

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali per l'Industria 4.0**

Tesi di Laurea Magistrale

Silici emostatiche: l'effetto della sintesi sulle proprietà del materiale



Relatori

Prof.ssa Barbara Onida

Dott.ssa Sara Saber Younes Mohamed

Candidato

Francesco Parmentola

Ottobre 2025

Sommario

Indice delle figure	III
Indice delle tabelle	IV
Acronimi	V
Introduzione	VII
1. Materiali con proprietà emostatiche	1
1.1. <i>Panoramica sull'emostasi</i>	1
1.2. <i>Materiali emostatici a base di polisaccaridi</i>	2
1.2.1. Chitosano	2
1.2.2. Acido ialuronico	2
1.2.3. Alginato	2
1.2.4. Cellulosa Ossidata e Rigenerata	2
1.2.5. Amido	3
1.3. <i>Materiali emostatici a base di proteine</i>	3
1.3.1. Gelatina animale	3
1.3.2. Seta	3
1.4. <i>Agenti biologicamente attivi</i>	4
1.4.1. Fibrina e Derivati	4
1.4.2. Collagene microfibrillare	4
1.5. <i>Polimeri sintetici</i>	5
1.5.1. Polietilenglicole	5
1.5.2. Poliuretano	5
1.5.3. Polivinilalcol	5
1.5.4. Policaprolattone	5
1.5.5. Polimeri acrilici	5
1.5.6. Polietilen ossido	6
1.6. <i>Agenti emostatici inorganici</i>	6
1.6.1. Nitinol	6
1.6.2. Grafene	6
1.6.3. Zeoliti	6
1.6.4. Argille	7
1.6.5. Laponite	8
1.6.6. Montmorillonite	8
1.6.7. Vetri bioattivi	8
2. Le silici mesoporose	11
2.1. <i>Sintesi</i>	11
2.1.1. Tensioattivi	12

2.1.2.	Precursori silicei	13
2.1.3.	Trattamento idrotermale e rimozione del templante.....	14
2.2.	<i>Applicazioni biomediche delle silici mesoporose</i>	15
2.2.1.	Biocompatibilità e citotossicità	15
2.2.2.	Degradabilità	16
2.2.3.	Proprietà emostatiche.....	17
3.	Materiali e metodi	19
3.1.	<i>I materiali</i>	19
3.2.	<i>Sintesi delle microsfele di silice mesoporosa</i>	19
3.3.	<i>Caratterizzazione strumentale</i>	20
3.3.1.	Microscopia elettronica FESEM e spettrometria EDX.....	21
3.3.2.	Analisi di fisisorbimento di azoto	21
3.3.3.	Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier FT-IR.....	23
3.3.4.	Analisi termo-gravimetrica TGA	23
3.3.5.	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X XPS.....	24
3.4.	<i>Valutazione delle proprietà emostatiche</i>	24
3.4.1.	Test emostatici	24
3.4.2.	Analisi del potenziale ζ	25
3.4.3.	Adsorbimento di acqua	25
3.5.	<i>Test di degradazione</i>	26
4.	Risultati	27
4.1.	<i>Caratterizzazione di MSM-100-350 e di MSM-100-500</i>	27
4.2.	<i>Caratterizzazione di MSM-130-350 e di MSM-130-500</i>	32
4.3.	<i>Valutazione dell'attività emostatica</i>	37
4.3.2.	Risultato dei test di adsorbimento di acqua.....	39
4.3.3.	Potenziale ζ	43
4.3.4.	Risultato dei test emostatici	44
4.3.5.	Valutazione dei contaminanti superficiali	46
4.4.	<i>Risultato dei test di degradazione in plasma</i>	48
4.5.	<i>Caratterizzazione di MSM-100-350-2X e di MSM-100-500-2X</i>	51
5.	Sviluppi futuri	57
6.	Conclusioni	59
	Bibliografia	61

Indice delle figure

Figura 1. Meccanismo di formazione della MCM-41 ⁶²	12
Figura 2. Idrolisi e condensazione dei silicati ⁵	12
Figura 3. Composizione chimica della superficie della silice: a) gruppo silossanico, b) silanolo isolato o libero, c) silanolo vicinale o pontato, d) silanolo geminale ⁷⁶	14
Figura 4. Schema della prima sintesi e, in evidenza, i parametri modificati nelle sintesi successive.	20
Figura 5. Classificazione delle isoterme di adsorbimento ⁹¹	22
Figura 6. Classificazione dei cappi di isteresi ⁹¹	22
Figura 7. Setup per l'adsorbimento di acqua	25
Figura 8. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-100-350.....	28
Figura 9. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-100-500.....	28
Figura 10. Distribuzione dei diametri di MSM-100-350 (a) e di MSM-100-500 (b).	29
Figura 11. Isotherme di adsorbimento e desorbimento di MSM-100-350 e MSM-100-500.	30
Figura 12. Distribuzione del diametro dei pori di MSM-100-350 e MSM-100-500, calcolata con DFT.	30
.....	30
Figura 13. Spettroscopia FTIR di MSM-100-350 e MSM-100-500.	31
Figura 14. Curve termogravimetriche di MSM-100-350 e MSM-100-500.....	32
Figura 15. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-130-350.....	33
Figura 16. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-130-500.....	33
Figura 17. Distribuzione dei diametri di MSM-130-350 (a) e di MSM-130-500 (b).	34
Figura 18. Isotherme di adsorbimento e desorbimento di MSM-130-350 e MSM-130-500.	35
Figura 19. Distribuzione del diametro dei pori di MSM-130-350 e MSM-130-500, calcolata con DFT.	35
.....	35
Figura 20. Spettroscopia FTIR di MSM-130-350 e MSM-130-500.	36
Figura 21. Curve termogravimetriche di MSM-130-350 e MSM-130-500.....	36
Figura 22. Relazione tra quantità d'acqua adsorbita e concentrazione superficiale di silanoli.	39
Figura 23. Relazione tra quantità d'acqua adsorbita postA e concentrazione superficiale di silanoli. ..	40
Figura 24. Curve termogravimetriche di MSM-100-350 e di MSM-100-350-PostA.....	40
Figura 25. Curve termogravimetriche di MSM-100-500 e di MSM-100-500-PostA.....	41
Figura 26. Curve termogravimetriche di MSM-130-350 e di MSM-130-350-PostA.....	41
Figura 27. Curve termogravimetriche di MSM-130-500 e di MSM-130-500-PostA.....	42
Figura 28. Spettroscopia FTIR di MSM-100-500 e MSM-100-500-PostA	42
Figura 29. Potenziale ζ medio con indicatore della deviazione standard.	43
Figura 30. Relazione tra concentrazione superficiale di silanoli e potenziale ζ	44
Figura 31. Plasma coagulato con silici.	45
Figura 32. Tempi di coagulazione medi con indicatore della deviazione standard.	45
Figura 33. Spettro XPS survey di MSM-130-350 (a) e di MSM-130-500 (b).	47
Figura 34. Spettro XPS HR di MSM-130-350, relativo al picco del carbonio e deconvoluzione.	47
Figura 35. Spettro XPS HR di MSM-130-500, relativo al picco del carbonio e deconvoluzione.	47
Figura 36. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 5.00kX di MSM-100-500-PostDegP...	48
Figura 37. Distribuzione dei diametri di MSM-100-500 (a) e di MSM-100-500-PostDegP (b)	49
Figura 38. Spettro EDX relativo al campione MSM-100-500-PostDegP	49
Figura 39. Spettroscopia FTIR di MSM-100-500 e MSM-100-500-PostDegP.....	50
Figura 40. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-100-350-2X	51
Figura 41. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-100-500-2X	52
Figura 42. Distribuzione dei diametri di MSM-100-350-2X (a) e di MSM-100-500-2X (b).....	52
Figura 43. Isotherme di adsorbimento e desorbimento di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.....	53
Figura 44. Distribuzione del diametro dei pori di MSM-100-350-2X e di MSM-100-500-2X, calcolata con DFT.	53
.....	53
Figura 45. Spettroscopia FTIR di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.	54
Figura 46. Curve termogravimetriche di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.....	55

Indice delle tabelle

Tabella 1. Dimensione delle particelle di MSM-100-350 e MSM-100-500.....	27
Tabella 2. Area superficiale e volume poroso di MSM-100-350 e MSM-100-500.	29
Tabella 3. Concentrazione superficiale di silanoli di MSM-100-350 e MSM-100-500.	31
Tabella 4. Dimensione delle particelle di MSM-130-350 e MSM-130-500.....	32
Tabella 5. Area superficiale e volume poroso di MSM-130-350 e MSM-130-500.	34
Tabella 6. Concentrazione superficiale di silanoli di MSM-130-350 e MSM-130-500.	36
Tabella 7. Confronto dei dati ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto	38
Tabella 8. Percentuale di acqua persa a seguito di TGA e concentrazione superficiale di silanoli.	38
Tabella 9. Percentuale di acqua persa durante una TGA, effettuata dopo un test di adsorbimento di acqua.	39
Tabella 10. Potenziale ζ di MSM-100-350, MSM-100-500, MSM-130-350 e MSM-130-500.	43
Tabella 11. Tempi di coagulazione misurati durante i test emostatici con plasma bovino.	45
Tabella 12. Composizione atomica percentuale di MSM-130-350 e MSMS-130-500.....	46
Tabella 13. Dimensione delle particelle di MSM-100-500 e MSM-100-500-PostdegP.	48
Tabella 14. Composizione del campione MSM-100-500-PostDegP ottenuta con EDX.....	49
Tabella 15. Dimensione delle particelle di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.....	51
Tabella 16. Area superficiale e volume poroso di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.....	53
Tabella 17. Concentrazione superficiale di silanoli di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.	54
Tabella 18. Tempi di coagulazione misurati sui campioni con doppio TMB.	55

Acronimi

Al³⁺	Ione alluminio
BE	Binding energy
BET	Brauner-emmet-teller
Ca²⁺	Ione calcio
CaCl₂	Acido cloridrico
CTAB	Cetiltrimetilammonio bromuro
CTMA	Dodecanil trimetil ammonio
DFT	Density functional theory
DNA	Acido desossiribnucleico
EDX	Spettrometria di raggi X a dispersione di energia
EFSA	European food safety authority
EO	Etilen ossido
FDA	Food and Drug Administration
FESEM	Microscopia elettronica a scansione a emissione di campo
FT-IR	Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier
HCl	Acido cloridrico
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K₂SO₄	Solfato di potassio
KCl	Cloruro di potassio
Li⁺	Ione litio
MCM-41	Mobil Composition of Matter No. 41
MCM-48	Mobil Composition of Matter No. 48
MCM-50	Mobil Composition of Matter No. 50
Mg²⁺	Ione magnesio
MSM-“”-“”-PostA	Campione di sfere di silice mesoporosa post assorbimento di acqua
MSM-100-350	Campione di sfere di silice mesoporosa con trattamento idrotermale a 100°C e calcinato a 350°C
MSM-100-350-2X	Campione di sfere di silice mesoporosa con trattamento idrotermale a 100°C, calcinato a 350°C e con quantità doppia di trimetilbenzene
MSM-100-500	Campione di sfere di silice mesoporosa con trattamento idrotermale a 100°C e calcinato a 500°C
MSM-100-500-2X	Campione di sfere di silice mesoporosa con trattamento idrotermale a 100°C, calcinato a 500°C e con quantità doppia di trimetilbenzene
MSM-100-500-PostDegP	Campione di sfere di silice mesoporosa post degradazione in plasma
MSM-130-350	Campione di sfere di silice mesoporosa con trattamento idrotermale a 130°C e calcinato a 350°C
MSM-130-500	Campione di sfere di silice mesoporosa con trattamento idrotermale a 130°C e calcinato a 500°C
Na⁺	Ione sodio
Na₂SiO₃	Silicato di sodio
Na₂SO₄	Solfato di sodio

OH	Gruppo ossidrilico
p°	Pressione di vapore saturo
PCL	Policaprolattone
PEG	Polietilenglicole
PEO	Poli etilen ossido
PMMA	Poli metil metacrilato
PO	Polietilen ossido
PPO	Poli propilen ossido
PTFE	Politetrafluoroetilene
PU	Poliuretano
PVA	Poli vinilalcol
PVP	Poli vinil pirrolidone
SBA-15	Santa Barbara Amorphus no 15
SDA	Structure Directing Agent – Agente direzionanti della struttura
SEM	Scanning electron microscopy
SF	Fibroina della seta
Si(OH)₄	Acido ortosilicico
SiO₂	Silice
TEOS	Tetra etil ortosilicato
TFC	Tempo di formazione del coagulo
TGA	Analisi termogravimetrica
TMB	Trimetil benzene
TMOS	Tetra metil ortosilicato
XPS	Spettroscopia fotoelettronica a raggi X
Zn²⁺	Ione zinco

Introduzione

Il controllo delle emorragie rappresenta una delle principali sfide in ambito medico e chirurgico: una perdita di sangue gestita non tempestivamente può portare a conseguenze anche gravi. La consapevolezza di ciò ha fatto sì che nel tempo si siano cercate delle soluzioni efficaci per interrompere il flusso sanguigno nel caso di ferite. Benché il ventaglio di possibilità sia estremamente ampio, l'obiettivo comune è sempre quello di favorire la formazione del coagulo, accelerare i processi di emostasi naturale e favorire il risanamento della ferita^{1,2}. In particolare, nello scorso trentennio si è approfondito l'interesse scientifico nei confronti di biomateriali innovativi che possano combinare efficacia emostatica, biocompatibilità, biodegradabilità e sicurezza, sia per l'uomo che per l'ambiente.

In questo contesto, le sfere di silice mesoporosa sono state oggetto di particolare interesse. Sintetizzate inizialmente come drug-carrier, se ne sono poi scoperte le proprietà emostatiche: adsorbendo acqua, favoriscono la concentrazione dei fattori di coagulazione e la loro conseguente attivazione^{3,4}. L'interesse nei confronti di questo materiale è giustificato anche dalla sua elevata biocompatibilità e biodegradabilità e dalla facilità con cui se ne può funzionalizzare la superficie. Inoltre, in ambiente biologico, la struttura del materiale tende a disgregarsi, rilasciando acido silicico, non nocivo per l'uomo⁵.

Il lavoro sperimentale svolto nella presente tesi mira ad approfondire le conoscenze finora disponibili e a verificare le proprietà di alcune sfere di silice mesoporosa. Nello specifico, si è deciso di studiare le silici sintetizzate con il metodo proposto da *Mohamed et al.*⁶, così da avere a disposizione delle particelle sferiche, di dimensione micrometrica e porosità dell'ordine della decina di nanometri. Il processo di sintesi segue alcuni step fondamentali: miscelazione dei reagenti, trattamento idrotermale, lavaggio, essiccamento e calcinazione. Oltre a seguire fedelmente le istruzioni proposte da *Mohamed et al.*⁶, si è scelto di variare alcuni parametri di sintesi, con l'obiettivo di ottimizzarli.

Le conclusioni avanzate da *Derylo-Marczewska et al.*⁷ e *Mazinani et al.*⁸ hanno portato a valutare la possibilità di variare la temperatura di trattamento idrotermale, al fine di modificare dimensione e volume dei pori e area superficiale. Sulla base degli studi *Ying et al.*⁹ si è inoltre raddoppiata la quantità di tri-metil-benzene, al fine di variare la dimensione dei pori. Per ciascuna di queste varianti di sintesi, così come per le silici prodotte seguendo il metodo di *Mohamed et al.*⁶, si sono effettuate due calcinazioni a temperature differenti: è noto che la temperatura di calcinazione possa influenzare la dimensione dei pori, l'area superficiale e la densità di silanoli superficiali, oltre che composizione chimica della superficie.

In questa tesi, quindi, si è valutata, con tecniche complementari, la morfologia, la porosità e la composizione chimica delle sfere di silice mesoporosa; inoltre, una volta caratterizzati, le proprietà emostatiche dei materiali sono state testate in plasma bovino per dimostrare una correlazione tra parametri di sintesi, struttura e proprietà emostatiche. In aggiunta, è stato effettuato uno studio preliminare sulla degradazione dei materiali, con l'obiettivo di comprendere come questi si comporterebbero, nel tempo, una volta utilizzati sull'uomo.

I contenuti della tesi sono articolati nella seguente struttura:

- *Capitolo 1: Materiali con proprietà emostatiche.* Viene presentata la necessità di individuare delle strategie che possano consentire l'interruzione di una emorragia. Dopo una breve descrizione dei meccanismi emostatici, si analizza un'ampia gamma di materiali con proprietà emostatiche, naturali e sintetici, organici e inorganici, studiati nel corso dei secoli.
- *Capitolo 2: Le silici mesoporose.* Si analizzano le varie tipologie di silici mesoporose e i rispettivi processi di sintesi. Particolare attenzione viene posta sulle varie alternative di tensioattivi e precursori silicei da utilizzare come reagenti; inoltre, si presentano possibili correlazioni tra la morfologia delle sfere e i parametri di trattamento idrotermale e calcinazione. Considerando l'applicazione finale delle silici analizzate, viene proposta una breve trattazione sulla loro biocompatibilità, degradabilità ed i come interagiscono con i naturali processi di emostasi.
- *Capitolo 3: Materiali e metodi.* Dopo aver elencato i reagenti e descritto in dettaglio le condizioni in cui avvengono le sintesi, si fa riferimento ai test svolti per analizzare la struttura e natura chimica delle silici. Di ciascun test viene effettuata una panoramica sugli aspetti teorici dello svolgimento e se ne puntualizzano le effettive modalità operative. Sono state effettuate le seguenti analisi: microscopia elettronica a scansione a emissione di campo e spettrometria di raggi X a dispersione di energia, fisisorbimento di azoto, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, termogravimetria, spettroscopia fotoelettronica a raggi X. A questi si aggiungono i test per la valutazione delle proprietà emostatiche (test emostatici, potenziale ζ e adsorbimento di acqua) e i test di degradazione in plasma.
- *Capitolo 4: Risultati.* Per ciascuna sintesi vengono presentati i risultati ottenuti in merito a morfologia, mesostruttura e chimica superficiale. Si valutano quindi i risultati dei test emostatici e sui campioni più performanti si fa la misura del potenziale ζ e dell'adsorbimento di acqua. Del campione sintetizzato secondo le indicazioni di *Mohamed et al.*⁶ e su cui è stato effettuato il test di degradazione si riportano i dati relativi a morfologia e chimica superficiale.
- *Capitolo 5: Sviluppi Futuri.* Si riportano alcuni possibili ambiti di ricerca per ampliare la conoscenza del materiale, nell'ottica di una effettiva possibilità di applicazione sul campo.
- *Capitolo 6: Conclusioni.* Il lavoro sperimentale viene riassunto e i principali risultati raccolti vengono evidenziati.

1. Materiali con proprietà emostatiche

I meccanismi che portano alla formazione del coagulo e all'interruzione dell'emorragia, benché spinti da attività di catalisi enzimatica, avvengono in un lasso di tempo per cui, nel caso di ferite più profonde, è comunque elevato il rischio di dissanguamento o gravi danni all'organismo. Pertanto, sin dagli albori della civiltà, è apparso necessario intervenire esternamente per favorire il processo di coagulazione, attraverso approcci sia meccanici che basati su interazioni biochimiche.

È necessario tener conto che il concetto di emostasi è relativamente recente, infatti solo nel XVII secolo William Harvey ha scoperto la circolazione sanguigna¹. In ogni caso, le prime testimonianze relative a tentativi di bloccare la fuoriuscita di sangue da una ferita e di risanare la stessa risalgono ai Sumeri: usavano birra o vino per pulire la ferita e su di essa applicavano infusioni di sesamo; erano inoltre diffuse delle maschere a base di fango, argilla, infusi di erbe ed olio, usate come scudo contro le infezioni e spugna per sostanze secrete dalla ferita stessa¹⁰.

