zn 10%@SM L è possibile osservare la presenza di una grande quantità di carbonio che è invece assente in tutti gli altri campioni. La sua presenza è probabilmente causata da un inquinamento del campione durante il processo di impregnazione o in fase di analisi.

**Tabella 4.10:** Composizione di Cl-Zn 5%@SM L, Cl-Zn 10%@SM L e del bianco ricavata tramite spettroscopia EDX

Elemento	Bianco	Cl-Zn 5%@SM L	Cl-Zn 10%@SM L
C	0	0	6.82
O	64.18	64.56	65.07
Si	35.17	33.92	26.79
Cl	0.07	0.25	0.19
K	0.58	0.13	0.14
Zn	0	1.14	0.99
Totale	100	100	100

#### 4.5 Risultati dei test emostatici

I test effettuati su plasma bovino hanno permesso di valutare l'attività emostatica. Tutti i campioni sono stati testati, ad eccezione di Cl-Zn 5%@SM L e Cl-Zn 10%@SM L, poiché il processo di lavaggio non ha permesso di ottenere il materiale desiderato. Per ogni campione sono state effettuate 4 prove in cui è stato misurato il tempo necessario a fare coagulare il plasma. I tempi misurati sono riportati in Tabella 4.11 mentre la Figura 4.28 riporta, invece, i tempi di coagulazione medi. I valori riportati sono solamente quelli dei campioni che hanno consentito la coagulazione del plasma entro 30 minuti, che corrisponde alla durata massima del test. Si è scelto di interrompere le prove dopo questo tempo massimo, poiché i test di controllo (ovvero quelli condotti in assenza di materiale emostatico) hanno avuto un tempo di coagulazione massimo pari a 25 minuti. I campioni che non sono riusciti a portare a coagulazione il plasma entro 30 minuti si sono dimostrati inefficaci allo scopo e, per questo motivo, non sono stati inclusi nei risultati.

I dati riportati in Tabella 4.11 e in Figura 4.28 mostrano come i campioni privi di zinco (SM e Bianco) abbiano permesso di ottenere i tempi di coagulazione più brevi. Per quanto riguarda i campioni contenenti zinco, si può notare come gli unici a presentare tempi di coagulazione inferiori a quelli di controllo sono Nt-Zn 5%@SM, Nt-Zn 10%@SM e Ac-Zn 5%@SM. Si può inoltre notare come l'aumento della concentrazione di zinco comporti un aumento dei tempi di coagulazione. Nt-Zn 5%@SM presenta infatti tempi inferiori a Nt-Zn 10%@SM mentre Ac-Zn 5%@SM presenta tempi inferiori a Ac-Zn 10%@SM (superiori a 30 minuti). Anche il precursore utilizzato ha inciso sui tempi di coagulazione. Si può, infatti, notare come il precursore con tempi minori sia stato il nitrato di zinco. Il nitrato di zinco è stato, inoltre, l'unico precursore in grado di consentire la produzione di un campione con una concentrazione di zinco elevata (pari al 10%) e, allo stesso tempo, in grado di far avvenire la coagulazione del plasma in tempi inferiori al controllo. Utilizzando l'acetato di zinco, invece, si ottengono campioni che, a parità di concentrazione del metallo, presentano tempi di coagulazione superiori a quelli ottenuti con il nitrato. Inoltre, l'unico campione prodotto a partire da acetato di zinco in grado di far coagulare il plasma più velocemente rispetto ai test