Nell'Antico Egitto le ferite venivano accuratamente pulite e fasciate con delle bende di lino su cui erano poi applicati miele, grassi animali e resine, con l'obiettivo di prevenire le infezioni e favorire la guarigione. Con lo stesso obiettivo, nella Cina Antica si usavano infusi e tinture a base di foglie di tè e nell'India Antica piante e spezie come aloe, sandalo rosso e curcuma, le cui proprietà antibatteriche ed emostatiche sono state effettivamente validate in epoca moderna¹⁰. L'uso di bende impregnate con oli e miele era una strategia adottata anche nell'Antica Grecia; nell'Antica Roma sono stati introdotti per la prima volta dei meccanismi di emostasi meccanica: applicazione di una pressione diretta, legatura dei vasi e cauterizzazione, combinate all'uso di argilla. Queste tecniche vengono poi abbandonate in epoca Medioevale, quando si è osservato un ritorno a rimedi superstiziosi e rituali, per poi trovare nuovo terreno fertile a partire dal Rinascimento¹¹, quando è stato introdotto il metodo del tourniquet e migliorate le tecniche chirurgiche¹².

Tuttavia, procedure chirurgiche, suture e bendaggi non sempre sono strategie sufficienti, specialmente nel caso di ferite profonde e con margini irregolari o in contesti emergenziali, come incidenti o campi di battaglia. In questo caso, i materiali emostatici, verso i quali l'interesse è cresciuto enormemente durante la Seconda Guerra Mondiale e in generale nel XX secolo, diventano la soluzione più efficiente per controllare l'emorragia e agevolare la guarigione della ferita¹³.

1.1. *Panoramica sull'emostasi*

L'emostasi è la risposta naturale del corpo umano ad una ferita con sanguinamento. Questo processo prevede dei meccanismi, sia fisici che chimici, volti a promuovere l'aggregazione delle piastrine e la formazione di un coagulo stabile, evitando un'emorragia^{2,14}. A seguito del danneggiamento del tessuto si attivano dei recettori vascolari ed extra-vascolari che, agendo sulle varie componenti del sangue, portano al risanamento della ferita, seguendo tre fasi principali²:

- **Emostasi primaria**^{15,16}: dopo una prima fase di vasocostrizione che consente di ridurre il flusso sanguigno², le piastrine vanno ad aderire alla parete del tessuto. Successivamente all'adesione, si osserva l'attivazione piastrinica: le piastrine modificano la propria forma, passando da una struttura discoidale ad una piatta,

aumentando così la propria area superficiale ed esponendo sulla superficie alcuni recettori che facilitano la successiva aggregazione e formazione del tappo piastrinico.

- **Emostasi secondaria**¹⁷: il tappo piastrinico appena formato è debole e non garantisce sul lungo periodo una interruzione dell'emorragia; si attiva pertanto una complessa serie di reazioni enzimatiche, che prendono il nome di "cascata di coagulazione", che convergono nel completamento del coagulo. Questo è possibile grazie alla conversione del fibrinogeno in fibrina che stabilizza e rafforza il tappo piastrinico. La presenza in situ di anticoagulanti garantisce inoltre di localizzare la coagulazione alla ferita vascolare ed evitare la formazione di trombi.
- **Emostasi terziaria (o fibrinolisi)**¹⁸: una volta che il tappo di fibrina è formato, le interazioni tra i ricettori della fibrina e quelli piastrinici portano a un compattamento del coagulo con conseguente graduale riduzione del suo volume. Contemporaneamente, enzimi quali la plasmina degradano i filamenti di fibrina, favorendo l'eliminazione del coagulo e il ripristino del normale flusso sanguigno.

1.2. *Materiali emostatici a base di polisaccaridi*

1.2.1. Chitosano

Il chitosano ha una buona biocompatibilità, biodegradazione ed effetto emostatico, nonché proprietà antibatteriche¹³; viene utilizzato come rivestimento di garze, impregnante di spugne o idrogeli. Poiché il chitosano non è direttamente coinvolto nella cascata di coagulazione e agisce solo fisicamente, il suo effetto emostatico è modesto e pertanto non è efficace nel limitare emorragie importanti. Lo si abbina spesso ad altri agenti coagulanti¹⁴. Negli idrogeli in chitosano, è possibile usare delle nanocariche come la whitlockite $\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{12}$: rilasciando ioni, è in grado di attivare la cascata di coagulazione, riducendo, in vivo, la perdita di sangue del 50% rispetto ad un campione di controllo¹⁵.

1.2.2. Acido ialuronico

L'acido ialuronico, essendo una naturale componente dell'organismo, ha un'ottima biocompatibilità, oltre che una buona capacità emostatica. Espone numerosi gruppi ossidrilici sulla superficie, il che consente un elevato adsorbimento di acqua e un aumento della concentrazione piastrinica e dei fattori di coagulazione¹⁹. Viene utilizzato in combinazione con altri componenti polisaccaridici o proteici per formare degli idrogeli dalle ottime proprietà emostatiche²⁰.

1.2.3. Alginato

L'alginato è un polisaccaride anionico con una elevata capacità di adsorbimento di acqua; è in grado di attivare la cascata di coagulazione e accelerare l'aggregazione piastrinica. Idrogeli a base di alginato, nei quali il cross-linking è promosso da ioni calcio, presentano buone proprietà meccaniche e una struttura stabile e riproducibile²⁰.

1.2.4. Cellulosa Ossidata e Rigenerata

La cellulosa, se opportunamente trattata, può essere utilizzata come materiale emostatico. Rigenerando cellulosa pura ricavata dalle piante, si può ottenere un tessuto, successivamente ossidato, da applicare direttamente sulla ferita²¹. Questo è il processo previsto per ottenere Surgicel®, un prodotto unico sul mercato – per lo meno negli anni '60 – in quanto non derivato da fonti umane o animali. Risulta essere particolarmente efficace nel controllo del

sanguinamento di capillari, vene, o piccole arterie. Nonostante il coagulo venga degradato rapidamente, il corpo umano non è in grado di riassorbire la cellulosa, il che può causare stati di infiammazione cronici. Un'alternativa a Surgicel® è Oxycel®, ottenuto a partire da cellulosa ossidata con ossido nitroso. Benché molto simili, Oxycel® inibisce la rigenerazione epiteliale, per cui il suo utilizzo è limitato a poche casistiche²².

1.2.5. Amido

L'amido è uno dei polisaccaridi meno costosi e più presenti in natura. Se ne realizzano idrogeli, opportunamente funzionalizzati (es. acrilammide) per amplificare le proprietà emostatiche; in alternativa, si fanno particelle composite di amido impregnato con trombina e chitosano che favoriscono l'emostasi sia assorbendo i fluidi che aumentando la concentrazione dei fattori di coagulazione²³.

1.3. Materiali emostatici a base di proteine

1.3.1. Gelatina animale

A partire dal 1940, la gelatina animale ha trovato ampia diffusione come agente emostatico: la spugna di gelatina agisce con meccanismo principalmente fisico, assorbendo fino a 40 volte il suo peso in sangue²¹. A tal proposito, si fa riferimento a Gelfoam®, una schiuma di gelatina riassorbibile, realizzata a partire dalla pelle di maiale, disponibile in fogli o polvere; può essere modellata e tagliata in base alla forma e alle dimensioni della ferita e funge da barriera fisica alla fuoriuscita di sangue dai vasi sanguigni²⁴. Il Gelfoam® è spesso accoppiato con un coil – un sottile filo in platino che blocca per azione elettro-meccanica il coagulo – cosicché, quando il gel inizia a riassorbirsi, il coil blocca il coagulo formato²⁴.

1.3.2. Seta

La seta è una proteina naturale prodotta dagli artropodi con straordinarie proprietà fisico-chimiche²⁰. Dalla purificazione della seta è possibile ottenere la fibroina della seta (SF), che possiede una elevata biocompatibilità, oltre che elevata resistenza meccanica, biodegradazione controllata e buona permeabilità all'acqua²⁵. Per le applicazioni emostatiche può essere lavorata in diverse forme²⁵:

- *Polveri*: le polveri aderiscono al tessuto e assorbono l'acqua, andando così sia a costituire una barriera fisica al sanguinamento che a concentrare i fattori di coagulazione.
- *Spugne*: realizzate in combinazione con altri polimeri (es. PoliEtilenGlicole - PEG) tramite gas-forming o essiccamento, favoriscono la formazione del coagulo. Sono facilmente ottenibili, hanno una elevata capacità di rigonfiamento, sono sterilizzabili e possiedono una elevata area superficiale e pori interconnessi, il che favorisce l'assorbimento di fluidi. Particolarmente efficace è la spugna di nano-fibre di seta impregnate con acido maleico, che presenta un'elevata capacità emostatica, oltre che ottima emocompatibilità e assorbimento di fluidi²⁶.
- *Film*: possono essere ottenuti facilmente tramite spin-coating, casting e deposizioni layer-by-layer; possono essere utilizzati per coprire ferite superficiali, mancando della struttura tridimensionale delle spugne.
- *Sigillanti*: poiché SF da sola non sopporta gli stress in condizioni dinamiche quali l'adesione al tessuto sanguinante, è spesso combinata con PEG e tannini per massimizzare l'adesione e le proprietà emostatiche.

1.4. Agenti biologicamente attivi

1.4.1. Fibrina e Derivati

Il primo uso clinico di una emulsione di fibrina risale al 1909 e prevedeva che delle garze ne fossero imbevute e applicate direttamente sul tessuto sanguinante. Successivamente, a seguito dello sviluppo nelle tecniche di separazione proteica, si sono potuti usare dei sistemi combinati di trombina e fibrinogeno umano per migliorare l'adesione di grafts di pelle per soldati che riportavano gravi ustioni. Sin dall'inizio, tuttavia, sono emersi evidenti problemi per quanto riguarda la trasmissione di epatiti virali. I sigillanti fibrinici moderni risalgono agli anni '70: tipicamente liofilizzati, vengono depositati localmente sulla ferita tramite un'apposita siringa; il principale campo di applicazione è il settore chirurgico²⁷. Nonostante i possibili benefici, lo sviluppo di questa tecnologia ha visto davanti a sé diversi ostacoli, tra cui la mancata approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA), il che ne ha rallentato la diffusione e scoraggiato ulteriori ricerche a riguardo²¹.

1.4.2. Collagene microfibrillare

Il collagene microfibrillare emostatico, introdotto negli Stati Uniti d'America negli anni '70 da Avitene²⁸, è ottenuto dalla purificazione del collagene bovino, successivamente processato in microcristalli²¹. I microcristalli possono a loro volta essere rilavorati così da ottenere:

- *Idrogeli*: sfruttando le proprietà di self-assembling e cross-linking del collagene è possibile realizzare degli idrogeli; questi possono contribuire alla guarigione della ferita sia facilitando i processi di emostasi sia fungendo da potenziali drug-carrier. Le proprietà del prodotto dipendono dal processo di realizzazione: se si sfrutta il self-assembling si ottengono idrogeli con strutture scarsamente riproducibili, a fronte di una bassa citotossicità; viceversa, idrogeli ottenuti tramite cross-linking, sia chimico che fisico, possiedono una struttura più ordinata pur avendo una maggiore citotossicità²⁹.
- *Spugne*: le spugne a base di collagene hanno un'elevata area superficiale e consentono l'assorbimento di grandi quantità di liquidi. Si ottengono tipicamente per liofilizzazione di soluzioni di collagene e idrogeli; in base ai parametri di processo si modifica la struttura della spugna. In ogni caso, sono caratterizzate da una elevata biocompatibilità ed emocompatibilità e ottime proprietà emostatiche²⁹.
- *Polveri*: nel caso di ferite irregolari e profonde, nelle quali le spugne avrebbero difficoltà ad aderire perfettamente alle pareti dei tessuti danneggiati, si usano polveri a base di collagene. Alcune problematiche relative alle polveri di collagene riguardano la possibilità di essere rimosse dal flusso sanguigno o, a causa delle dimensioni ridotte, causare dei trombi²⁹.

Questi prodotti sono in grado di interagire con i recettori piastrinici, promuovendo l'adesione e aggregazione piastrinica e attivando la cascata di coagulazione, risultando più efficaci nei processi di emostasi sia rispetto alla cellulosa ossidata²¹ che alla spugna di gelatina²². Per migliorare le proprietà meccaniche e la stabilità strutturale è possibile realizzare dei materiali compositi a base di collagene con l'aggiunta di molecole quali alginato, chitosano, cellulosa o acido ialuronico²⁹.

1.5. Polimeri sintetici

1.5.1. Polietilenglicole

Il Polietilenglicole (PEG) è un polimero ampiamente utilizzato nel settore medico, poiché presenta un'elevata biocompatibilità e delle proprietà fisico-chimiche uniche; in base al grado di reticolazione, è possibile regolarne le proprietà meccaniche, quali durezza ed elasticità. Tuttavia, gli idrogeli a base di PEG agiscono sul meccanismo di emostasi esclusivamente in modo fisico, favorendo l'assorbimento di acqua, mancando di altre proprietà bioattive³⁰. Per questa ragione, si sono sviluppati delle matrici di PEG opportunamente funzionalizzate¹⁹ o copolimeri anfipatici contenenti PEG, che possono essere utilizzati per aumentare l'emocompatibilità, oltre che come veicolo per il trasporto di farmaci a lento rilascio³¹. Nel 2001, inoltre, la Food and Drug Administration FDA ha approvato una soluzione commerciale a base di PEG: il CoSeal è un PEG ad alto peso molecolare in un buffer di fosfato di sodio che viene applicato direttamente sulla ferita tramite uno spray; si osserva cross-linking in situ cui segue rigonfiamento, così da fungere sia da sigillante che da agente emostatico meccanico³².

1.5.2. Poliuretano

Il poliuretano (PU) presenta un elevato grado di biocompatibilità. Poiché manca di fattori coagulanti, la sua capacità nel favorire il coagulo è da attribuirsi alla possibilità di ottenere elevate aree superficiali: ad esempio, le schiume a memoria di forma termo-sensibili in PU forniscono una elevata area superficiale, oltre che la possibilità di applicare una pressione nelle pareti del tessuto lacerato che favorisce l'interruzione dell'emorragia³³. Benché particolarmente efficace, soprattutto nelle ferite letali, i lunghi tempi di degradazione in vivo presentano un ostacolo alla diffusione di questo materiale^{19,34}.

1.5.3. Polivinilalcol

Le spugne a base di polivinilalcol PVA consentono, tramite un meccanismo fisico di adsorbimento di acqua e successivo rigonfiamento, di favorire la coagulazione. Considerando le modalità di funzionamento, queste spugne trovano applicazione principalmente nel bloccare le emorragie in piccole cavità. Il PVA può essere accoppiato con caolino piuttosto che cellulosa, al fine di massimizzarne gli effetti^{19,35}.

1.5.4. Policaprolattone

Il PCL (policaprolattone) è stato approvato dalla FDA degli Stati Uniti per un'ampia gamma di applicazioni biomediche, grazie alla sua eccellente biocompatibilità e alla buona biodegradabilità, oltre che per la sua memoria di forma e termo sensibilità. Quando impiegato nello sviluppo di materiali emostatici, il PCL può formare composti con chitosano, gelatina, fibre di collagene e amido, migliorando così la biocompatibilità e la degradabilità dei materiali, senza alterare – o potenzialmente migliorando – le loro proprietà emostatiche; tuttavia, la natura idrofoba del materiale non consente una buona adesione con la matrice, per cui è necessaria la funzionalizzazione con gruppi idrofilici per garantire l'adesione e la buona riuscita del materiale emostatico¹⁹.

1.5.5. Polimeri acrilici

I polimeri acrilati come il polimetilmetacrilato (PMMA) presentano un'ottima biocompatibilità, resistenza all'acqua e durabilità; sono inoltre di facile formulazione e hanno una elevata

capacità adesiva, poiché possono aderire fortemente alla superficie danneggiata e chiudere meccanicamente la ferita¹⁹.

1.5.6. Polietilen ossido

Il polietilen ossido (PEO) è un polimero solubile in acqua che presenta un'ottima biocompatibilità e bassa citotossicità. È esente da adsorbimento aspecifico di proteine ed è frequentemente usato come vettore di farmaci¹⁹. Nell'ambito dell'emostasi, viene spesso usato come additivo, ad esempio in combinazione con il chitosano per realizzare nanofibre: il PEO riduce la tensione superficiale e la viscosità della soluzione, rendendo più efficiente il processo di elettro spinning³⁶; il sistema così realizzato, inoltre, presenta una miglior biodegradabilità e i test in vivo mostrano un sanguinamento ampiamente ridotto rispetto a una spugna in chitosano standard³⁷. Il PEO può essere accoppiato con polipropilene ossido (PPO)³⁸; di per sé il sistema non presenta alcuna proprietà emostatica, ma i polimeri possono essere funzionalizzati o, viceversa, usati come additivo, per realizzare sistemi che favoriscono la coagulazione.

1.6. Agenti emostatici inorganici

1.6.1. Nitinol

I dispositivi a rete di nitinol (NiTi) sono dischi e strutture ovoidali a maglia fine che si espandono istantaneamente una volta fuoriusciti dal catetere. L'obiettivo di questi dispositivi è quello di fornire una maglia sufficientemente fine da generare stasi del flusso e zone di ricircolo all'interno del dispositivo, favorendo così l'attivazione della formazione del coagulo, benché questo risulti poco stabile²⁴. I dispositivi più recenti mirano a combinare la natura flessibile e autoespandibile del nitinol con materiali trombogenici e biocompatibili, come il PTFE (politetrafluoroetilene). Un esempio è il Micro Vascular Plug System, prodotto da Reverse Medical®, che presenta una struttura simile a uno stent in nitinol completamente rivestita in PTFE. L'inclusione del PTFE ha lo scopo di ridurre i tempi di occlusione, costringendo il flusso sanguigno a passare attraverso pori molto più piccoli rispetto a quelli della sola struttura in nitinol³⁹.

1.6.2. Grafene

Il grafene, sulla base delle sue capacità di adsorbimento, può essere utilizzato come agente emostatico. Se ne realizzano degli aerogel a partire dall'ossido di grafene e possono eventualmente essere accoppiati alla gelatina per aumentare l'emocompatibilità e funzionalizzati con polifenoli, così da garantire una carica superficiale negativa, oltre che proprietà antimicrobiche e anti-infiammatorie. Sebbene gli studi relativi agli aerogel a base di grafene siano limitati a test in vitro, l'obiettivo è quello di realizzare dei dispositivi da applicare direttamente sulla ferita, così da garantire l'emostasi sia meccanicamente che attraverso l'attivazione della cascata di coagulazione^{40,41}.

1.6.3. Zeoliti

Le zeoliti sono degli allumino-silicati. Hanno un basso impatto ambientale ed economico e sono in grado di concentrare i fattori di coagulazione a seguito di adsorbimento di acqua grazie alla loro struttura microporosa ed elevata area superficiale; inoltre, la presenza di cavità interne nella struttura consente di ospitare ioni come Ca^{2+} , che aiutano l'attivazione della cascata di coagulazione e il controllo dell'emorragia. Tuttavia, non essendo biodegradabili, è necessario attuare un'accurata operazione di rimozione prima di suturare la ferita⁴².

Tra le varie possibilità, la zeolite che si è maggiormente diffusa come materiale emostatico è una zeolite 5°, commercializzata con il nome QuikClot® granulare, approvato nel 2002 dalla FDA come dispositivo di primo intervento per l'esercito americano¹⁹.

La zeolite A presenta una formula empirica $\text{Na}_{0.4}\text{Ca}_{5.8}(\text{SiO}_2)_{12}(\text{AlO}_2)_{12} \cdot 27 \text{H}_2\text{O}$, quando completamente idratata, e un rapporto Si:Al uguale ad 1. Quando in soluzione salina o a contatto con il sangue, rilascia Ca^{2+} , riducendo i tempi di formazione del coagulo⁴³.