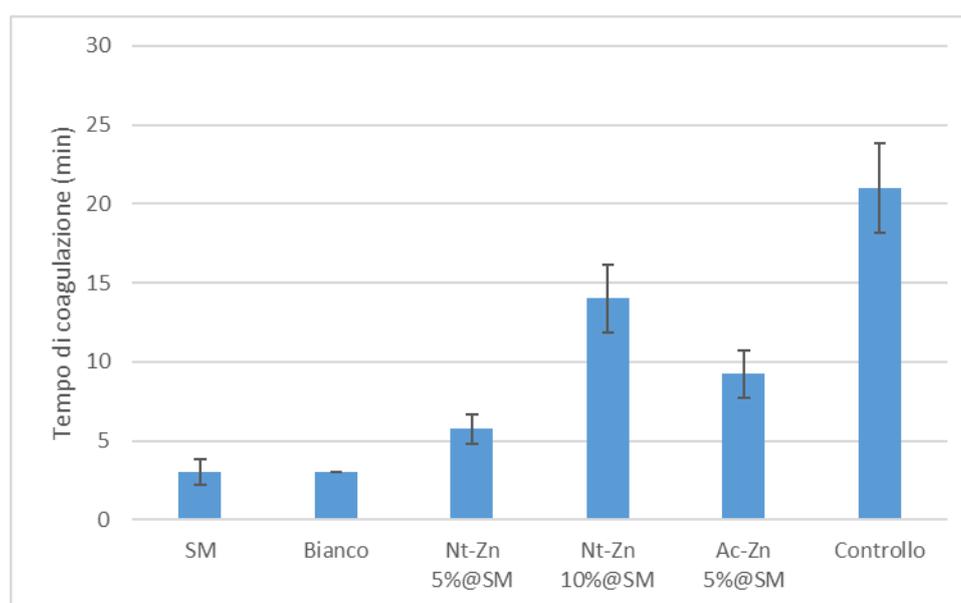
di controllo è stato Ac-Zn 5%@SM. Il cloruro di zinco risulta, invece, essere il precursore peggiore poiché non è stato possibile ottenere da nessun campione una coagulazione inferiore ai 30 minuti.

Un altro fattore determinante nella velocità di coagulazione può essere legato alla formazione di ossido di zinco a seguito della funzionalizzazione. L'ossido di zinco, infatti, è una sostanza in grado di rallentare il processo di coagulazione [43] e bisogna quindi evitarne la formazione. Questa ipotesi può essere avvalorata dalle analisi effettuate con XRD e TEM. L'analisi XRD ha infatti evidenziato la presenza dell'ossido in entrambi i campioni ottenuti dal cloruro di zinco (calcinato) mentre non sono stati osservati picchi derivanti da questo composto nei campioni prodotti utilizzando nitrato e acetato di zinco. L'analisi TEM ha, invece, evidenziato come nei campioni ottenuti dall'acetato di zinco possano essersi formati cluster di ossido di dimensione maggiore rispetto a quelli formati sui campioni ottenuti dal nitrato.

Sulla base dei risultati ottenuti, il nitrato di zinco si è rivelato il precursore più efficace per massimizzare il contenuto di zinco nel materiale preservando le proprietà emostatiche della silice.

**Tabella 4.11:** Tempi di coagulazione misurati nei test emostatici

Test	SM	Bianco	Nt-Zn 5%@SM	Nt-Zn 10%@SM	Ac-Zn 5%@SM	Controllo
Tempo 1 (min)	3	3	7	12	10	25
Tempo 2 (min)	3	3	5	17	11	19
Tempo 3 (min)	2	3	5	13	8	21
Tempo 4 (min)	4	3	6	14	8	19
Media	3	3	5.75	14	9.25	21
Dev. standard	0.82	0.00	0.96	2.16	1.50	2.83



**Figura 4.34:** Tempi di coagulazione medi

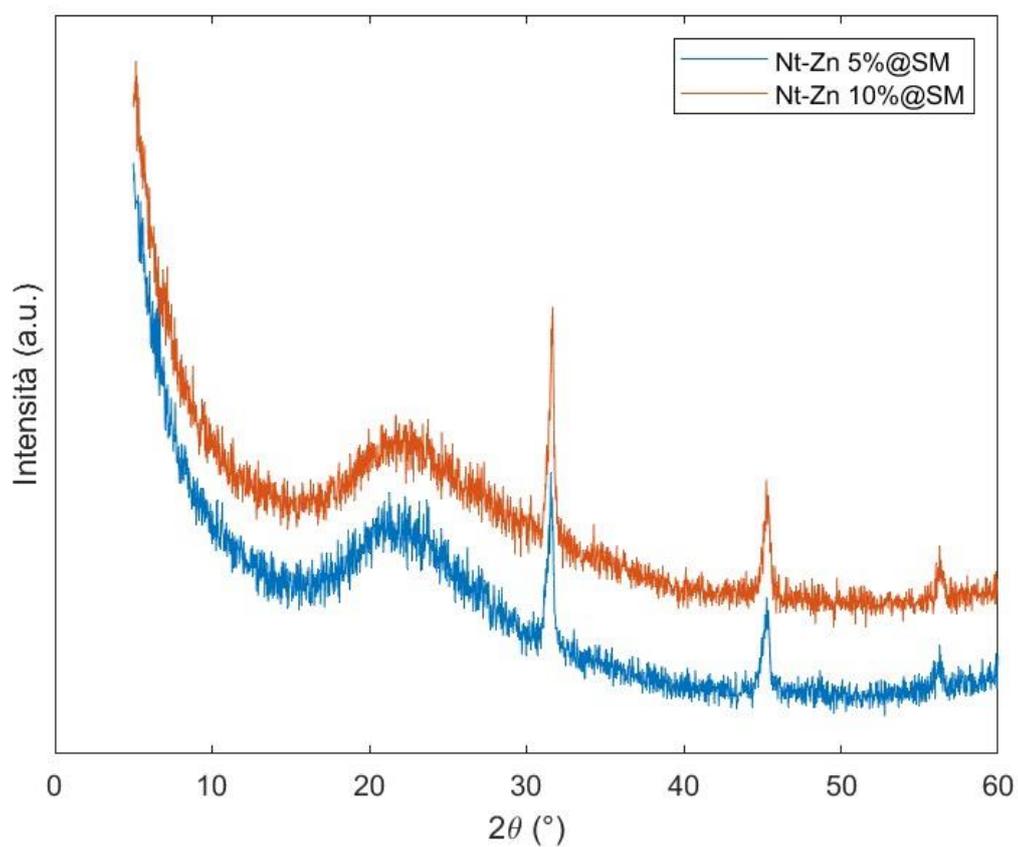
#### 4.6 Risultati dei test di rilascio degli ioni zinco

Visti i risultati dei test emostatici, i test di rilascio degli ioni zinco sono stati effettuati su Nt-Zn 5%@SM e Nt-Zn 10%@SM. I risultati sono riportati in Tabella 4.12 ed evidenziano che entrambi i campioni sono stati in grado di rilasciare in soluzione parte dello zinco in essi contenuto. Inoltre, è possibile osservare che Nt-Zn 10%@SM, come era prevedibile, ha rilasciato una quantità di zinco maggiore rispetto a Nt-Zn 5%@SM. I risultati di questi test dimostrano, in via preliminare, la potenziale attività antibatterica di questi materiali. Sono tuttavia necessari ulteriori test di tipo biologico per verificarne l'effettiva efficacia.

**Tabella 4.12:** Risultati test di rilascio degli ioni zinco

Campione	PPB Zn
Nt-Zn 5%@SM	1858
Nt-Zn 10%@SM	2455

Al termine dei test di rilascio, i campioni di silice sono stati analizzati tramite diffrazione a raggi X per valutare la presenza di sali sulla superficie delle particelle. L'eventuale presenza di sali di zinco indicherebbe che la quantità misurata in soluzione è solo una parte di quella che è stata realmente rilasciata dai campioni. I risultati ottenuti dall'analisi XRD sono riportati in Figura 4.29. Dagli spettri dei due campioni è possibile notare la presenza di tre picchi. Questi corrispondono a NaCl che dalla soluzione è passato sulla superficie della particella. Non sono, quindi, presenti sali di zinco nella particella e, pertanto, la quantità di zinco misurata in soluzione corrisponde alla quantità totale rilasciata.



**Figura 4.35:** Spettri XRD di Nt-Zn 5%@SM e Nt-Zn 10%@SM dopo i test di rilascio degli ioni zinco

## 5. Conclusioni

Tra i materiali emostatici studiati in letteratura, la silice mesoporosa ha riscosso notevole interesse per le sue proprietà emostatiche come la capacità di assorbire grandi quantità di acqua dal sangue per incrementare la concentrazione dei fattori della coagulazione e delle piastrine e accelerare di conseguenza il processo coagulativo. La buona biocompatibilità e la bassa citotossicità rendono inoltre questo materiale ideale per l'utilizzo in applicazioni biomedicali [13]. La facilità di funzionalizzazione della silice mesoporosa consente inoltre di aumentarne le possibilità di applicazione perché permettono di ottenere nuove proprietà come, ad esempio, quella antibatterica acquisita incorporando ioni metallici come quelli di zinco [3].