L'efficacia del dispositivo è stata validata in numerosi test, sia in vitro che in vivo: ad esempio, è stato verificato che riduce il tasso di letalità fino al 100%, quando applicato a casi di laboratorio sui suini, confrontato con sistemi di garze tradizionali⁴⁴. Benché efficace, il sistema presenta alcune problematiche: può entrare nel flusso sanguigno causando trombi e sprigionare un'elevata quantità di calore in fase di adsorbimento di acqua, causando bruciature nei tessuti adiacenti¹⁹. Per queste ragioni, nei granuli di QuikClot®, oltre alla zeolite, è presente anche un binder che, sebbene diluisca l'efficacia della zeolite stessa e ne chiuda parzialmente le porosità, è indispensabile affinché la zeolite non entri nel flusso sanguigno, causando potenziali trombi^{45,46}. Per quanto riguarda il problema dell'adsorbimento esotermico, sono state sviluppate diverse soluzioni. Un'alternativa a QuikClot® è la faujasite nanometrica: i test in vitro dimostrano una resa migliore dell'emostasi e un minor rilascio di calore – associato a minori danni sui tessuti⁴⁷. Effetti simili si ottengono anche con chabaziti, che presentano eccellenti capacità di adsorbimento di acqua ed una elevata area superficiale⁴⁵. In aggiunta a questo sistema, è possibile realizzare delle strutture a sandwich che prevedono l'alternanza di strati di zeolite e di cellulosa batterica – un prodotto extracellulare bio-sintetizzato da alcuni batteri. Questo tipo di cellulosa consente di ridurre l'area di contatto tra pelle e zeolite e, di conseguenza, i rischi di bruciature; inoltre, la naturale struttura porosa del materiale consente l'immobilizzazione dei granuli, abbattendo il rischio di trombi, e la sua spiccata idrofilia favorisce l'adsorbimento di acqua e la concentrazione dei fattori di coagulazione⁴². Inoltre, si è osservato che quando i granuli di QuikClot® sono in proporzione maggiore rispetto ai fluidi, sviluppano un calore maggiore, per cui idealmente si dovrebbero usare su ferite in il sangue non è stato precedentemente rimosso⁴⁸.

1.6.4. Argille

Le argille sono degli allumino-silicati idrati costituite da un'alternanza di fogli di tetraedri di silicio e fogli di ottaedri di alluminio. In base al rapporto tetraedri su ottaedri, le argille si distinguono in due famiglie: se il rapporto è 1:1 si tratta di caolino; se il rapporto è 2:1 si tratta di smectite. Hanno un'elevata stabilità termica, alta area superficiale e possibilità di dare scambio ionico; a seguito di adsorbimento di acqua il materiale si espande, favorendo la formazione di un coagulo quando applicati ad una ferita sanguinante⁴⁹. Le argille non sono biodegradabili, dunque è necessario rimuoverle prima di agire chirurgicamente sulla ferita e richiuderla⁵⁰.

Caolino

Il caolino presenta un'area superficiale e una capacità di dare scambio ionico relativamente bassa. È comunque in grado di attivare la cascata di coagulazione grazie ad una serie di fattori concomitanti: la polarità del network allumino-silicato fornisce un sito preferenziale per la coagulazione; inoltre, la carica superficiale negativa consente una più facile attivazione dei fattori di coagulazione e alla formazione del tappo fibrinico. Il prodotto commerciale è

QuickClot Combact GauzeTM 49, una garza di non-tessuto imbevuta con caolino⁵¹, sviluppato come risposta ai problemi del QuickClot® granulare⁵².

Il caolino, inoltre, può lavorare in sinergia con le zeoliti: mentre il caolino agisce sui primi stadi della coagulazione, le zeoliti agiscono su quelli successivi. Ne segue che il loro utilizzo combinato può ridurre drasticamente i tempi di coagulazione e di conseguenza l'entità dell'emorragia⁵².

Smectite

La smectite ha un'elevata area superficiale e capacità di dare scambio ionico. In confronto al caolino, l'adsorbimento di acqua è maggiore, così come il rigonfiamento. La carica negativa superficiale, a contatto con il sangue, consente l'attivazione della cascata di coagulazione, cui segue una forte riduzione dei tempi di formazione del coagulo⁴⁹; nel caso di ferite più superficiali si osserva un minor tempo di chiusura della ferita stessa⁵³. Il prodotto commerciale è WoundStatTM, una medicazione granulare costituita da smectite, il cui effetto trombotico è ancora in fase di definizione⁵¹; inoltre, è possibile che successivamente all'applicazione di WoundStatTM si sviluppi uno stato infiammatorio acuto, dovuto alla presenza di corpi esterni nell'organismo, difficili da rimuovere, che rende più lungo e doloroso il decorso di guarigione⁵⁴; in alternativa, la completa rimozione dei granuli di WoundStatTM può causare la lacerazione dei vasi, il che rende necessario l'utilizzo di graft per la sostituzione⁵⁰. La smectite granulare può, in alternativa, essere inserita in una matrice di poliacrilati, così da aumentare ulteriormente la capacità di adsorbimento; a tal proposito, è stato osservato che la smectite ha una capacità limitata e pertanto il dispositivo non può essere riutilizzata nel caso di sanguinamenti successivi⁵⁵.

1.6.5. Laponite

La laponite è un silicato sintetico costituito da elementi non tossici (Na^+ , Mg^{2+} , $\text{Si}(\text{OH})_4$, Li^+), utilizzato come nano-carica in idrogeli per modificarne le proprietà reologiche. La matrice può essere realizzata sia in gelatina animale che polimerica: la presenza di laponite riduce i tempi di coagulazione, favorendo l'attivazione di fattori pro-coagulanti e l'adsorbimento dei fluidi grazie alla presenza contemporanea di carica positiva e negativa sulla superficie; causa, tuttavia, un aumento nell'emolisi, che rimane comunque sotto i valori soglia²³.

1.6.6. Montmorillonite

La montmorillonite è un silicato molto efficace nel migliorare le proprietà emostatiche di un idrogelo, grazie all'elevata capacità di assorbire plasma. Degradando, le sue particelle possono disperdersi nel sangue, causando trombosi; il problema può essere risolto inglobando le particelle in una matrice di grafene ossido²³.

1.6.7. Vetri bioattivi

I vetri bioattivi, la cui formula chimica generale è $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-MO}$ ($\text{M}=\text{Na}$, Mg , etc.), sono stati inizialmente introdotti nel settore della ricostruzione dentale ed ossea per la loro capacità di legarsi sia ai tessuti molli che ai tessuti duri con una bassa risposta infiammatoria. Per ottenere dei vetri bioattivi con proprietà emostatiche è stato modificato il rapporto Si/Ca : si è osservato che tanto più il rapporto è elevato, tanto più i tempi di formazione del coagulo sono brevi⁵⁶.

I vetri bioattivi presentano una grande area superficiale ed un'elevata densità di silanoli che conferiscono alla superficie dei vetri una forte carica negativa. La particolare combinazione tra la morfologia liscia della superficie vetrosa e la sua elevata carica elettrostatica determina il cosiddetto *effetto vetro*, fenomeno che comporta un incremento della concentrazione dei fattori della coagulazione e la loro conseguente attivazione. Fondamentale, inoltre, è la presenza di ioni Ca^{2+} , Al^{3+} e Zn^{2+} che, seppur presenti in traccia, sono coadiuvanti del processo di emostasi⁵⁷. È possibile utilizzare anche il tantalio come dopante, che porta ad una ulteriore riduzione del tempo di coagulazione, senza ritardare il risanamento della ferita⁵⁸.

È possibile ottenere anche delle particelle nanometriche di vetri bioattivi che, accoppiate in strutture multi-layer ad altri materiali come tannini e polipeptidi, sono in grado di supportare l'intero processo di emostasi e successiva rigenerazione tissutale, garantendo un'ottima adesione e bassa risposta infiammatoria da parte dell'organismo⁵⁹.

2. Le silici mesoporose

Negli ultimi decenni, l'interesse verso le silici mesoporose è cresciuto notevolmente grazie ai numerosi possibili campi di applicazione. Ottenute tipicamente tramite processi di self-assembly, presentano alcune proprietà ricorrenti: struttura porosa ordinata, volume dei pori ed area superficiale elevati, dimensione adattabile alle applicazioni, possibilità di funzionalizzare sia la superficie dei pori che quella esterna e buona biocompatibilità^{5,60}.

Nel 1992, alla Mobil Corporation, Kresge et al.⁶¹ riportò per la prima volta la sintesi della MCM-41 (Mobil Composition of Matter No. 41). Si tratta di una silice mesoporosa con un sistema di porosità esagonali unidirezionali, con dimensioni comprese tra i 2,5 e 6nm⁶², che le conferiscono un'elevata area superficiale. Ciò la rende particolarmente efficace nell'adsorbimento di gas e come setaccio molecolare⁶³. Successivamente, furono sviluppate le silici MCM-48, con struttura cubica, e la MCM-50, lamellare, tutte appartenenti alla famiglia M41S⁶⁴. Nel 1998, Zhao et al. sintetizzò la Santa Barbara Amorphous no 15 (SBA-15), una silice mesoporosa con porosità esagonali con dimensioni fino a 30nm⁶⁵. Zhu et al. ottenne delle sfere di silice mesoporosa cava, con ottime potenzialità nel settore del drug delivery⁶⁶.

2.1. Sintesi

Le silici mesoporose vengono tipicamente sintetizzate con una modifica del metodo Stöber, tradizionalmente usato per ottenere sfere di silice. La modifica consiste nell'aggiunta di un tensioattivo al solvente, in quantità sufficiente a raggiungere la concentrazione micellare critica, necessaria alla formazione delle micelle, fondamentali per la realizzazione del sistema mesoporoso della silice⁶³.

La formazione delle porosità avviene per self-assembly sopramolecolare, secondo un meccanismo noto come liquid-crystal templating (LCT), che consente l'ottenimento di strutture ordinatamente porose su scala nanometrica. Questo processo prevede l'auto-organizzazione di micelle formate da tensioattivi, attorno alle quali si aggregano i precursori della silice, generando strutture mesoporose ben definite⁶⁷. Ne segue che, indipendentemente dalla tipologia di silice mesoporosa che si vorrebbe ottenere, il processo di sintesi segue alcuni step, come mostrato in *Figura 1*:

- dissoluzione del tensioattivo nel solvente (tipicamente acquoso) e formazione delle micelle;
- aggiunta del precursore siliceo e idrolisi;
- precipitazione degli oligomeri di silice sulle micelle e formazione di un gel per condensazione;
- rimozione del template.

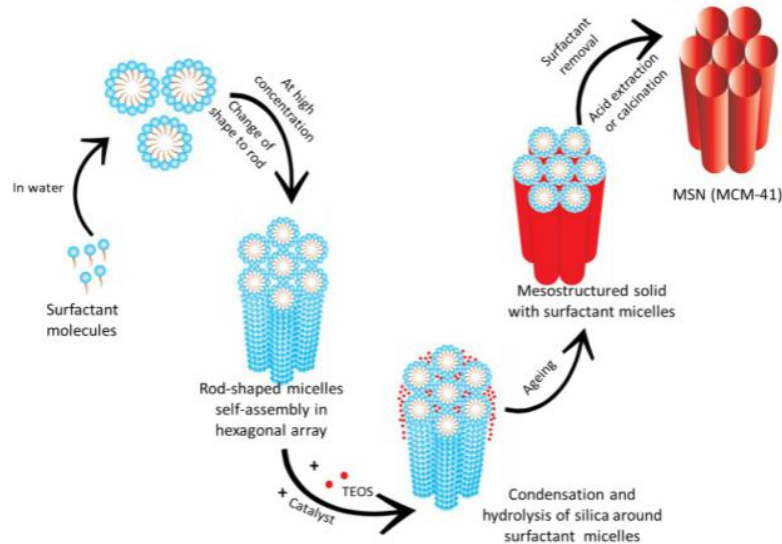


Figura 1. Meccanismo di formazione della MCM-41⁶²

Dopo la formazione del gel, avvenuta come riportato in *Figura 2*, è spesso eseguito un trattamento idrotermale per completare la condensazione e garantire la formazione di una mesostruttura ordinata⁹.

Modificando i reagenti ed i parametri di reazione, è possibile variare la forma, la struttura, la morfologia e le proprietà delle silici.

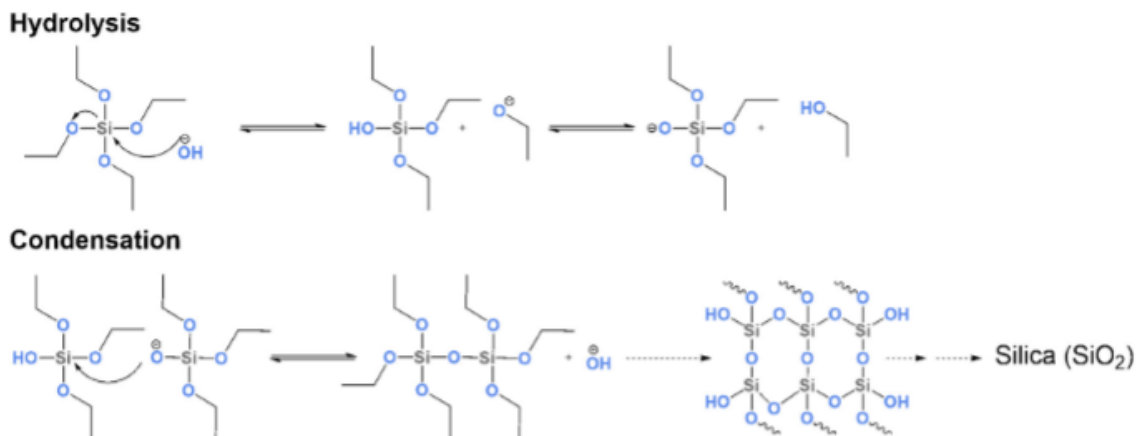


Figura 2. Idrolisi e condensazione dei silicati⁵

2.1.1. Tensioattivi

La sintesi delle silice mesoporose coinvolge l'interazione tra specie inorganiche, come i precursori silicei, e specie organiche, principalmente i tensioattivi. Diversi tipi di tensioattivi sono stati impiegati con successo⁹:

- **Tensioattivi cationici:** i più comunemente usati, includono il cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB) e il cloruro di cetilpiridinio, che sono efficaci nella sintesi di materiali mesoporosi in condizioni sia acide che basiche;
- **Tensioattivi anionici:** includono carbossilati, solfonati, solfati di alcool e amminoacidi, utilizzati come agenti direzionanti della struttura (SDA);

- **Tensioattivi nonionici:** spesso sono copolimeri a blocco di poli(ossido di etilene)-poli(ossido di propilene)-poli(ossido di etilene) (PEO-PPO-PEO), come i Pluronic, che offrono una grande versatilità e spesso non sono tossici, consentendo la sintesi di mesofasi con diverse geometrie;
- **Tensioattivi zwitterionici:** contengono sia gruppi carichi positivamente che negativamente.

Il primo tensioattivo ad essere studiato fu il CTAB, per la sintesi di MCM-41^{61,63}. Successivamente, Zhao et al. utilizzò il copolimero a blocchi EO₂₀PO₇₀EO₂₀ P123 in sinergia con CTAB così da ottenere una SBA-15 sferica⁶⁸. Dongyuan et al. studiò poi come un diverso rapporto EO:PO potesse influenzare la morfologia della mesostruttura: un rapporto basso è associato ad una struttura esagonale ed ordinata; le porosità variano tra 4,6 e 10nm in funzione della temperatura di sintesi (tra i 35 e i 100°C)⁶⁹. È possibile utilizzare anche altri tipi di Pluronic come F127: è un tensioattivo zwitterionico che permette di ottenere dei sistemi tridimensionali di canali, molto interessanti per il trasporto molecolare, tipici della MCM-48⁷⁰. In ogni caso, è importante valutare il grado di solubilità dei copolimeri a blocchi e la loro concentrazione micellare critica così da definire la temperatura di sintesi: per P123 la temperatura ideale da applicare durante la sintesi è tra i 35 e 40°C, mentre per altri Pluronic è attorno ai 90°C⁹.

Per ottenere sfere di silice mesoporosa cave, Zhu et al. propose un metodo di sintesi alternativa che prevede l'utilizzo di poli-vinil-pirrolidone (PVP) e CTAB come co-templanti in ambiente basico a temperatura ambiente: PVP è il templante del core, CTAB è il templante per la struttura mesoporosa⁷¹.

2.1.2. Precursori silicei

La prima sintesi di MCM-41 prevedeva l'utilizzo di tetra-metil-ammonio-silicato come fonte di silicio per la reazione⁶¹; successivamente, gli studi di Tanev et al. portarono all'adozione del tetra-etil-ortosilicato (TEOS), combinato ad una ammina primaria per favorirne l'idrolisi e successiva condensazione⁷². Inagaki et al. ottenne una silice mesoporosa con canali esagonali FSM-16, molto simile a MCM-41, ma a partire da kanemite come precursore e dodecanil trimetil ammonio (CTMA) come agente templante⁷³.

I principali precursori silicei nelle reazioni di sintesi di SBA-15 sono TEOS (utilizzato nella prima sintesi da Zhao et al.⁶⁸), tetra-metil-ortosilicato (TMOS) e tetra-propil-ortosilicato (TPOS)⁶⁹. In alternativa al TEOS si può usare anche Na₂SiO₃⁷⁰. L'utilizzo di TMOS è associato ad una condensazione più rapida e, conseguentemente, alla formazione di silici con morfologia preferenziale fiber-like; viceversa, la velocità di condensazione è minore se si utilizza TEOS, per cui si otterranno delle silici con conformazione preferenziale rope-like. Aggiungere sali (NaCl, KCl, Na₂SO₄ o K₂SO₄) o co-solventi al sistema causa una variazione nel rate di condensazione e nella forma delle micelle, per cui è possibile ottenere strutture giroidali, discioidali o sferiche^{9,74}.

La struttura è influenzata, oltre che dal precursore, anche dall'ambiente di sintesi: per esempio, la MCM-41 è ottenuta in condizioni basiche mentre la SBA-15 si ottiene in condizioni acide. La sintesi in condizione acida, inoltre, consente di avere un maggior controllo sulla struttura delle particelle (film sottili, monocristalli, sfere). Viceversa, in ambiente basico, la polimerizzazione è più rapida e tipicamente di ottiene un network 3D meno ordinato⁹. Ciò è spiegabile con il fatto che, in ambiente acido, le micelle assumono una morfologia caratterizzata da curvature più marcate, tali da consentire finanche la formazione di sfere⁷⁵.

2.1.3. Trattamento idrotermale e rimozione del templante

Nella produzione di materiali mesoporosi, la sintesi idrotermale è uno step piuttosto comune: consente infatti di ottenere una struttura ordinata dei pori e di regolarne i diametri. Per le silici, il trattamento idrotermale viene effettuato tra i 70°C e i 150°C: all'aumentare della temperatura, aumenta la dimensione e il volume dei pori e diminuisce l'area superficiale specifica⁷. In generale, a temperature più alte, si può osservare una parziale degradazione del copolimero templante, il che causa la formazione di una silice meno ordinata; inoltre, se in condizioni alcaline, è possibile osservare la trasformazione di fase da MCM-41 a MCM-48⁹.

Attorno ai 130°C, aumenta l'idrofobicità del PEO del Pluronic, poichè le micelle sono più grandi e con esse aumentano di dimensione anche i pori; così facendo, nella SBA-15 è possibile osservare un aumento nel diametro dei pori fino a 10nm. Per aumentare ulteriormente i diametri, è possibile aggiungere in fase di sintesi degli agenti rigonfianti, quali il trimetil benzene TMB: si sono osservate porosità fino a 40nm^{8,9}.

Una volta ottenuta la silice a seguito del trattamento idrotermale, questa viene lavata ed essiccata. A questo punto, è necessario rimuovere i templanti e, qualora presente, l'agente rigonfiante. Per farlo, una strategia comunemente usata è la calcinazione, la quale viene svolta a temperature comprese tra i 350°C e i 550°C; queste temperature sono abbastanza alte da consentire la rimozione del copolimero e al contempo abbastanza basse da far sì che la struttura mesoporosa non collassi. In alternativa, è possibile fare estrazione con etanolo, utilizzare le microonde o lampade ultraviolette, soluzioni comunque meno efficaci e potenzialmente più dispendiose della calcinazione⁹.