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di verificare il mantenimento delle proprietà emostatiche della silice mesoporosa funzionalizzata con ioni zinco. In particolare, si è indagato come la scelta del precursore utilizzato può incidere sulle proprietà emostatiche del prodotto finale.

Per raggiungere questo obiettivo, è stata inizialmente sintetizzata la silice mesoporosa seguendo il procedimento riportato da *Mohamed et al.*[4] utilizzando il TEOS come precursore della silice, il Pluronic P123 come agente template e il mesitilene come agente rigonfiante.

Le particelle di silice mesoporosa sono state poi funzionalizzate con ioni zinco seguendo la procedura descritta da *Catillon-Mucherie et al.* [5]. Per la funzionalizzazione sono stati utilizzati tre diversi precursori dello zinco: nitrato di zinco, acetato di zinco e cloruro di zinco. Il contenuto di zinco è stato fatto variare fra il 5% e il 15%, a seconda del precursore. Per il cloruro di zinco, in particolare, sono stati utilizzati due differenti metodi di rimozione dell'anione: la calcinazione (la stessa tecnica utilizzata per nitrato e acetato di zinco) e il lavaggio. Sono stati, infine, preparati due campioni di riferimento, chiamati "bianchi", privi di zinco ma sottoposti agli stessi trattamenti di impregnazione e successiva calcinazione o lavaggio subiti da quelli funzionalizzati.

Tutti i campioni preparati sono stati sottoposti a diverse tecniche di caratterizzazione per individuare eventuali variazioni nelle caratteristiche del materiale a seguito della funzionalizzazione. L'analisi EDX ha evidenziato la presenza di una quantità di zinco pari al valore nominale in tutti i campioni calcinati mentre è stata osservata una quantità di zinco inferiore in quelli lavati. Probabilmente il lavaggio ha causato la rimozione dello zinco. Le analisi FESEM e TEM hanno, invece, evidenziato come la funzionalizzazione non abbia comportato modifiche significative nella struttura delle particelle di silice in nessuno dei campioni analizzati. L'analisi TEM ha permesso anche di rilevare una distribuzione dello zinco su tutta la superficie delle particelle. L'analisi di fisisorbimento di azoto ha mostrato una diminuzione dei valori di area superficiale e volume poroso con l'incremento della quantità di zinco nei campioni calcinati. Dai risultati di questa analisi è stato, inoltre, possibile osservare che la funzionalizzazione di questi campioni non ha variato la forma delle isoterme di adsorbimento e desorbimento e la distribuzione dei pori rispetto ai campioni di silice privi di zinco. L'analisi XRD ha mostrato la presenza di ossido di zinco sui campioni a maggior contenuto di zinco (Nt-Zn 15%@SM, Cl-Zn 5%@SM C e Cl-Zn 10%@SM C). La presenza di ossido è indesiderata in quanto può ritardare la coagulazione. Infine, l'analisi FT-IR ha permesso di osservare l'assenza di nitrati e acetati sui campioni funzionalizzati. Non sono rimasti, quindi, residui indesiderati a seguito della funzionalizzazione. L'analisi FT-IR ha

mostrato, inoltre, che la popolazione ossidrilica non presenta differenze significative tra i diversi campioni.

L'attività emostatica dei campioni è stata valutata con test di coagulazione su plasma bovino. Naturalmente, i tempi di coagulazione inferiori sono stati ottenuti utilizzando i campioni privi di zinco. Per quanto riguarda i campioni funzionalizzati, invece, è stato osservato che, a parità di precursore, un aumento della quantità di zinco comporta un aumento dei tempi di coagulazione. Per quanto riguarda, invece, la scelta del precursore, il nitrato di zinco ha riportato i tempi inferiori, seguito dall'acetato di zinco. I campioni ottenuti dal cloruro di zinco, invece, non sono stati in grado di far coagulare il plasma entro 30 minuti, durata massima del test.