Una calcinazione a temperature di 550°C o superiori consente una rimozione più efficace del tensioattivo; tuttavia, lavorare a temperature così alte può provocare delle modifiche strutturali irreversibili indesiderate: a seguito di una parziale sinterizzazione, si riduce la dimensione dei pori, il loro volume e l'area superficiale⁷⁶. Inoltre, in funzione delle possibili applicazioni, è necessario valutare come variano le proprietà superficiali della silice. Si prende come riferimento la SBA-15: sulla superficie, questo materiale espone gruppi silossani idrofobici ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) e gruppi silanoli idrofilici ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$). I silanoli possono essere isolati, vicinali o geminali, in base al grado di idratazione della silice. Questi gruppi funzionali sono riportati in *Figura 3*. All'aumentare della temperatura di calcinazione, i silanoli non isolati possono condensare, andando a formare gruppi silossani, aumentando l'idrofobicità del sistema⁷⁶.

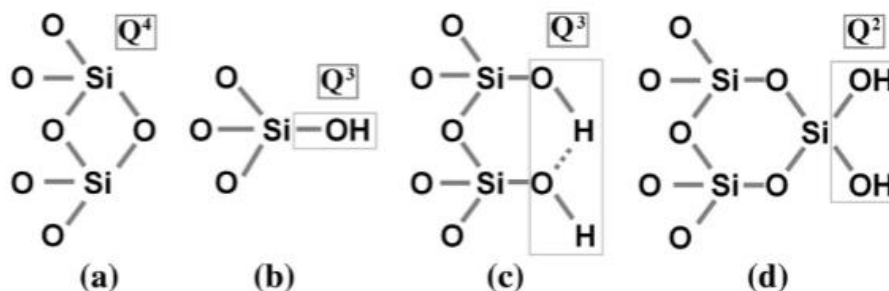


Figura 3. Composizione chimica della superficie della silice: a) gruppo silossanico, b) silanolo isolato o libero, c) silanolo vicinale o pontato, d) silanolo geminale⁷⁶.

2.2. Applicazioni biomediche delle silici mesoporose

Le silici sono state approvate dall'FDA e dall'EFSA (European Food Safety Authority) per il loro utilizzo in ambito biomedicale, cosmetico e nell'industria alimentare^{3,5}. Le silici mesoporose hanno poi trovato un più ampio settore di applicazioni, grazie alla loro più elevata area superficiale e volume interno rispetto al corrispettivo denso⁷⁷. Le prime silici mesoporose sintetizzate hanno trovato applicazione come drug carrier, in quanto particolarmente efficaci nell'ospitare, proteggere e trasportare il farmaco fino al sito prestabilito. La capacità di trasportare molecole, le ha rese interessanti anche nel campo del bio-imaging, della somministrazione di vaccini^{3,78} e nella cura di tumori aggressivi⁷⁹. Studi successivi hanno contribuito a dimostrare l'efficacia delle silici mesoporose anche nell'incrementare l'attività emostatica^{80,81}. Poiché le silici sono utilizzate spesso nel settore biomedico, è importante valutare la risposta dell'organismo nei confronti di questi materiali⁶⁷.

2.2.1. Biocompatibilità e citotossicità

I meccanismi di citotossicità delle silici sono principalmente due⁵:

- i **gruppi silanoli** - a pH fisiologico di circa 7,4 - tendono a deprotonarsi, conferendo alla superficie una carica negativa⁸². L'aumento di reattività favorisce le interazioni con i fosfolipidi e ciò causa membranlisi;
- i **silossani** formano degli anelli silossanici con tre atomi di ossigeno, che possono causare membranlisi.

La presenza di silossani e silanoli dipende dal meccanismo di rimozione del template, per cui è fondamentale conoscere il processo di sintesi per sapere come si comporterà la silice nell'organismo⁵. Per evitare un'interazione negativa con le cellule del sistema immunitario, è spesso necessario funzionalizzare le silici con chitosano, acido ialuronico o PEG⁸², il cui processo è facilitato proprio dalla presenza dei silanoli superficiali⁷⁰. È importante che la superficie mantenga comunque una carica negativa (o al più neutra) perché una carica superficiale positiva causerebbe una risposta dell'organismo ancora più aggressiva⁸².

Le modifiche superficiali avvengono, oltre che in fase di sintesi, anche a livello biologico con la formazione della corona proteica: si tratta di proteine adsorbite sulla superficie mesoporosa che creano un "guscio" attorno alla particella. La presenza della corona proteica è importante perché va a ridurre il tasso di emolisi, così come a consentire l'attraversamento delle barriere del sangue e del cervello e a mascherare eventuali modifiche superficiali⁵.

La biocompatibilità dipende, oltre che dalla superficie, anche da altri fattori:

- **dimensioni**: le particelle più piccole rimangono nell'organismo per tempi più lunghi rispetto a quelle più grandi, sebbene le particelle più grandi abbiano una citotossicità intrinseca più elevata⁷⁰. Gli studi riguardo la dipendenza tra biocompatibilità e dimensione delle particelle sono però piuttosto controversi. Secondo *Lin et al.*⁸³ le particelle nanometriche sono associate ad un tasso di emolisi più elevato in confronto a particelle più grandi. Analogamente, *Farjadian et al.*⁸⁴ dimostrarono che le particelle micrometriche hanno una minore citotossicità rispetto alle particelle nanometriche, a parità di composizione; successivamente, hanno anche considerato la possibilità che la citotossicità fosse legata più alla modalità di somministrazione che alla dimensione delle particelle di silice. *Frinckenstein et al.*⁸² evidenziarono come particelle con dimensioni tra i 20 e gli 80nm fossero ideali per riuscire a superare le barriere biologiche; nella definizione del diametro ritennero necessario tener conto anche della corona proteica.

*Asefa et al.*⁶⁷, dopo aver valutato l'effetto di particelle tra gli 80 e i 500nm, affermarono che, benché particelle più piccole intralcino di più i processi cellulari, quelle più grandi mostrano una minor efficacia nell'adsorbimento proteico e, qualora incorporate nei globuli rossi, ne possono causare una deformazione;

- **forma:** particelle con aspect-ratio elevata sono in grado di penetrare i tessuti con più facilità, con riscontri positivi soprattutto nell'utilizzo come targeting drug carrier⁷⁰;
- **struttura:** sebbene le silici mesoporose possano indurre uno stress ossidativo a causa della maggior area superficiale e silanoli esposti rispetto alle silici dense, è stato dimostrato che hanno una citotossicità minore, così come un più basso rate di emolisi^{70,84}. Inoltre, la maggior area superficiale garantisce un miglior adsorbimento⁶⁷. Poiché la ridotta citotossicità è associata alla mesostruttura, è importante valutarne la stabilità seguito di invecchiamento⁸⁴.
- **dosaggio:** considerando che un tipico dosaggio è 1-50 mg/kg e che la dose letale è di 1000 mg/kg, si è ben lontani da questa soglia critica⁵.

Inoltre, la presenza di residui di tensioattivo influenza in modo drammatico la biocompatibilità, in quanto possono legarsi in maniera irreversibile con le proteine, causandone l'aggregazione, a scapito dei processi cellulari⁸⁵.

2.2.2. Degradabilità

L'ampio utilizzo delle silici in ambito biomedicale è favorito anche dalla loro elevata degradabilità: a contatto con i fluidi corporei vanno incontro ad idrolisi; si produce acido silicico, che può essere facilmente smaltito dall'organismo e non si osservano accumuli potenzialmente dannosi. La degradazione avviene in step successivi: dapprima si osserva l'adsorbimento di acqua; segue poi l'idrolisi, durante la quale l'acqua reagisce con i silossani trasformandoli in silanoli; i silanoli così formati possono partecipare alle reazioni di estrazione ionica, che causano la produzione di acido silicio e oligomeri e la completa disgregazione della struttura⁵.

La forza spingente della degradazione è la sotto-saturazione della silice nel mezzo in cui si trova. Il meccanismo con cui essa avviene è governato dalla diffusione: prima si osserva dissoluzione e diffusione delle specie passate in soluzione dal network poroso verso l'interfaccia con il solvente (fase continua); successivamente, lo step determinante la velocità di reazione diventa la diffusione dall'interfaccia silice-solvente verso la fase continua, seguendo il gradiente di concentrazione e il limite di solubilità.

In generale, si osserva che una maggiore area superficiale è associata ad una velocità di degradazione superiore, indipendentemente dalle dimensioni delle particelle^{5,85}. Questo perché le aree superficiali delle porosità sono molto maggiori rispetto alla superficie esterna, che dunque risulta essere trascurabile. Ne segue che, a parità di mesostruttura, dopo la rimozione del tensioattivo, tutte le silici hanno lo stesso rate di degradazione. Quest'ultimo è invece inferiore se la particelle formano degli aggregati: la superficie di contatto con l'acqua è infatti inferiore. Osservando le particelle al SEM, si nota una ondulazione superficiale, pur rimanendo la morfologia invariata; ciò dimostra che il processo di degradazione è eterogeneo sulla superficie⁶⁶.

2.2.3. Proprietà emostatiche

La conoscenza delle proprietà emostatiche delle silici risale agli anni sessanta del secolo scorso: gli studi di *Margolis* dimostrarono che, al di sopra di una certa concentrazione critica di silici, il tempo di coagulazione veniva drasticamente ridotto⁸⁶. Nelle silici mesoporose, l'aumento di area superficiale rispetto al corrispettivo denso ne amplifica gli effetti emostatici. Questo avviene perché la mesostruttura, sfruttando le forze di capillarità, favorisce l'impregnazione di sangue delle silici; contemporaneamente, l'acqua presente nel sangue forma legami a idrogeno con i gruppi idrossido superficiali e si osserva concentrazione e attivazione dei fattori di coagulazione^{3,4}. La presenza di OH superficiali sembra infatti catalizzare l'attività proteica. Così come per zeoliti, anche per le silici mesoporose l'adsorbimento di acqua è associato ad un certo grado di esotermia, che però causa aumenti di temperatura contenuti (entro i 4°C)⁸⁷.

Particelle di silice mesoporosa con porosità più grandi presentano proprietà emostatiche migliori rispetto allo stesso materiale con pori più piccoli; variazioni nella dimensione delle particelle stesse influisce minimamente sull'attività emostatica. Questo perché la dimensione dei pori influenza direttamente l'accessibilità e la diffusione degli agenti pro-coagulanti^{88,89}.

Al fine di massimizzare le proprietà delle silici, è possibile funzionalizzarle: acido tannico e ioni calcio lavorano sinergicamente per amplificare le proprietà emostatiche delle silici^{3,81,87}; la presenza di ioni farmaci antibatterici aiuta a prevenire le infezioni. In alternativa ai farmaci, è possibile utilizzare dopaggi con ioni argento: lo ione si lega ai gruppi tiolo delle proteine batteriche disattivandole (o interagisce con il DNA batterico, inibendo la capacità di replicarsi)⁸⁷.

Silici mesoporose nella forma di polveri, tuttavia, presentano alcune problematiche⁴:

- a causa della bassa densità, le particelle galleggiano sul sangue, il che ne rallenta l'impregnazione;
- le polveri sono incompressibili, per cui diventa difficile applicare una pressione sulla ferita per rallentare il flusso sanguigno;
- è possibile che le polveri, in fase di applicazione, vengano disperse nell'ambiente, contaminandolo;
- nel caso in cui sia necessario uno sbrigliamento della ferita, il coagulo formatosi risulta difficile da rimuovere, il che causa dolore nel paziente;
- in fase di applicazione, è possibile che la struttura delle silici vari, e con essa le proprietà emostatiche.

Una soluzione a questi problemi può essere la granulazione delle polveri⁴ o, in alternativa, l'immobilizzazione delle polveri su supporti in fibra di cotone: il composito silice mesoporosa–cotone ha portato a un tempo di coagulazione più breve e ad una minore perdita di sangue rispetto alla semplice polvere di silice³.

3. Materiali e metodi

La rassegna della letteratura finora condotta evidenzia come le silici mesoporose siano materiali di grande rilevanza per le prospettive offerte nel controllo dell'emostasi. Le loro caratteristiche strutturali, quali porosità area superficiale, influenzano in maniera significativa l'interazione con i componenti ematici e, di conseguenza, la capacità di promuovere l'arresto del sanguinamento. Si intende pertanto approfondire lo studio di alcune silici mesoporose, con l'obiettivo di chiarire in che modo i parametri di sintesi incidano sulla formazione della loro struttura e sulla loro attività emostatica. Particolare attenzione sarà rivolta alla relazione tra le modifiche strutturali indotte e la variazione delle proprietà emostatiche osservate, fondamentale per lo sviluppo di materiali emostatici più efficaci.

L'attività sperimentale svolta per ottenere delle sfere di silice mesoporosa è di seguito riportata. Sono state effettuate tre sintesi differenti, variando la quantità di reagenti, la temperatura di sintesi e di calcinazione. Ciascun campione ottenuto è stato caratterizzato al fine di individuare una correlazione tra parametri di sintesi e proprietà risultanti. In particolare, è stata analizzata la composizione chimica della superficie e la morfologia dei campioni. Sono stati effettuati anche alcuni test per valutare l'attività emostatiche e li meccanismi di degradazione delle silici.

3.1. I 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 ((EO₂₀PO₇₀EO₂₀; HO(CH₂CH₂O)₂₀(CH₂CH(CH₃)O)₇₀(CH₂CH₂O)₂₀H) Sigma-Aldrich®, Mesitilene (1,3,5-trimetilbenzene, C₉H₁₂, 98%) Sigma-Aldrich®, Ortosilicato tetraetile (TEOS, SiC₈H₂₀O₄ 99,999%) Sigma-Aldrich®, Plasma bovino (Fonte SLCM4897) Sigma-Aldrich®, Cloruro di calcio (CaCl₂, in polvere, >99,999%) Sigma-Aldrich®.

3.2. Sintesi delle microsfele di silice mesoporosa

La sintesi delle sfere di silice mesoporosa è stata eseguita con alcune modifiche rispetto al protocollo proposto da *Mohamed et al*⁶. Per la prima sintesi, ad un becher con 60 g di acqua deionizzata, a temperatura ambiente, si aggiungono 11,8 g di soluzione di HCl, 3,05 g di KCl e 2 g di P123, che fungerà da agente templante. La soluzione così ottenuta viene posta su un agitatore magnetico a 300 rpm a 25°C per un'ora, al fine di garantire la completa dissoluzione delle specie presenti, in particolare del P123. Al termine dell'ora, si aggiungono 1,5 g di mesitilene TMB, nonché agente rigonfiante, e si continua l'agitazione per altre 2 ore. A questo punto si introduce la fonte di silicio: 4,25g di TEOS vengono aggiunti goccia a goccia; per garantire la completa miscelazione, il sistema viene sottoposto ad agitazione per 10 minuti a 1000 rpm. Si trasferisce la soluzione in un una bottiglia di PTFE e si pone tutto il sistema in bagno d'olio a 35°C, dove vi rimarrà per 24 ore in condizioni statiche; al termine delle 24 ore la bottiglia viene chiusa ermeticamente, la temperatura è fatta aumentare fino a 100°C e il sistema viene lasciato in queste condizioni per altre 24 ore (trattamento idrotermale). Il materiale precipitato al termine di questo processo viene lavato con acqua distillata e posto in stufa per un giorno a 50°C. Le polveri così ottenute necessitano di una calcinazione per rimuovere il templante; viene dunque impostata la rampa di temperatura: con una velocità di 1°C/min si passa da temperatura ambiente fino alla temperatura di calcinazione; il sistema viene mantenuto per 6 ore a questa temperatura e poi, con una velocità analoga a quella di riscaldamento, viene fatto raffreddare. Per effettuare la calcinazione, le polveri vengono divise in due parti: il primo gruppo subirà una calcinazione a 350°C mentre il secondo gruppo a 500°C.

Si vogliono valutare le conseguenze di una diversa temperatura di calcinazione sulla struttura delle sfere di silice⁸. Al termine della calcinazione, nonché del processo di sintesi, si sono ottenuti due campioni da circa 500 mg ciascuno. I campioni così ottenuti sono stati denominati MSM-100-350 e MSM-100-500: il primo numero indica la temperatura di trattamento idrotermale e il secondo la temperatura di calcinazione.

In *Figura 4* è riportato lo schema del protocollo di sintesi, evidenziando i parametri che hanno subito una modifica nella seconda e terza sintesi.

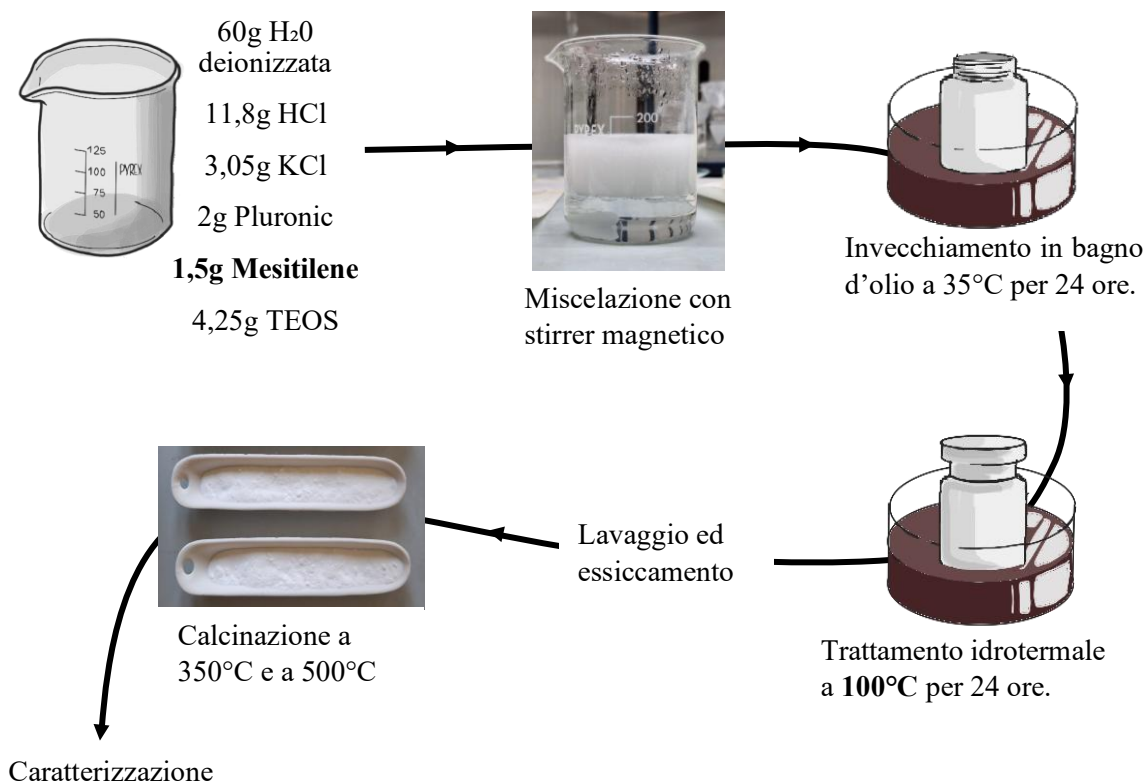


Figura 4. Schema della prima sintesi e, in evidenza, i parametri modificati nelle sintesi successive.

Per la seconda sintesi, si è seguito il protocollo di sopra descritto ad eccezione della temperatura di trattamento idrotermale, che è stata aumentata da 100°C a 130°C. Questa variazione è stata effettuata al fine di verificare se l'aumento di temperatura influenzi in modo non trascurabile la dimensione dei pori⁸. Si sono ottenuti due campioni da circa 500 mg ciascuno, denominati MSM-130-350 e MSM-130-500.

Per la terza sintesi, si sono mantenute le temperature della prima sintesi ma sono stati utilizzati 3g di TMB: l'aumento di agente rigonfiante è stato effettuato con l'obiettivo di aumentare la dimensione dei pori⁹. Sono stati ottenuti due campioni da circa 500 mg ciascuno, denominati MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.

3.3. Caratterizzazione strumentale

La caratterizzazione delle silici mesoporose richiede l'utilizzo di diverse tecniche analitiche e complementari, in grado di restituire informazioni sulla morfologia, sulla struttura porosa e sulla composizione chimica del campione: il FESEM, associato all'EDX, consente di analizzare la morfologia superficiale e verificare la presenza di elementi contaminanti; le misure di fisisorbimento di azoto permettono di determinare l'area superficiale specifica, la distribuzione

dimensionale e il volume dei pori; la spettroscopia FTIR fornisce indicazioni sui gruppi funzionali superficiali; la TGA consente di valutare la stabilità termica e la quantità di specie adsorbite; la spettroscopia XPS permette di ottenere dati qualitativi e quantitativi sulla composizione chimica superficiale.