Dal momento che il nitrato di zinco si è rivelato il precursore più promettente, i campioni Nt-Zn 5%@SM e Nt-Zn 10%@SM sono stati sottoposti a un test di rilascio degli ioni zinco in una soluzione di NaCl 0,9% w/v [47]. Questo test permette di valutare, in via preliminare, la potenziale attività antibatterica dei campioni stessi. I risultati ottenuti dimostrano che entrambi i campioni rilasciano zinco in soluzione e Nt-Zn 10%@SM ne rilascia, naturalmente, una quantità maggiore. Sono tuttavia necessari ulteriori test di tipo biologico per verificare l'effettiva attività antibatterica di questi materiali.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi dimostrano che la silice mesoporosa funzionalizzata con ioni zinco può essere un promettente materiale che potenzialmente coniuga le proprietà emostatiche con quelle antibatteriche, specialmente se funzionalizzato utilizzando il nitrato di zinco come precursore dello zinco.

## 6. Sviluppi futuri

Il lavoro svolto in questa tesi si presta allo sviluppo di ulteriori attività sperimentali con lo scopo di rendere più efficiente il processo di sintesi o per studiare più approfonditamente le proprietà emostatiche e antibatteriche dei materiali ottenuti.

In questa tesi, la funzionalizzazione con gli ioni zinco è stata effettuata tramite un'impregnazione post-sintesi. Per lavori futuri il materiale potrebbe essere realizzato cercando di funzionalizzare la silice durante la fase di sintesi, in modo da semplificare il processo. Naturalmente, il nuovo prodotto dovrebbe essere caratterizzato con le stesse tecniche qui adottate, inclusi i test emostatici e di rilascio degli ioni zinco.

Per quanto riguarda i test emostatici, invece, potrebbe essere interessante utilizzare sangue invece del plasma. L'utilizzo del sangue con tutti gli elementi in esso contenuti consentirebbe di ottenere un quadro più completo dell'attività emostatica del materiale testato. Sarebbe, infatti, possibile osservare come la silice mesoporosa interagisce con gli elementi che non sono presenti nel plasma. I test con il sangue consentirebbero, inoltre, di rappresentare meglio la reale situazione fisiologica.

Un secondo aspetto importante relativo alle proprietà emostatiche riguarda l'esecuzione di test *in vivo*. Infatti, i test emostatici effettuati finora sono test *in vitro* e consentono di controllare facilmente le condizioni sperimentali ma non di osservare come un organismo potrebbe reagire all'applicazione del materiale. Per questo motivo, sarebbe necessario effettuare dei test *in vivo* che diano una visione completa dell'effetto che ha il materiale sull'organismo.

Come è già stato ribadito più volte, sarebbero necessari dei test biologici per verificare l'attività antibatterica del materiale. I test di rilascio degli ioni zinco sono, infatti, dei test preliminari. Il rilascio di questi ioni è infatti condizione necessaria ma non sufficiente affinché questi possano esercitare la loro azione antibatterica. I test biologici sono molto importanti per i materiali emostatici. Essendo, infatti, essi utilizzati su pelle danneggiata o ferita, è fondamentale impedire la proliferazione dei batteri.

Infine, sarà necessario studiare il modo in cui questo materiale verrà applicato sulle ferite. Al momento, questo è stato prodotto e studiato sotto forma di polvere, che può essere facilmente applicata su una ferita. Tuttavia, possono essere pensate diverse altre modalità di utilizzo per valutare la più idonea. Si possono, per esempio, realizzare spray o gel da applicare sulla lesione. La silice mesoporosa potrebbe, inoltre, essere integrata in dispositivi come garze o bende per unire le sue proprietà emostatiche con la compressione meccanica realizzata dal dispositivo medico.