3.3.1. Microscopia elettronica FESEM e spettrometria EDX

La microscopia elettronica a scansione a emissione di campo (FESEM) è una tecnica che utilizza un fascio di elettroni ad alta energia per analizzare la superficie del campione. Gli elettroni vengono emessi da una sorgente di emissione di campo e quindi focalizzati, accelerati e resi monocromatici da alcune lenti magnetiche. A seguito di tale processo, il fascio di elettroni interagisce con il campione, generando a sua volta elettroni secondari, back-scattered, Auger e raggi-X; questi poi vengono raccolti da opportuni detector e restituiscono le informazioni richieste dal test. Analizzando gli elettroni secondari, lo strumento è in grado di dare informazioni sulla morfologia della superficie del campione, mentre valutando i raggi X si ricavano informazioni sulla sua composizione chimica (spettrometria di raggi X a dispersione di energia EDX). Affinché l'analisi sia efficace è necessario che il campione, qualora isolante, venga metallizzato⁹⁰.

Per la caratterizzazione delle silici è stato utilizzato lo strumento *FESEM Zeiss Merlin*. Si sono ottenute immagini con la microscopia elettronica con ingrandimenti 1kX, 5kX e 10kX, con scale da 20 μm a 1 μm , L'analisi EDX è stata effettuata per verificare la presenza di contaminanti sui campioni di silice andati incontro a degradazione. Non è stato necessario fare alcuna metallizzazione sui campioni.

3.3.2. Analisi di fisisorbimento di azoto

Il fisisorbimento è il fenomeno per cui, nel momento in cui un gas (adsorbato) viene a contatto con la superficie di un solido (adsorbente), si sviluppano delle interazioni intermolecolari tra le due specie, senza che avvengano modifiche superficiali. Queste forze dipendono, per natura ed intensità, dalle proprietà geometriche ed elettroniche della coppia adsorbente-adsorbato. L'obiettivo di un'analisi di fisisorbimento di azoto è la determinazione dell'area superficiale specifica, la distribuzione della dimensione dei pori e il volume⁹¹.

Nel caso di materiali porosi, è necessario distinguere tra superficie esterna e superficie interna: la prima è la superficie fuori dai pori; la seconda è la superficie relativa alle pareti dei pori. Poiché l'accessibilità dei pori dipende dalla dimensione della molecola sonda usata come adsorbato, i valori assoluti ottenuti dalla misura possono essere oggetto di variazioni⁹¹.

L'output della misura è un'isoterma di adsorbimento, in cui si va a valutare la quantità di adsorbato dalla superficie in funzione della pressione relativa p/p° . È necessario riportare la pressione p alla pressione di vapore saturo p° perché il test è stato effettuato ad una temperatura inferiore alla temperatura critica di adsorbimento. Dopo aver effettuato la misura in adsorbimento, si procede ad abbassare la pressione e valutare il comportamento della superficie in desorbimento. Le isoterme possono essere classificate in base alla forma in sei differenti macro-famiglie⁹¹, riportate in *Figura 5*.

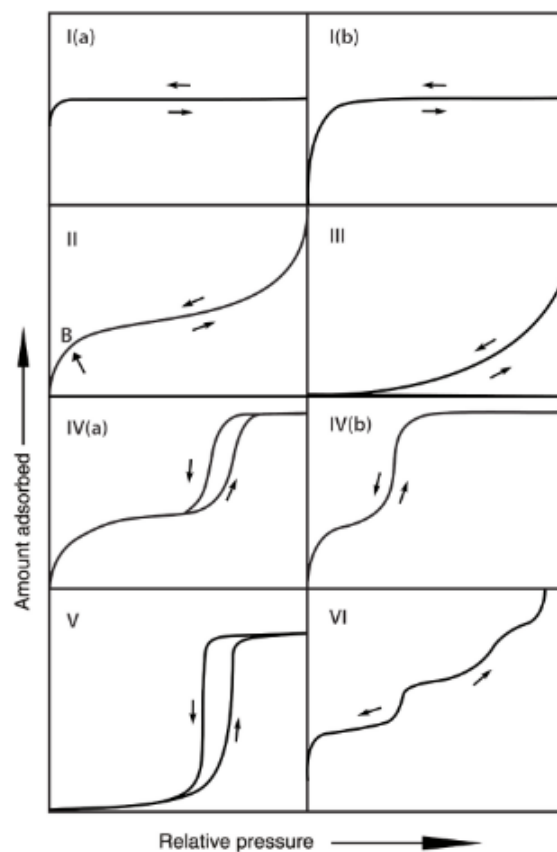


Figura 5. Classificazione delle isoterme di adsorbimento⁹¹

I materiali mesoporosi presentano un'isoterma di tipo IV, che può essere caratterizzata da un coppia di isteresi (IVa, Figura 5). La IUPAC ha identificato sei differenti forme di coppia di isteresi⁹¹, riportate in Figura 6. Il coppia H1 è quello atteso nelle silici MCM-41, MCM-48 e SBA-15.

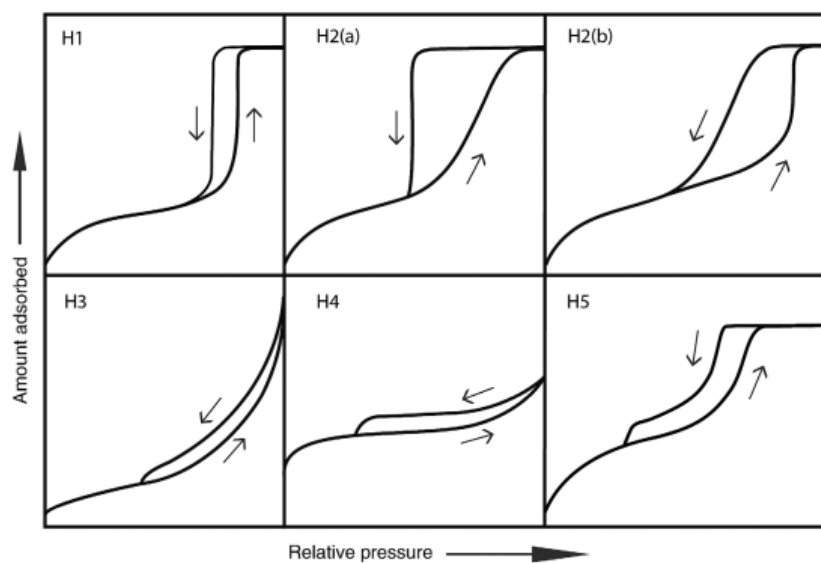


Figura 6. Classificazione dei cappi di isteresi⁹¹.

Per la raccolta dei dati sperimentali è stato utilizzato *ASAP 2020 Plus* della Micromeritics. Sono stati utilizzati circa 100 mg di silice per ciascun campione. L'analisi prevede uno step di degasaggio preliminare, durante il quale il campione è posto in vuoto a 150°C per due ore, al fine di eliminare eventuali inquinanti o specie adsorbite sulla superficie (tipicamente acqua); segue la misura vera e propria, durante la quale sul campione raffreddato a 77K vengono inviati degli impulsi di azoto che aumentano gradualmente la pressione sulla superficie. Al termine dell'adsorbimento, il campione viene lentamente riportato in vuoto, così da poter ottenere anche la misura in desorbimento. Ottenuta l'isoterma, si è calcolata l'area superficiale specifica delle particelle (SSA_{BET}) nell'intervallo di pressione 0,1-0,25 con il modello Brauner-Emmet-Teller BET. La distribuzione della dimensione delle porosità è stata valutata con il metodo della density functional theory DFT⁹². Il volume dei pori V_p si ricava dalla quantità di gas adsorbita ad una pressione relativa vicina all'unità, assumendo che a questa pressione i pori siano riempiti con l'adsorbato allo stato liquido⁹¹.

3.3.3. Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier FT-IR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è una tecnica non distruttiva utilizzata per identificare la chimica di una superficie e le specie adsorbite su di essa. La tecnica sfrutta la capacità delle molecole di assorbire fotoni con una lunghezza d'onda analoga a quella di vibrazione dei legami superficiali, tipicamente nel range dell'infrarosso. Si va pertanto a valutare l'assorbanza (o la trasmittanza) in funzione della lunghezza d'onda del fotone incidente: si osservano dei picchi caratteristici in funzione di gruppi funzionali specifici; è tuttavia necessario considerare che la presenza di molecole adsorbite o distorsioni della struttura possono far variare la posizione dei suddetti picchi⁹³.

Si è utilizzata la *INVENIO S FT-IR Spectrometer* della Bruker, con una risoluzione spettrale minore di $0,085\text{cm}^{-1}$. I campioni di silice mesoporosa sono stati analizzati dopo essere stati pressati e trasformati in pastiglie; queste vengono poi inserite in una bustina in oro e il tutto in una cella in quarzo con una finestra in KBr, trasparente all'infrarosso. La silice, prima di essere caratterizzata, viene sottoposta a degasaggio di circa un'ora a 10^{-3} mbar, così da eliminare le specie fisisorbite e avere un'informazione più chiara sulla chimica della superficie.

3.3.4. Analisi termo-gravimetrica TGA

L'analisi termogravimetrica consente di misurare simultaneamente la temperatura e la massa del campione in un'atmosfera controllata; in questo modo, è possibile individuare a quali temperature il campione degrada o rilascia specie adsorbite sulla superficie. Il risultato di questa analisi è quindi un grafico che valuta la variazione di massa in funzione della temperatura; la variazione può essere valutata o come valore assoluto o come percentuale relativa rispetto alla massa iniziale⁹⁴.

L'analisi è stata effettuata con lo strumento *Linseis STA PT 1600 (TGA-DSC)*, in atmosfera protettiva di argon, su campioni di silice con peso tra i 4 e i 6 mg; si è valutata la perdita di massa applicando un riscaldamento di $10^\circ\text{C}/\text{min}$ fino a raggiungere i 500°C .

Dal grafico ottenuto si è ricavata la quantità di acqua adsorbita, sia per i campioni tal quali che per quelli sottoposti ad adsorbimento di acqua. Inoltre, utilizzando i dati della BET di SSA_{BET} si è ottenuta un'indicazione sulla densità di silanoli presente sulla superficie (OH/nm^2), utilizzando il metodo proposto da *Mohamed et al*⁶. e riportato di seguito in *Equazione 1*:

Equazione 1. Calcolo della densità dei silanoli per nm^2

$$\text{OH}/\text{nm}^2 = \frac{\frac{\Delta m_{T_1-T_2}}{PM_{H_2O}} \times N_A \times 2}{SSA_{BET} \times m_{T_2}}$$

$\Delta m_{T_2-T_1}$ è la differenza tra la massa del campione a 200°C (T1) e quella a 500°C (T2);

m_{T_2} è la massa del campione a 200°C;

N_A è il numero di Avogadro, pari a $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$;

PM_{H_2O} è il peso molecolare dell'acqua, pari a $18,015 \text{ g mol}^{-1}$;

SSA_{BET} è l'area superficiale specifica valutata a seguito dell'analisi BET.

3.3.5. Spettroscopia fotoelettronica a raggi X XPS

La spettroscopia fotoelettronica a raggi X è una tecnica di analisi superficiale che consente di ottenere informazioni qualitative e quantitative sulla composizione di una superficie. Il campione viene irraggiato con un fascio di raggi X, che possiede un'energia tale da causare l'emissione di fotoelettroni da parte del campione; si valuta l'energia dei fotoelettroni emessi e da questa si ricava la binding energy (BE). La binding energy dipende dall'elemento da cui l'elettrone è stato emesso, dall'orbitale e dall'intorno chimico dell'atomo emittente; ne segue che ad ogni elettrone di un dato elemento corrisponde una BE specifica⁹⁵.

Per l'analisi sperimentale, è stato utilizzato il *VersaProbe 5000* della Physical Electronic Instruments, con sorgente una radiazione monocromatica Al 24,89 W 100 μm . È stata inizialmente eseguita un'analisi survey nel range di 0–1200 eV. Successivamente, la misura è stata ripetuta su un intervallo ristretto di BE per condurre un'analisi ad alta risoluzione (HR) per valutare la presenza di contaminanti.

3.4. Valutazione delle proprietà emostatiche

Per valutare le proprietà emostatiche dei campioni di silice sintetizzati, sono stati condotti alcuni test specifici. Il tempo di formazione del coagulo in plasma bovino è stato utilizzato come indicatore dell'efficacia emostatica, mentre il potenziale ζ è stato determinato mediante scattering di luce elettroforetica per valutare la carica superficiale delle particelle. È stato inoltre valutato l'adsorbimento di acqua mediante un'analisi termogravimetrica su campioni esposti a condizioni controllate di umidità. Queste analisi, accoppiate con quelle descritte nella sezione 3.3, consentono di correlare le proprietà chimico-fisiche delle silici con le loro prestazioni biologiche e funzionali.

3.4.1. Test emostatici

Per determinare l'efficacia emostatica dei campioni di silice sintetizzati si è valutato il tempo di formazione del coagulo (TFC) in plasma. Questo test è stato svolto non con l'obiettivo di quantificare il tempo di coagulazione in un contesto applicativo reale, bensì di identificare i campioni di silice con una maggiore efficacia nell'indurre l'emostasi. La procedura sperimentale adottata si basa sul metodo descritto da *Mohamed et al.*⁸¹: 2,5 mg di materiale vengono inseriti in una eppendorf e mantenuti a 37°C in stufa per 5 minuti; si aggiungono 250 μL di plasma e, dopo aver agitato per accertarsi della completa solubilizzazione delle silici, si pone nuovamente il sistema in stufa a 37°C per 3 minuti. Trascorso questo tempo, si introducono 25 μL di CaCl_2 0,2M che fungeranno da fattore di coagulazione, innescando così la reazione. La provetta viene capovolta ogni 30 secondi finché si forma il coagulo (il plasma non scorre più). Il tempo

registrato viene considerato come TFC. Per ogni campione il test viene ripetuto tre volte. Contemporaneamente, si effettua lo stesso test su plasma bovino senza le silici, così da avere un test di riferimento (controllo) da cui poter verificare l'effettiva riduzione nel TFC causata dalle silici.

3.4.2. Analisi del potenziale ζ

Il potenziale ζ è il potenziale elettrico in corrispondenza dell'interfaccia slipping plane-solvente di una particella in una sospensione. Per valutarlo si utilizza la tecnica dello scattering di luce elettroforetica, che consente di valutare il potenziale sulla base dello scattering di un laser che incide sulla particella. Benché il potenziale ζ non corrisponda esattamente al potenziale della particella, è un indice della carica superficiale da essa posseduta⁹⁶.

Lo strumento utilizzato per l'analisi del potenziale ζ è il *Particle Analyzer Litesizer 500* della Anton Paar. Si sono riempite le cuvettes con una soluzione contenente 0,5 mg di silice e 1 mL 10mM di KCl. Dopo un tempo di 4 minuti di equilibration time, si è avviato il test; una volta raggiunto il criterio di convergenza, l'analisi restituisce il valore di potenziale ζ .

3.4.3. Adsorbimento di acqua

Per valutare l'adsorbimento di acqua si è utilizzato il setup sperimentale riportato in *Figura 7*. Su di una piastra sono state poste due capsule di Petri, contenenti rispettivamente circa 20 g di acqua e circa 50 mg di silice. Dopo aver chiuso il sistema, questo è stato posto in stufa a 37°C per 24 ore. Al termine di questo tempo, il campione post-adsorbimento (da ora denominato PostA) viene raccolto e sottoposto ad una TGA in Argon fino a 500°C. La TGA viene effettuata per valutare la quantità di acqua adsorbita dal campione.



Figura 7. Setup per l'adsorbimento di acqua

3.5. *Test di degradazione*

I test di degradazione sono stati effettuati con l'obiettivo di acquisire informazioni, seppur parziali, su come le sfere di silice si comporterebbero nel tempo, una volta applicate sulla ferita. Nello specifico, è stato effettuato un test di degradazione in plasma.

Il test di degradazione in plasma consente di verificare il comportamento delle silici nel tempo, una volta entrate in contatto con il plasma. Viene realizzata una soluzione con 100 mg di silici e 10 mL plasma di plasma diluito in acqua (1:10) . La soluzione viene lasciata a 37°C per 24 ore, al termine delle quali il campione viene raccolto tramite centrifugazione ed essiccato a 50°C circa. Le polveri così ottenute sono state sottoposte ad un'analisi FTIR per valutare eventuali modifiche superficiali. È stata inoltre effettuata un'analisi FESEM e EDX per valutare variazioni nella morfologia delle polveri e la presenza di eventuali residui di plasma. Il campione che ha subito degradazione in plasma verrà contraddistinto tramite la denominazione PostDegP.

4. Risultati

Le sfere di silice mesoporosa sono caratterizzate al fine di determinarne morfologia, struttura porosa, composizione chimica superficiale, attività emostatica e modalità di degradazione. I risultati delle analisi e dei test descritti nelle sezioni seguenti sono stati raccolti e confrontati per i diversi campioni, al fine di identificare possibili relazioni tra le proprietà dei materiali e l'attività emostatica.

4.1. Caratterizzazione di MSM-100-350 e di MSM-100-500

I campioni MSM-100-350 e MSM-100-500 sono stati analizzati al FESEM. Le micrografie riportate in *Figura 8* e in *Figura 9* rivelano che le particelle, indipendentemente dalla temperatura di calcinazione, hanno una morfologia principalmente sferica. Nel caso di calcinazione a 500°C, si può osservare come le particelle abbiano iniziato a coalescere e a formare degli aggregati. Con il software Fityk si è valutato il diametro medio delle sfere, su una popolazione di 100 particelle: *Figura 10* e *Tabella 1* mostrano che il loro diametro è compreso tra i 2 e i 5 μm , con distribuzione monomodale, similmente a quanto individuato da *Mohamed et al.*⁹⁷; benché la differenza sia poco marcata, le particelle che hanno subito la calcinazione a 350°C sono mediamente più grandi. Questo può trovare una spiegazione nel fatto la maggiore temperatura di calcinazione favorisce la condensazione dei silanoli e il cross-linking; ne consegue una riduzione nelle dimensioni delle particelle e una stabilizzazione della mesostruttura, coerentemente ai risultati di *Basso et al.*⁹⁸.

Tabella 1. Dimensione delle particelle di MSM-100-350 e MSM-100-500.

<i>Campione</i>	<i>Diametro [μm]</i>
MSM-100-350	3,54 \pm 0,70
MSM-100-500	3,19 \pm 0,53

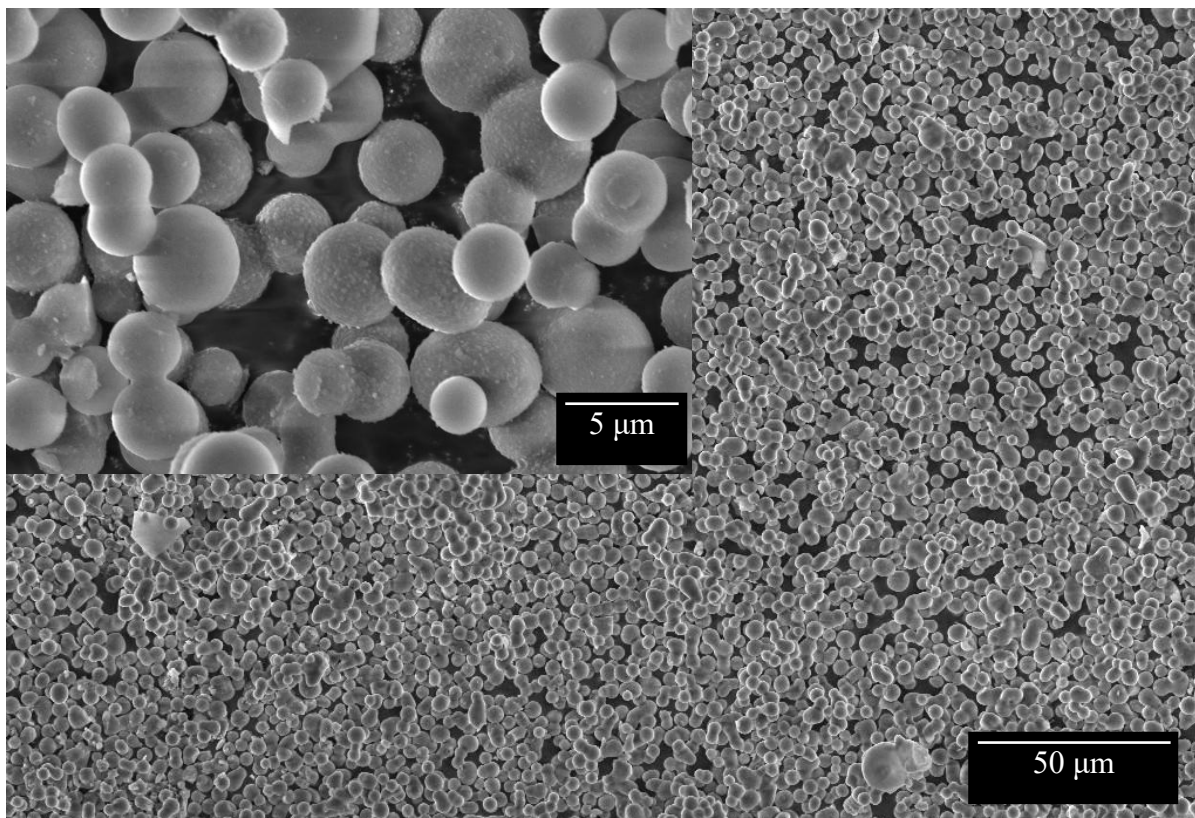


Figura 8. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-100-350

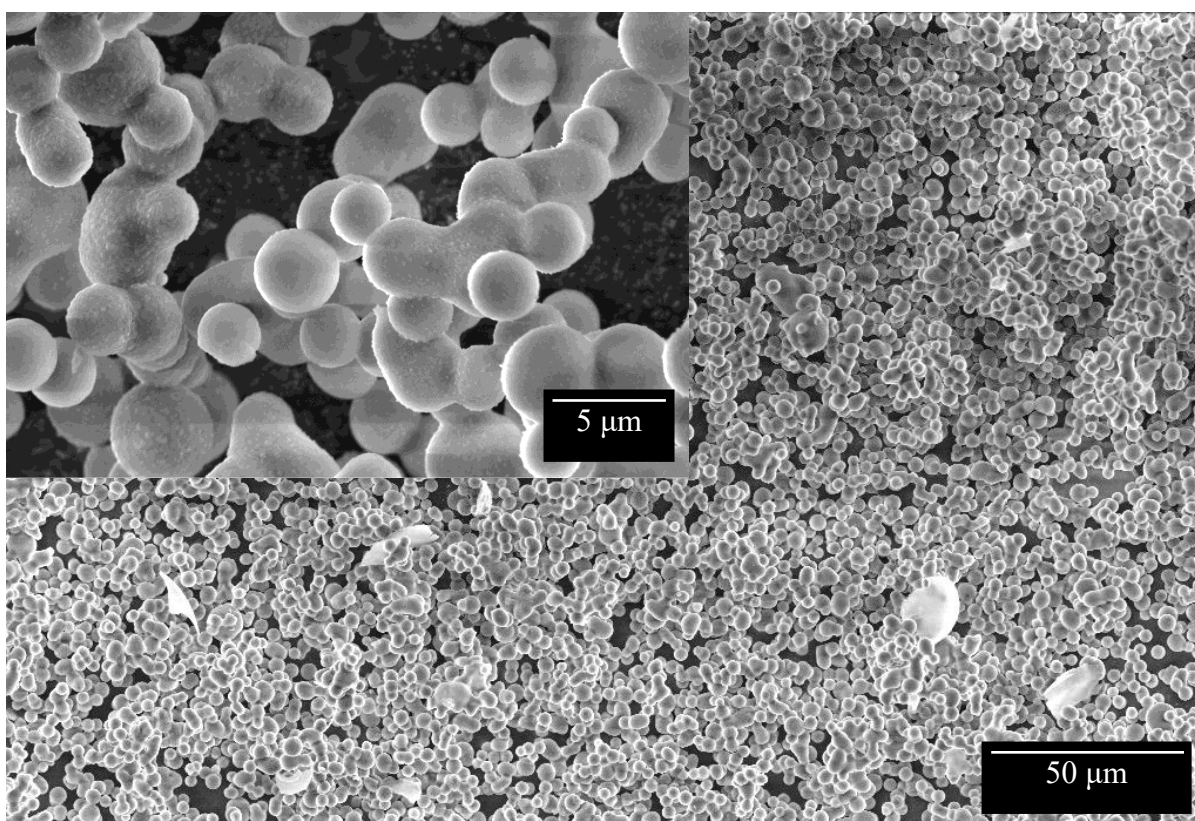


Figura 9. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-100-500

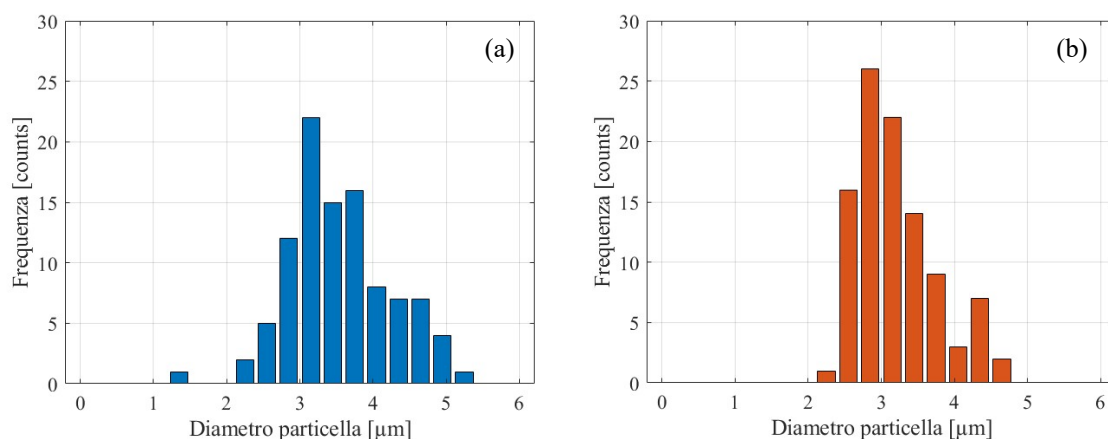


Figura 10. Distribuzione dei diametri di MSM-100-350 (a) e di MSM-100-500 (b).

Si valutano ora le isoterme di adsorbimento e desorbimento in *Figura 11*, ottenute dall'analisi di fisisorbimento di azoto. Le curve sono isoterme di tipo IV(a), secondo la classificazione IUPAC: si tratta di una conferma della presenza di mesoporosità. Il gradino nella curva di desorbimento ad un p/p^0 compreso tra 0,4 e 0,5 consente di inserire il coppia di isteresi nella sotto-classificazione H5: sono presenti contemporaneamente pori aperti e parzialmente occlusi, tipici di alcune silici esagonali⁹¹; questa particolare configurazione si osserva nel momento in cui, all'interno dei mesopori più grandi si vanno ad inserire delle nanostrutture anch'esse porose, e in questo caso silicee, formatesi a causa di un eccesso del TEOS usato nella sintesi⁹⁹. Questa morfologia potrebbe essere confermata a seguito di un'analisi al microscopio ottico a trasmissione (TEM).

Utilizzando il modello BET è stato ricavato il valore di SSA_{BET} e di V_p , riportato in *Tabella 2*: si osserva che sia l'area superficiale che il volume poroso sono minori se la temperatura di calcinazione è più alta. Con il metodo DFT⁹² si è valutata la distribuzione della dimensione dei pori: come si può osservare in *Figura 12*, MSM-100-350 ha una distribuzione monomodale con picco attorno ai 27 nm; MSM-100-500 presentano una distribuzione monomodale più ampia rispetto all'altro campione e spostata a diametri di poco inferiori, con picco a circa 25 nm. Questa riduzione di area superficiale, volume poroso e dimensione dei pori è coerente ai dati trovati in letteratura: all'aumentare della temperatura di calcinazione è infatti possibile che si attivino dei meccanismi di cross-linking che portano ad una riduzione, in numero e dimensione, delle porosità¹⁰⁰.

Tabella 2. Area superficiale e volume poroso di MSM-100-350 e MSM-100-500.

<i>Campione</i>	$SSA_{BET} [m^2/g]$	$V_p [cm^3/g]$
MSM-100-350	745,48	1,93
MSM-100-500	591,43	1,61

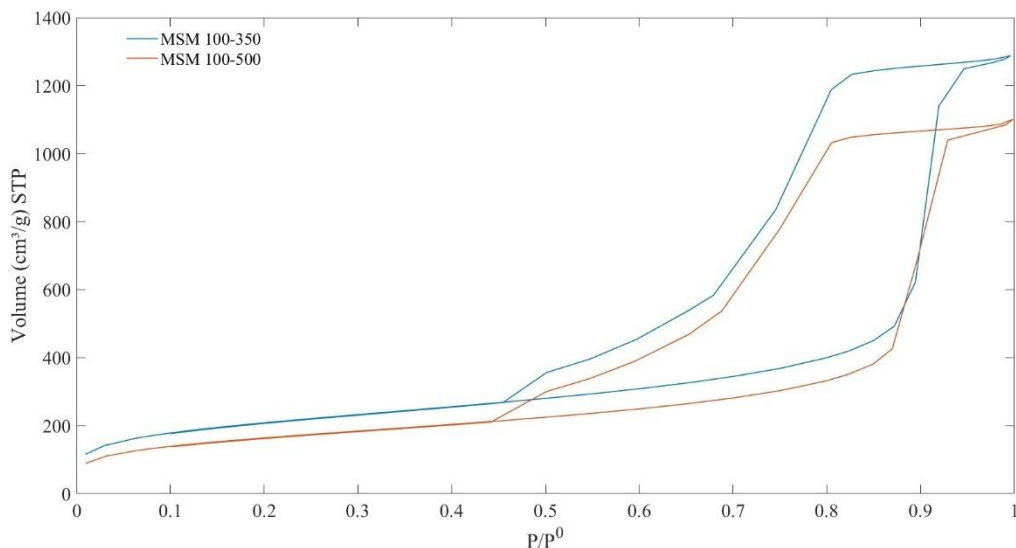


Figura 11. Isotherme di adsorbimento e desorbimento di MSM-100-350 e MSM-100-500.

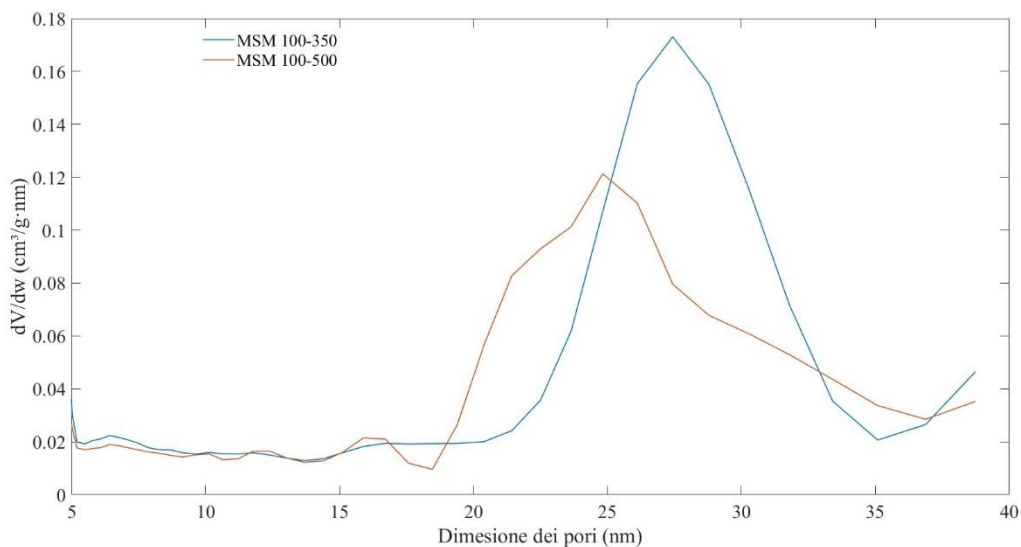


Figura 12. Distribuzione del diametro dei pori di MSM-100-350 e MSM-100-500, calcolata con DFT.

In *Figura 13* è riportato lo spettro FTIR di MSM-100-350 e MSM-100-500. In entrambi i casi si osserva un picco a circa 3740 cm^{-1} , caratteristico di gruppi OH isolati¹⁰¹. La banda larga attorno a 3500 cm^{-1} corrisponde invece ai silanoli interagenti, che cioè formano legami ad idrogeno l'uno con l'altro¹⁰¹. All'aumentare della temperatura di calcinazione i silanoli interagenti condensano, liberando acqua e portando ad un aumento relativo nella popolazione di silanoli isolati.

A lunghezze d'onda comprese tra 3000 e 2850 cm^{-1} si osserva un altro segnale: nel caso di calcinazione a 350°C si osservano cinque picchi (2983 , 2961 , 2921 , 2890 e 2848 cm^{-1}) mentre a seguito di calcinazione a 500°C il numero di picchi si riduce a tre (2958 , 2921 e 2849 cm^{-1}). Questi picchi possono essere associati a stretching di gruppi C-H alifatici¹⁰¹, la cui presenza è presumibilmente dovuta a residui del templante utilizzato in fase di sintesi. È possibile che l'aumento della temperatura abbia portato ad una ossidazione più spinta delle specie carboniose,

che dunque sono state rimosse con più efficacia. Per avere un campione completamente privo di residui carboniosi si potrebbe proporre una calcinazione a temperature di almeno 550°C.

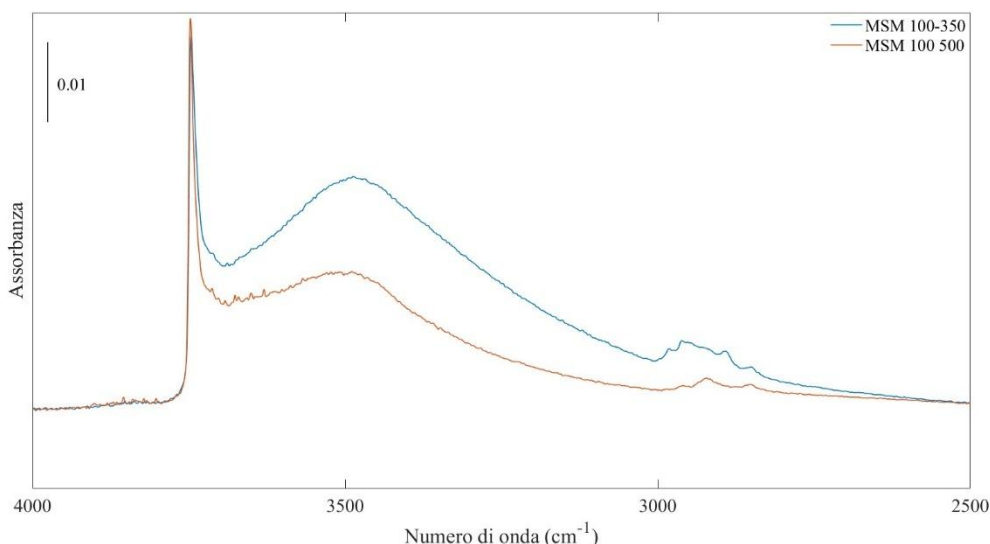


Figura 13. Spettroscopia FTIR di MSM-100-350 e MSM-100-500.

I risultati dell'analisi TGA effettuata su MSM-100-350 e MSM-100-500 sono presentati in Figura 14. Da temperatura ambiente fino a 150°C circa è possibile osservare l'evaporazione dell'acqua fisisorbita: nel caso di calcinazione a 350°C la perdita di acqua è di circa il 20%; se la calcinazione è avvenuta a 500°C il campione ne perde circa il 13%. Nell'intervallo di temperatura 200°C-500°C si osserva una ulteriore perdita di acqua, dovuta alla condensazione dei silanoli interagenti. Utilizzando l'Equazione 1 si è valutata la concentrazione di silanoli superficiali. Il dato è stato poi riportato in Tabella 3. La maggiore quantità di acqua fisisorbita è da imputare alla maggiore concentrazione superficiale di silanoli.

Tabella 3. Concentrazione superficiale di silanoli di MSM-100-350 e MSM-100-500.

<i>Campione</i>	<i>Silanoli [OH/nm²]</i>
MSM-100-350	12,2
MSM-100-500	4,2

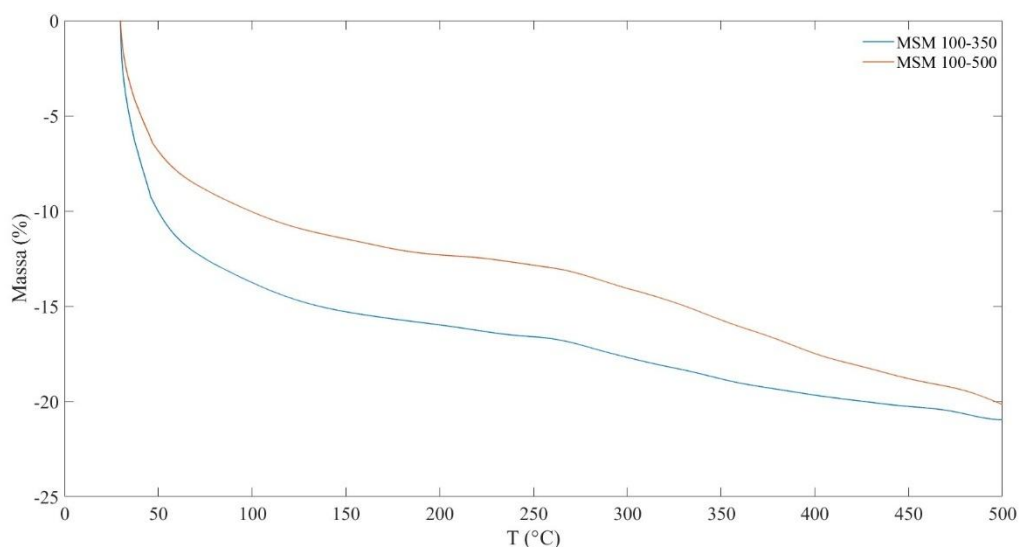


Figura 14. Curve termogravimetriche di MSM-100-350 e MSM-100-500.

4.2. Caratterizzazione di MSM-130-350 e di MSM-130-500

Le particelle di MSM-130-350 e MSM-130-500 sono state caratterizzate al FESEM. La Figura 15 e la Figura 16 mostrano come queste abbiano una morfologia prettamente sferica. A seguito di un'analisi effettuata con il software Fityk su una popolazione di 100 sfere per entrambi i campioni si sono ottenuti i dati presentati in Figura 17 e in Tabella 4: la dimensione delle particelle varia tra i 2 e i 6 μm , con distribuzione monomodale. Sebbene l'effetto sia poco marcato, anche in questo caso le sfere calcinate a 500 °C presentano un diametro mediamente inferiore rispetto alle sfere calcinate a 350°C. In particolare, il picco si sposta da 4 a 3 μm e compaiono delle particelle con dimensione inferiore a 2 μm .

Tabella 4. Dimensione delle particelle di MSM-130-350 e MSM-130-500.