## Bibliografia

- [1] Y. Guo, M. Wang, Q. Liu, G. Liu, S. Wang, and J. Li, “Recent advances in the medical applications of hemostatic materials,” *Theranostics*, vol. 13, no. 1, pp. 161–196, 2023, doi: 10.7150/thno.79639.
- [2] S. Pourshahrestani, N. A. Kadri, E. Zeimaran, and M. R. Towler, “Well-ordered mesoporous silica and bioactive glasses: promise for improved hemostasis,” *Biomater. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 31–50, 2019, doi: 10.1039/C8BM01041B.
- [3] B. Li, Y. Liao, X. Su, S. Chen, X. Wang, B. Shen, H. Song, and P. Yue, “Powering mesoporous silica nanoparticles into bioactive nanoplateforms for antibacterial therapies: strategies and challenges,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 21, no. 1, p. 325, 2023, doi: 10.1186/s12951-023-02093-w.
- [4] S. S. Y. Mohamed, A. Gambino, M. Banchemo, S. Ronchetti, L. Manna, R. Cavalli, and B. Onida, “Tranexamic acid-loaded mesoporous silica microspheres as a hemostatic material,” *Mater. Today Commun.*, vol. 34, p. 105198, 2023, doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.105198.
- [5] S. Catillon-Mucherie, H. Lauron-Pernot, and C. Louis, “Preparation of Coimpregnated Cu–Zn on Zn-Modified Silica: Influence of the Basicity of the Support and of the Nature of Zinc Species on the Catalyst Properties,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 25, pp. 11140–11147, 2010, doi: 10.1021/jp100252h.
- [6] M. McMichael, “Primary hemostasis,” *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, vol. 15, no. 1, pp. 1–8, 2005, doi: 10.1111/j.1476-4431.2005.04021.x.
- [7] S. Palta, R. Saroa, and A. Palta, “Overview of the coagulation system,” *Indian J. Anaesth.*, vol. 58, no. 5, p. 515, 2014, doi: 10.4103/0019-5049.144643.
- [8] K. Jurk and B. E. Kehrel, “Platelets: Physiology and Biochemistry,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 31, no. 04, pp. 381–392, 2005, doi: 10.1055/s-2005-916671.
- [9] L. Masotti, “Sulodexide. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and mechanism of action,” *Clin. Manag. Issues*, vol. 4, no. 4S, pp. 17–21, 2015, doi: 10.7175/cmi.v4i4S.1088.
- [10] R. L. C. ADAMS and R. J. BIRD, “Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants,” *Nephrology*, vol. 14, no. 5, pp. 462–470, 2009, doi: 10.1111/j.1440-1797.2009.01128.x.
- [11] D. GREEN, “Coagulation cascade,” *Hemodial. Int.*, vol. 10, no. S2, pp. S2–S4, 2006, doi: 10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x.
- [12] H. Shao, X. Wu, J. Deng, Y. Yang, W. Chen, K. Li, X. Xie, H. She, W. Jian, H. Li, and J. Ma, “Application and progress of inorganic composites in haemostasis: a review,” *J. Mater. Sci.*, vol. 59, no. 17, pp. 7169–7192, 2024, doi: 10.1007/s10853-024-09595-4.
- [13] S. Pourshahrestani, E. Zeimaran, I. Djordjevic, N. A. Kadri, and M. R. Towler, “Inorganic hemostats: The state-of-the-art and recent advances,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 1255–1268, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.09.008.
- [14] Q. Li and Y. Zhou, “Brief History, Preparation Method, and Biological Application of Mesoporous Silica Molecular Sieves: A Narrative Review,” *Molecules*, vol. 28, no. 5,

- p. 2013, 2023, doi: 10.3390/molecules28052013.
- [15] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, and J. S. Beck, "Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism," *Nature*, vol. 359, no. 6397, pp. 710–712, 1992, doi: 10.1038/359710a0.
- [16] A. Bernardos, E. Piacenza, F. Sancenón, M. Hamidi, A. Maleki, R. J. Turner, and R. Martínez-Máñez, "Mesoporous Silica-Based Materials with Bactericidal Properties," *Small*, vol. 15, no. 24, pp. 1–34, 2019, doi: 10.1002/sml.201900669.
- [17] A. N. Frickenstein, J. M. Hagood, C. N. Britten, B. S. Abbott, M. W. McNally, C. A. Vopat, E. G. Patterson, W. M. MacCuaig, A. Jain, K. B. Walters, and L. R. McNally, "Mesoporous Silica Nanoparticles: Properties and Strategies for Enhancing Clinical Effect," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 4, p. 570, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13040570.
- [18] F. Tang, L. Li, and D. Chen, "Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery," *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, 2012, doi: 10.1002/adma.201104763.
- [19] R. Narayan, U. Y. Nayak, A. M. Raichur, and S. Garg, "Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, p. 118, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030118.
- [20] A. Maleki, H. Kettiger, A. Schoubben, J. M. Rosenholm, V. Ambrogi, and M. Hamidi, "Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs," *J. Control. Release*, vol. 262, pp. 329–347, 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.07.047.
- [21] N. Thananukul, A. Phongphut, S. Prichanont, C. Thanachayanont, S. Fearn, and B. Chayasombat, "A comparative study on mesocellular foam silica with different template removal methods and their effects on enzyme immobilization," *J. Porous Mater.*, vol. 26, no. 4, pp. 1059–1068, 2019, doi: 10.1007/s10934-018-0705-1.
- [22] T. M. Albayati, S. M. Alardhi, A. H. Khalbas, Z. J. Humdi, N. S. Ali, I. K. Salih, N. M. C. Saady, S. Zendehboudi, and M. A. Abdulrahman, "Comprehensive Review of Mesoporous Silica Nanoparticles: Drug Loading, Release, and Applications as Hemostatic Agents," *ChemistrySelect*, vol. 9, no. 23, 2024, doi: 10.1002/slct.202400450.
- [23] S. K. Jana, A. Mochizuki, and S. Namba, "Progress in Pore-Size Control of Mesoporous MCM-41 Molecular Sieve Using Surfactant Having Different Alkyl Chain Lengths and Various Organic Auxiliary Chemicals," *Catal. Surv. from Asia*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, 2004, doi: 10.1023/B:CATS.0000015110.85694.d9.
- [24] X. Lv, L. Zhang, F. Xing, and H. Lin, "Controlled synthesis of monodispersed mesoporous silica nanoparticles: Particle size tuning and formation mechanism investigation," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 225, pp. 238–244, 2016, doi: 10.1016/j.micromeso.2015.12.024.
- [25] H. Yamada, C. Urata, Y. Aoyama, S. Osada, Y. Yamauchi, and K. Kuroda, "Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behavior in Static Aqueous Systems," *Chem. Mater.*, vol. 24, no. 8, pp. 1462–1471, 2012, doi: 10.1021/cm3001688.
- [26] S. P. Naik, S. P. Elangovan, T. Okubo, and I. Sokolov, "Morphology Control of Mesoporous Silica Particles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 30, pp. 11168–11173,

- 2007, doi: 10.1021/jp072184a.
- [27] D. Zhao, J. Sun, Q. Li, and G. D. Stucky, "Morphological Control of Highly Ordered Mesoporous Silica SBA-15," *Chem. Mater.*, vol. 12, no. 2, pp. 275–279, 2000, doi: 10.1021/cm9911363.
- [28] C. Bharti, N. Gulati, U. Nagaich, and A. Pal, "Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review," *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 5, no. 3, p. 124, 2015, doi: 10.4103/2230-973X.160844.
- [29] E. Bindini, Z. Chehadi, M. Faustini, P.-A. Albouy, D. Grosso, A. Cattoni, C. Chanéac, O. Azzaroni, C. Sanchez, and C. Boissière, "Following in Situ the Degradation of Mesoporous Silica in Biorelevant Conditions: At Last, a Good Comprehension of the Structure Influence," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, no. 12, pp. 13598–13612, 2020, doi: 10.1021/acsami.9b19956.
- [30] R. Jugdaohsingh, S. Sripanyakorn, and J. J. Powell, "Silicon absorption and excretion is independent of age and sex in adults," *Br. J. Nutr.*, vol. 110, no. 6, pp. 1024–1030, 2013, doi: 10.1017/S0007114513000184.
- [31] V.-C. Niculescu, "Mesoporous Silica Nanoparticles for Bio-Applications," *Front. Mater.*, vol. 7, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3389/fmats.2020.00036.
- [32] Z. Chen, F. Li, C. Liu, J. Guan, X. Hu, G. Du, X. Yao, J. Wu, and F. Tian, "Blood clot initiation by mesoporous silica nanoparticles: dependence on pore size or particle size?," *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 44, pp. 7146–7154, 2016, doi: 10.1039/C6TB01946C.
- [33] T. A. Ostomel, Q. Shi, and G. D. Stucky, "Oxide Hemostatic Activity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 26, pp. 8384–8385, 2006, doi: 10.1021/ja061717a.
- [34] H. Hong, C. Wang, Y. Yuan, X. Qu, J. Wei, Z. Lin, H. Zhou, and C. Liu, "Novel porous silica granules for instant hemostasis," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 82, pp. 78930–78935, 2016, doi: 10.1039/C6RA13999J.
- [35] Z. Zhang, T. Liu, Z. Qi, F. Li, K. Yang, S. Ding, S. Lin, and F. Tian, "Fabrication of effective mesoporous silica materials for emergency hemostasis application," *Silicon*, vol. 14, no. 16, pp. 10521–10534, 2022, doi: 10.1007/s12633-021-01648-6.
- [36] A. Budiman, A. Rusdin, Y. W. Wardhana, L. E. Puluhulawa, F. R. Cindana Mo'o, N. Thomas, A. M. Gazzali, and D. L. Aulifa, "Exploring the Transformative Potential of Functionalized Mesoporous Silica in Enhancing Antioxidant Activity: A Comprehensive Review," *Antioxidants*, vol. 13, no. 8, p. 936, 2024, doi: 10.3390/antiox13080936.
- [37] Y. Wei, J. Wang, S. Wu, R. Zhou, K. Zhang, Z. Zhang, J. Liu, S. Qin, and J. Shi, "Nanomaterial-Based Zinc Ion Interference Therapy to Combat Bacterial Infections," *Front. Immunol.*, vol. 13, pp. 1–18, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.899992.
- [38] M. Ijaz, M. Zafar, A. Islam, S. Afsheen, and T. Iqbal, "A Review on Antibacterial Properties of Biologically Synthesized Zinc Oxide Nanostructures," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 30, no. 8, pp. 2815–2826, 2020, doi: 10.1007/s10904-020-01603-9.
- [39] R. F. Majidi, A. S.-M. Mesgar, and P. B. Milan, "Surface-modified, zinc-incorporated mesoporous silica nanoparticles with improved antibacterial and rapid hemostatic properties," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 243, p. 114132, 2024, doi: 10.1016/j.colsurfb.2024.114132.