<i>Campione</i>	<i>Diametro [μm]</i>
MSM-130-350	3,78 \pm 0,69
MSM-130-500	3,56 \pm 0,70

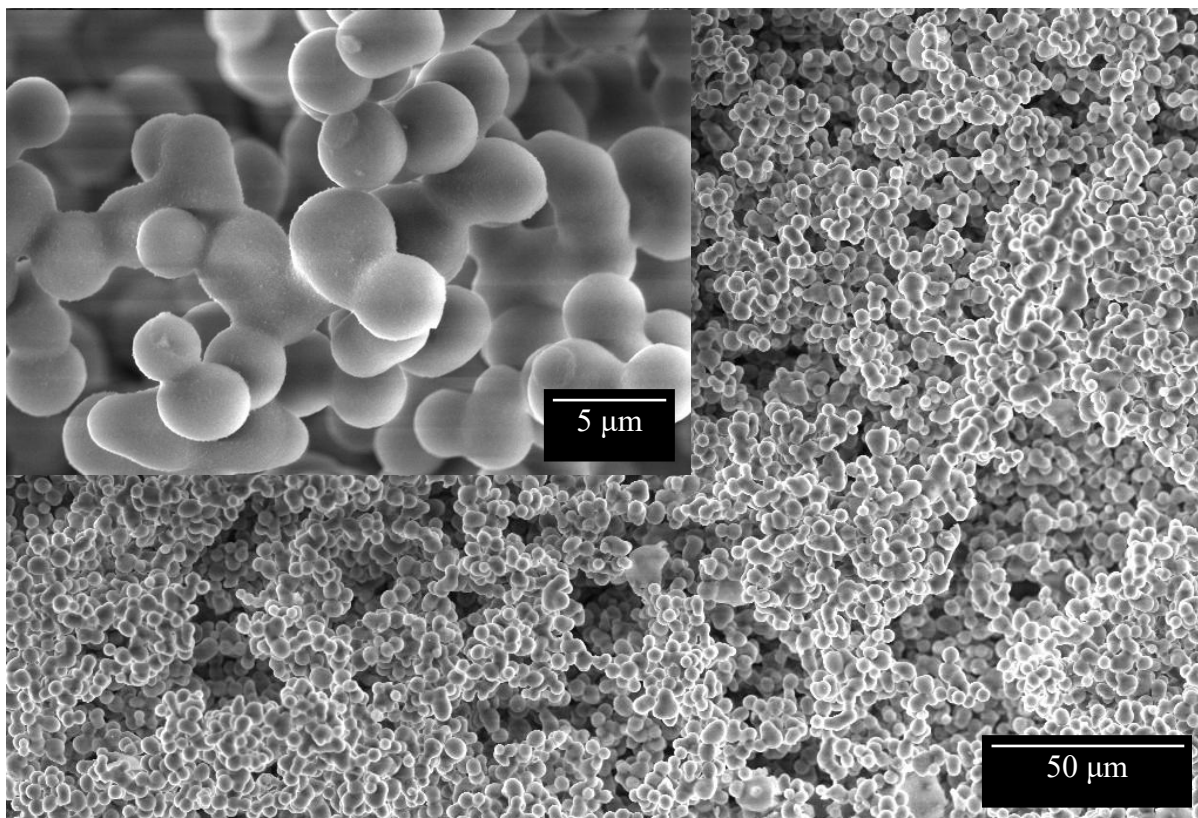


Figura 15. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-130-350

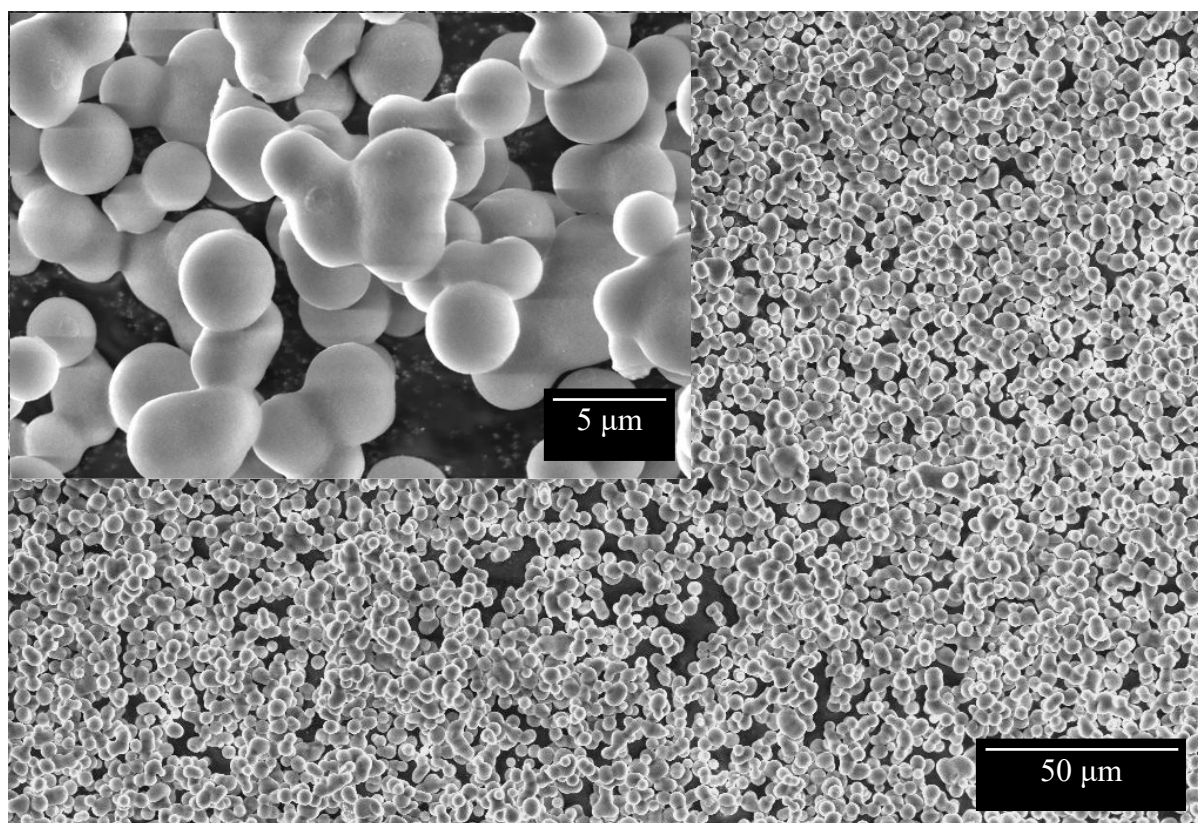


Figura 16. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-130-500.

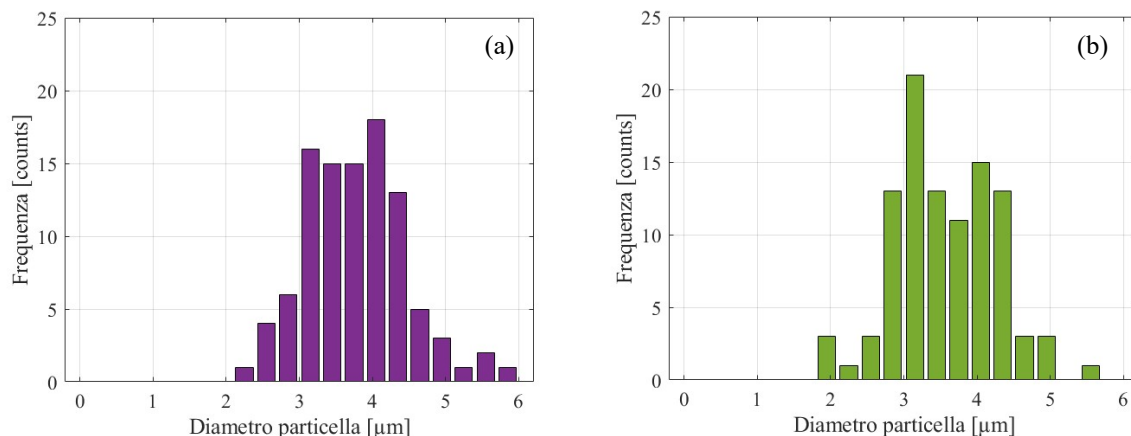


Figura 17. Distribuzione dei diametri di MSM-130-350 (a) e di MSM-130-500 (b).

Le isoterme di adsorbimento e desorbimento di MSM-130-350 e MSM-130-500 presentate in *Figura 18* sono di tipo IV(a), secondo la classificazione IUPAC. Poiché nel coppia di isteresi i due rami sono paralleli e non si osservano gradini nel ramo di desorbimento, il coppia è classificabile come H1. Ciò significa che il network poroso è uniforme, con una distribuzione di diametri stretta⁹¹. In generale, il maggior ordine nella mesostruttura garantisce una migliore riproducibilità del sistema.

Applicando il modello BET, si sono ottenuti i valori di SSA_{BET} e di V_p , riportati in *Tabella 5*. Si conferma l'osservazione per cui ad una temperatura di calcinazione più elevata sono associati SSA_{BET} e V_p inferiori.

Per valutare la dimensione dei pori si è utilizzato il metodo DFT⁹², il cui risultato è presentato in *Figura 19*: il campione calcinato a 350°C ha una distribuzione dei diametri dei pori monomodale, con il massimo a circa 29 nm, mentre il campione calcinato a 500°C ha un massimo a circa 27 nm.

Tabella 5. Area superficiale e volume poroso di MSM-130-350 e MSM-130-500.

Campione	SSA_{BET} [m^2/g]	V_p [cm^3/g]
MSM-130-350	689,35	2,19
MSM-130-500	593,90	1,96

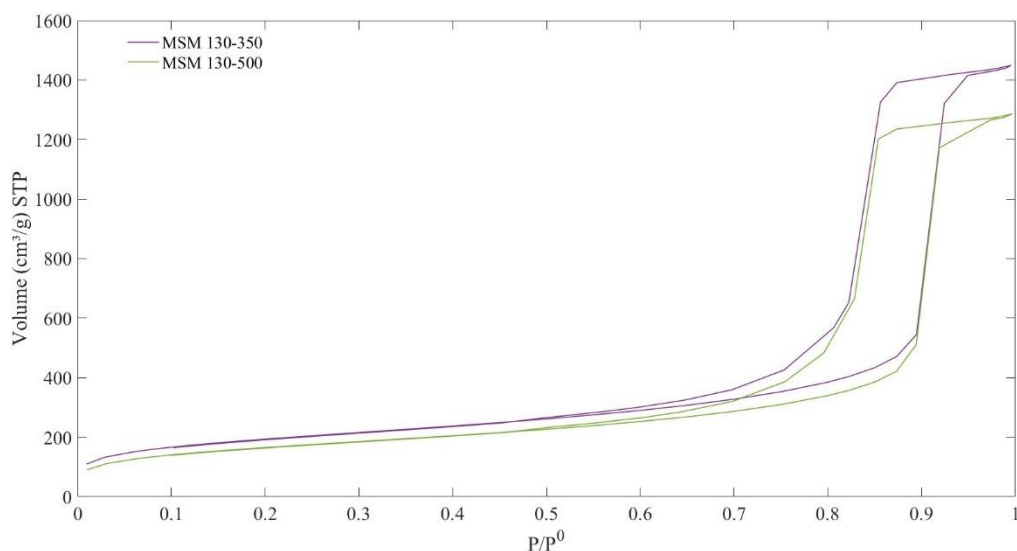


Figura 18. Isotherme di adsorbimento e desorbimento di MSM-130-350 e MSM-130-500.

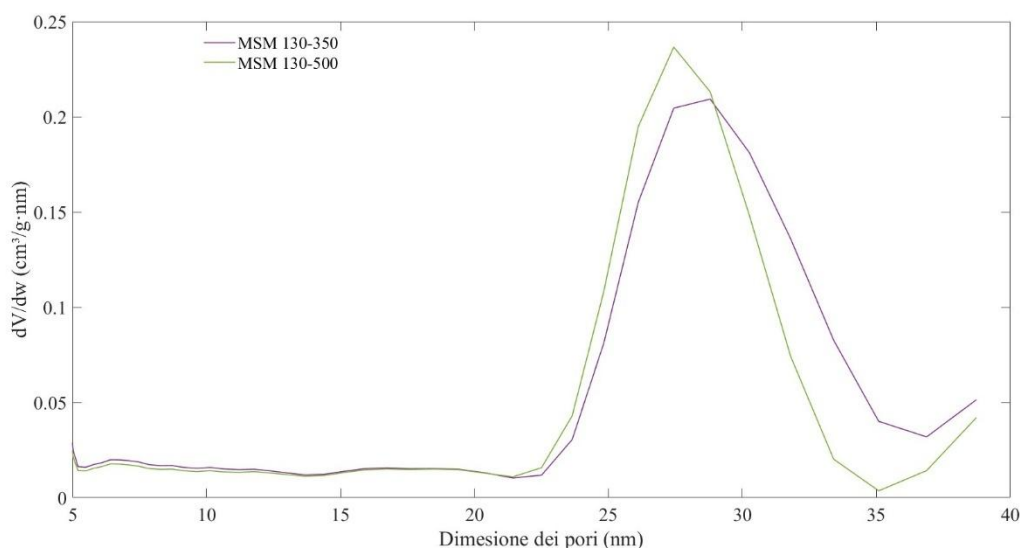


Figura 19. Distribuzione del diametro dei pori di MSM-130-350 e MSM-130-500, calcolata con DFT.

Lo spettro FTIR di MSM-130-350 e MSM-130-500 è riportato in Figura 20. È evidente il picco a 3740 cm^{-1} , così come la banda larga attorno a 3500 cm^{-1} , lunghezze d'onda caratteristiche rispettivamente dei silanoli isolati e di quelli interagenti¹⁰¹. Nel caso del campione calcinato a temperatura più alta il rapporto di intensità tra il picco dei silanoli isolati e quello dei silanoli interagenti è più elevato rispetto all'altro campione, perché parte dei silanoli interagenti sono condensati durante il riscaldamento fino a 500°C .

Analogamente a quanto osservato durante l'analisi riportata nella sezione 4.1, nella zona compresa tra $3000\text{ e }2850\text{ cm}^{-1}$ si osservano segnali riconducibili a residui del templante.

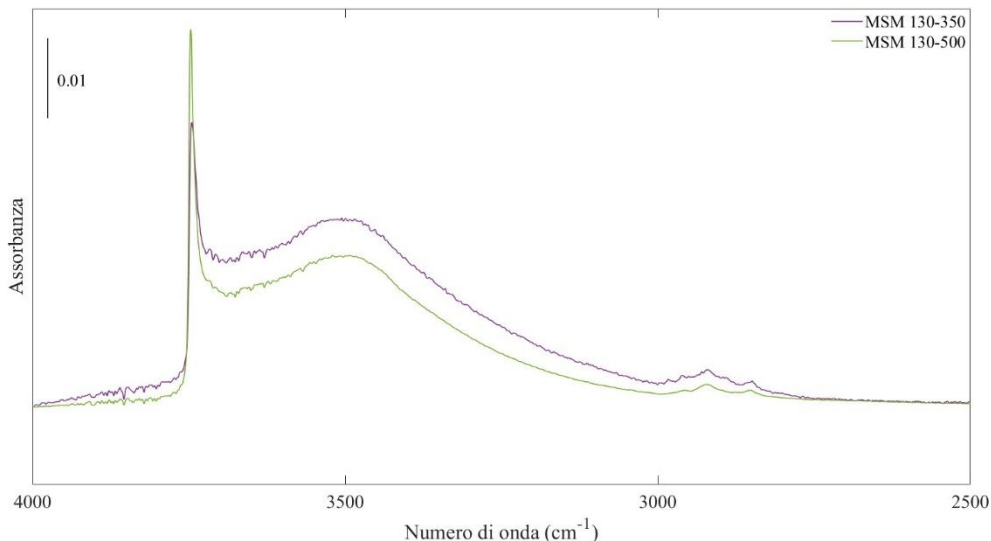


Figura 20. Spettroscopia FTIR di MSM-130-350 e MSM-130-500.

Le curve relative all'analisi TGA effettuata su MSM-130-350 e MSM-130-500 sono presentate in Figura 21. L'acqua fisisorbita viene rilasciata dalle silici durante il riscaldamento fino a 150°C: il campione calcinato a 350°C perde circa il 16% di acqua, quello calcinato a 500°C ne perde circa il 14%. La pendenza delle curve subisce una variazione nel tratto 200°C-500°C, il che corrisponde all'intervallo in cui i silanoli interagenti condensano. Utilizzando l'Equazione 1 si è valutata la densità di silanoli superficiali, riportata in Tabella 6.

Tabella 6. Concentrazione superficiale di silanoli di MSM-130-350 e MSM-130-500.

Campione	Silanoli [OH/nm²]
MSM-130-350	8,2
MSM-130-500	7,5

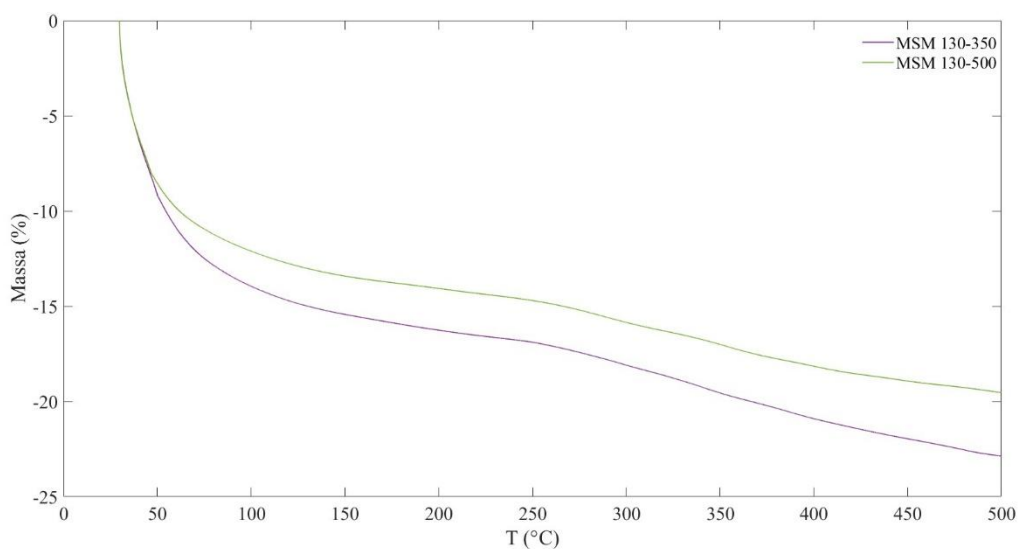


Figura 21. Curve termogravimetriche di MSM-130-350 e MSM-130-500.

4.3. Valutazione dell'attività emostatica

Dopo aver caratterizzato dal punto di vista morfologico e chimico fisico i campioni MSM-100-350, MSM-100-500, MSM-130-350 e MSM-130-500, si è proceduto alla valutazione della loro attività emostatica. Per farlo, si sono eseguiti di test specifici volti a valutare dopo quanto tempo le silici consentono la formazione del coagulo, cui si è affiancata un'analisi del potenziale ζ e di adsorbimento di acqua. Ciò è stato fatto nell'ottica di individuare una relazione tra questi dati e le proprietà chimico-fisiche discusse nelle sezioni 4.1 e 4.2.

4.3.1. Confronto tra i campioni

Analizzando i campioni ottenuti dalla prima e dalla seconda sintesi, si va ad effettuare un confronto, così da metterne in risalto le principali differenze e/o similitudini e poter, successivamente, comprendere quali proprietà influiscono maggiormente sull'attività emostatica.

Tutti i campioni presentano una morfologia prettamente sferica, con distribuzione dei diametri monomodale e compresa tra i 2 e i 6 μm . Rispetto ai campioni sintetizzati a 100°C, quelli che hanno subito trattamento idrotermale a 130°C presentano un maggior grado di coalescenza delle particelle: è possibile che la più alta temperatura di sintesi abbia favorito il cross-linking.

A seguito del fisisorbimento di azoto e dell'applicazione dei modelli BET e DFT, si sono ottenuti i dati raccolti in *Tabella 7*. Si osserva che l'aumento di temperatura nel trattamento idrotermale causa un aumento nella dimensione e nel volume complessivo dei pori. Questo accade perché il P123 a 130°C diventa maggiormente idrofobo e le micelle in fase di sintesi diventano più grandi¹⁰². Inoltre, è possibile che si abbia un certo grado di dissoluzione dello scheletro della silice e la formazione di interconnessioni tra le gocce del Pluronic e TMB, il che aumenta ulteriormente il volume del sistema poroso. Inoltre, a seguito di tale dissoluzione, è possibile che la dimensioni dell'ingresso ai pori aumenti e il pore-blocking si riduca⁷. Ciò trova conferma nelle isoterme di *Figura 11* e *Figura 18*: il cappio di isteresi dei campioni trattati a 130°C è più stretto e i suoi rami sono paralleli, aspetto che non si osserva negli altri campioni. Ne segue che i campioni trattati a temperatura più elevata presentano una struttura mesoporosa più omogenea.