- [40] Y. Hou, Y. Xia, Y. Pan, S. Tang, X. Sun, Y. Xie, H. Guo, and J. Wei, "Influences of mesoporous zinc-calcium silicate on water absorption, degradability, antibacterial efficacy, hemostatic performances and cell viability to microporous starch based hemostat," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 340–349, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.094.
- [41] C. Caramella, "Synthesis and Characterization of Zinc-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles for pH-Responsive Cancer Drug Delivery," *Biosens. Nanotheranostics*, vol. 1, no. 1, pp. 1–7, 2022, doi: 10.25163/biosensors.119865.
- [42] S. Tubek, P. Grzanka, and I. Tubek, "Role of Zinc in Hemostasis: A Review," *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 121, no. 1, pp. 1–8, 2008, doi: 10.1007/s12011-007-8038-y.
- [43] J.-Y. Yang, J. Bae, A. Jung, S. Park, S. Chung, J. Seok, H. Roh, Y. Han, J.-M. Oh, S. Sohn, J. Jeong, and W.-S. Cho, "Surface functionalization-specific binding of coagulation factors by zinc oxide nanoparticles delays coagulation time and reduces thrombin generation potential in vitro," *PLoS One*, vol. 12, no. 7, p. e0181634, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0181634.
- [44] A. Chauhan, "Powder XRD Technique and its Applications in Science and Technology," *J. Anal. Bioanal. Tech.*, vol. 5, no. 5, pp. 1–5, 2014, doi: 10.4172/2155-9872.1000212.
- [45] T. N., W. Habicht, E. Dinjus, and M. Zimmerm, "Catalyst Characterization with FESEM/EDX by the Example of Silver-Catalyzed Epoxidation of 1,3-Butadiene," in *Scanning Electron Microscopy*, InTech, 2012. doi: 10.5772/37952.
- [46] L. A. Bendersky and F. W. Gayle, "Electron diffraction using transmission electron microscopy," *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, vol. 106, no. 6, p. 997, 2001, doi: 10.6028/jres.106.051.
- [47] A. Donnadio, G. Cardinali, L. Latterini, L. Roscini, and V. Ambrogi, "Nanostructured zinc oxide on silica surface: Preparation, physicochemical characterization and antimicrobial activity," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, p. 109977, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109977.
- [48] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, and 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.*, vol. 87, no. 9–10, pp. 1051–1069, 2015, doi: 10.1515/pac-2014-1117.
- [49] D. A. Long, "Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts George Socrates John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, Third Edition, 2001. Price £135," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 35, no. 10, pp. 905–905, 2004, doi: 10.1002/jrs.1238.