I risultati ottenuti, inoltre, sono coerenti con quelli di *Mazinani et al.*¹⁰²: in particolare, confrontando i dati di SSA_{BET} in *Tabella 7* relativi ai campioni calcinati a 350°C, si osserva che all'aumentare della temperatura di trattamento idrotermale questi valori sono più bassi, mentre aumenta il volume dei pori, come già precedentemente discusso; la stessa relazione è invece meno evidente per i campioni calcinati a 500°C. Questo accade perché la più alta temperatura di sintesi favorisce fenomeni di cross-linking, che fanno aumentare la dimensione e il volume dei pori, a scapito delle porosità più piccole e, di conseguenza, dell'area superficiale.

Tabella 7. Confronto dei dati ottenuti dall'analisi di fisisorbimento di azoto

<i>Campione</i>	<i>Dimensione pori [nm]</i>	<i>V_p [cm³/g]</i>	<i>SSA_{BET} [m²/g]</i>
MSM-100-350	27,4	1,93	745,48
MSM-100-500	24,8	1,61	591,43
MSM-130-350	28,8	2,19	689,35
MSM-130-500	27,4	1,96	593,90

I dati delle analisi TGA, già riportate in *Figura 14* e in *Figura 21*, sono raccolti in *Tabella 8*. I campioni calcinati a 350°C perdono, a 200°C, più acqua rispetto a quelli calcinati a 500°C. Ciò accade perché i campioni portati a temperature più elevate in fase di calcinazione presentano una maggior quantità di silanoli superficiali. Mettendo questi dati in relazione con la concentrazione superficiale di silanoli (*Figura 22*), si osserva che, all'aumentare di quest'ultima, aumenta la quantità di acqua fisisorbita. A tal proposito, i campioni calcinati a temperature più elevate hanno una concentrazione superficiale di silanoli più bassa: questo perché in particolare i silanoli interagenti, a temperature superiori ai 350°C, tendono a condensare, formando ponti silossanici e rilasciando acqua.

Si osserva, inoltre, che all'aumentare della temperatura di trattamento idrotermale la riduzione dei silanoli superficiali a seguito di calcinazione è meno spiccata. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la sintesi a 130°C favorisce il cross-linking, portando alla formazione di una struttura meno flessibile, con una minore capacità di subire la deidrossilazione.

Tabella 8. Percentuale di acqua persa a seguito di TGA e concentrazione superficiale di silanoli.

<i>Campione</i>	<i>% acqua persa (200°C)</i>	<i>Silanoli [OH/nm²]</i>
MSM-100-350	21,3	12,2
MSM-100-500	13,4	4,2
MSM-130-350	16,2	8,2
MSM-130-500	14,1	7,5

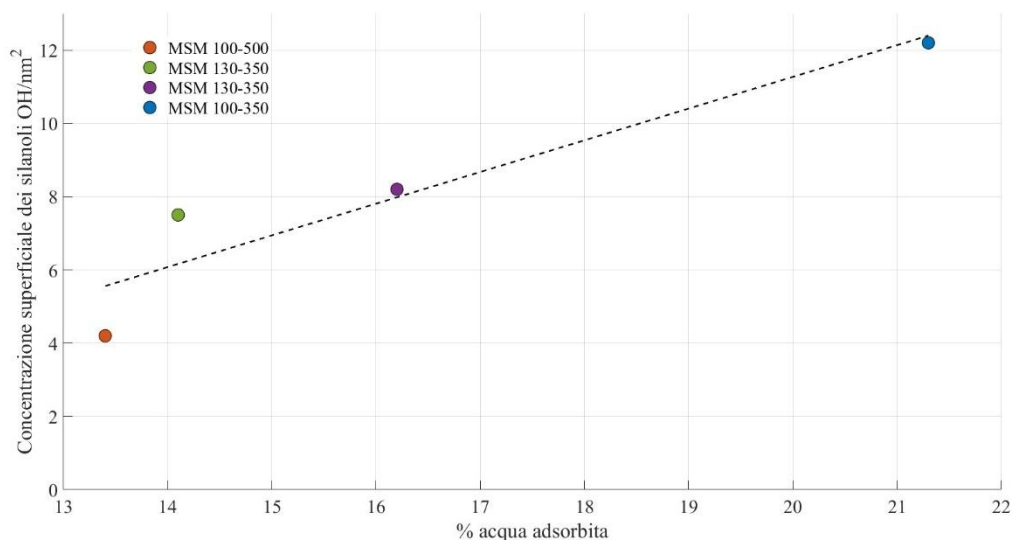


Figura 22. Relazione tra quantità d'acqua adsorbita e concentrazione superficiale di silanoli.

4.3.2. Risultato dei test di adsorbimento di acqua

Per verificare la relazione tra concentrazione superficiale di silanoli e capacità di adsorbire acqua – fondamentale per l'attività emostatica – si è effettuato il test di adsorbimento di acqua, secondo il setup sperimentale descritto nella sezione 3.4.3. Di questa analisi si riporta in *Figura 24*, in *Figura 25*, in *Figura 26* e in *Figura 27* il confronto tra le curve dell'analisi TGA del campione tal quale e dello stesso sottoposto ad adsorbimento di acqua. In *Tabella 9* è presentato il valore di acqua adsorbita (e quindi persa durante la TGA) dal campione sottoposto al trattamento. Si osserva, come atteso, che il campione che ha adsorbito il quantitativo di acqua maggiore è MSM-100-350, nonché il campione con la maggior quantità di silanoli superficiali. In generale, la relazione tra quantità di acqua adsorbita e concentrazione superficiale di silanoli (misurata prima della test) è di tipo lineare, come presentato in *Figura 23*.

Tabella 9. Percentuale di acqua persa durante una TGA, effettuata dopo un test di adsorbimento di acqua.

<i>Campione</i>	<i>% acqua persa (500°C)</i>
MSM-100-350-PostA	35,77
MSM-100-500-PostA	19,02
MSM-130-350-PostA	27,49
MSM-130-500-PostA	26,79

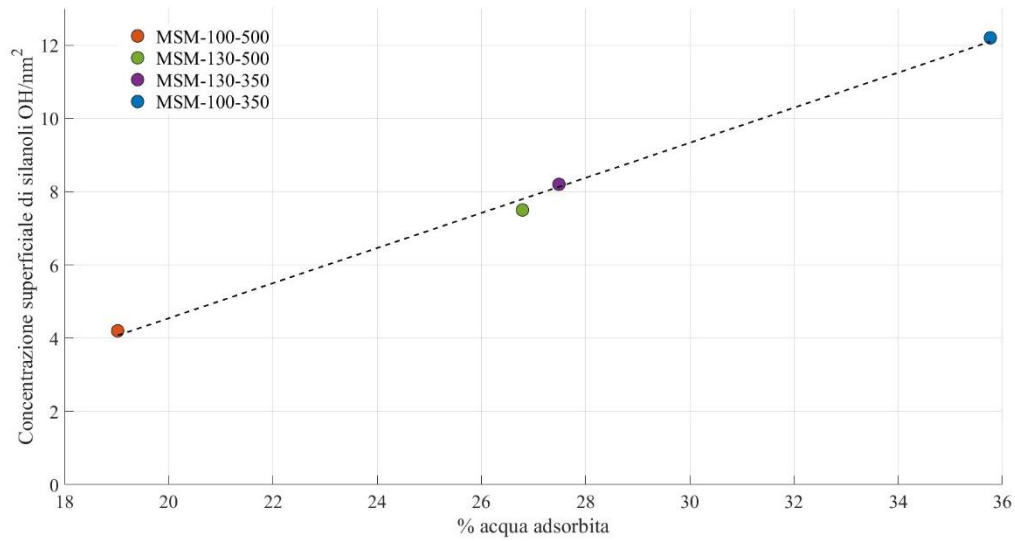


Figura 23. Relazione tra quantità d'acqua adsorbita postA e concentrazione superficiale di silanoli.

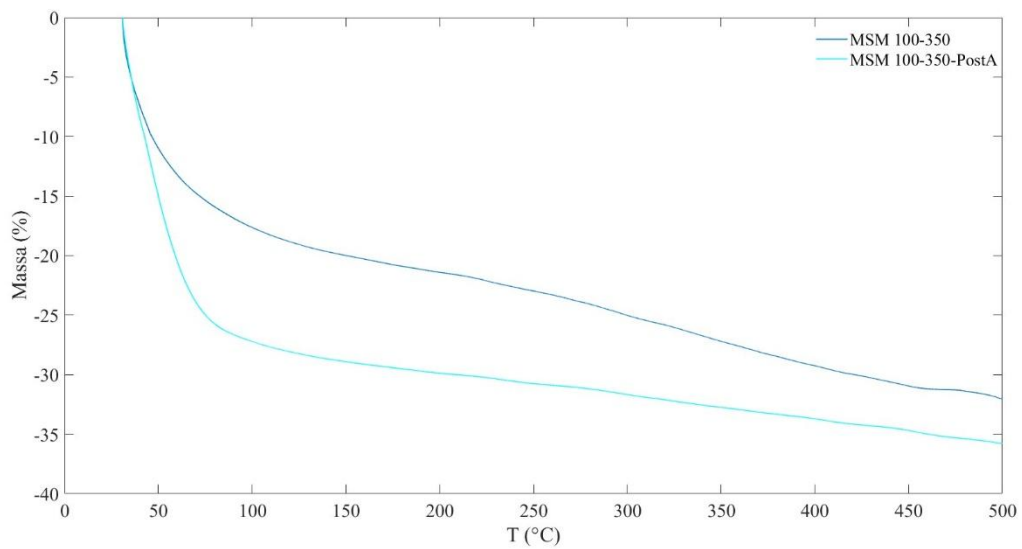


Figura 24. Curve termogravimetriche di MSM-100-350 e di MSM-100-350-PostA.

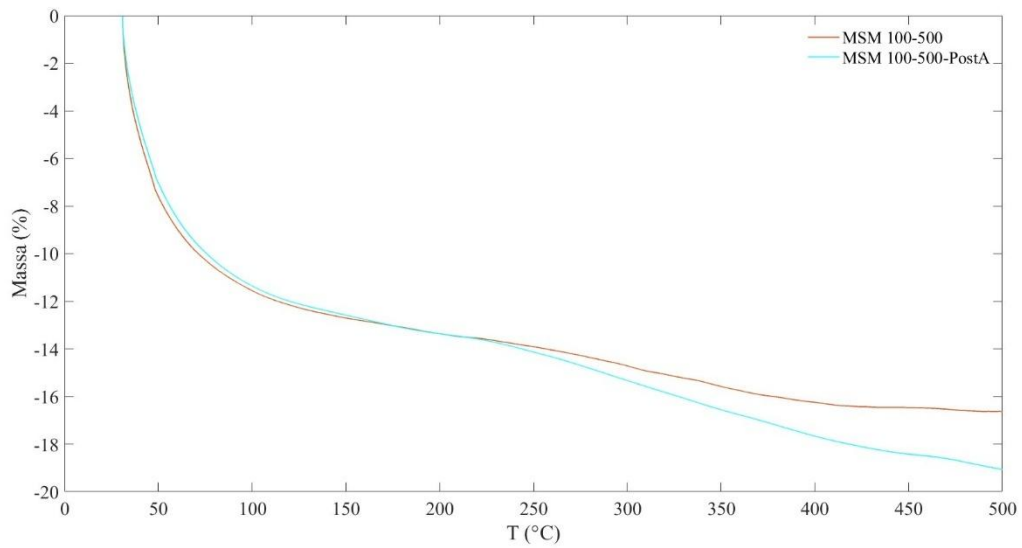


Figura 25. Curve termogravimetriche di MSM-100-500 e di MSM-100-500-PostA..

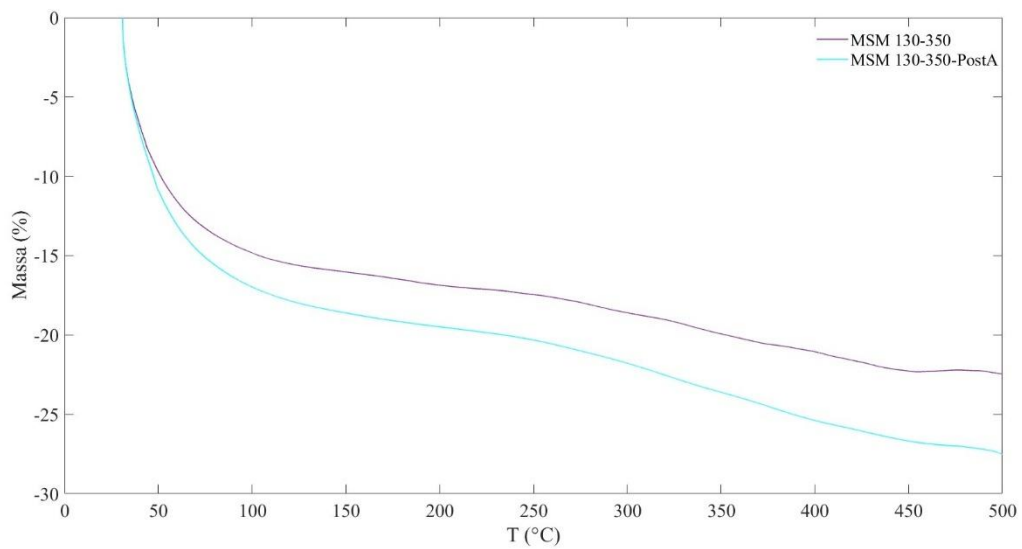


Figura 26. Curve termogravimetriche di MSM-130-350 e di MSM-130-350-PostA.

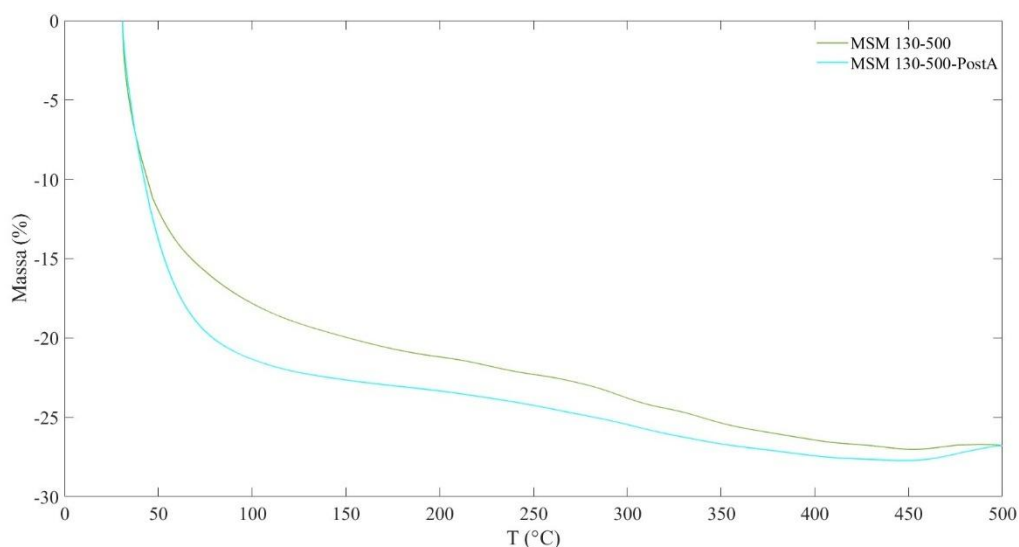


Figura 27. Curve termogravimetriche di MSM-130-500 e di MSM-130-500-PostA

È importante sottolineare che i dati della TGA fin qui presentati mostrano, fino a 500 °C, non solamente la perdita di acqua molecolare fisisorbita, ma anche la perdita dell'acqua chemisorbita, sotto forma di silanoli. Questo tipo di interazione prevede che l'acqua rompa i ponti silossani e causi la formazione di ulteriori silanoli superficiali interagenti. Per confermare questo aspetto si è effettuata un'analisi FTIR sul campione MSM-100-500, nonché quello sintetizzato seguendo il protocollo di *Mohamed et al.*⁶ e pertanto con una letteratura di supporto più ampia. In *Figura 28* è raffigurato il confronto tra lo spettro del campione post adsorbimento con il corrispettivo tal quale: è evidente che la banda attorno a 3500 cm^{-1} sia aumentata considerevolmente in intensità, confermando l'ipotesi proposta. Questo risultato suggerisce che la silice sintetizzata non è un materiale inerte. Pertanto, nella sezione 4.4, si sono voluti riportare alcuni risultati relativi ad un test di degradazione specifico.

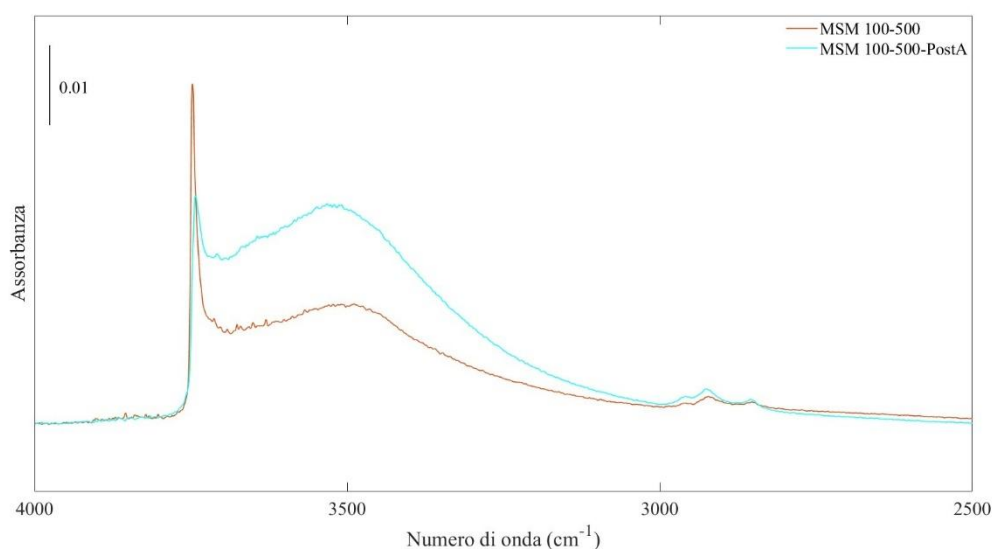


Figura 28. Spettroscopia FTIR di MSM-100-500 e MSM-100-500-PostA

4.3.3. Potenziale ζ

Una misura della carica superficiale delle silici, dovuta alla presenza di OH superficiali e cruciale per l'attività emostatica⁸⁷, può essere fornita da un test di valutazione del potenziale ζ . In *Tabella 10* e in *Figura 29* ne è presentato il risultato. Per ogni campione il test è stato ripetuto tre volte. Sono riportati solamente i dati dei test che sono giunti a convergenza. I test che non sono giunti a convergenza sono indicati con N.C. Si osserva che i campioni calcinati a 350°C hanno un potenziale più negativo rispetto al loro corrispettivo calcinato a 500°C. MSM-100-350 presenta il valore di potenziale ζ più negativo; confrontando questi dati con quelli in *Tabella 8* si osserva che il potenziale è tanto più negativo quanto più è elevata la concentrazione superficiale di silanoli superficiali, con una dipendenza lineare, come si osserva in *Figura 30*.

Tabella 10. Potenziale ζ di MSM-100-350, MSM-100-500, MSM-130-350 e MSM-130-500.

Campione	Test 1 [eV]	Test 2 [eV]	Test 3 [eV]	Media [eV]
MSM-100-350	-23,0	-23,5	-23,7	-23,4 ± 0,4
MSM-100-500	-16,6	N.C.	-15	-15,8 ± 1,1
MSM-130-350	-20,2	-20,2	-17,4	-19,27 ± 1,6
MSM-130-500	-18,7	-19,1	-19,2	-19 ± 0,3

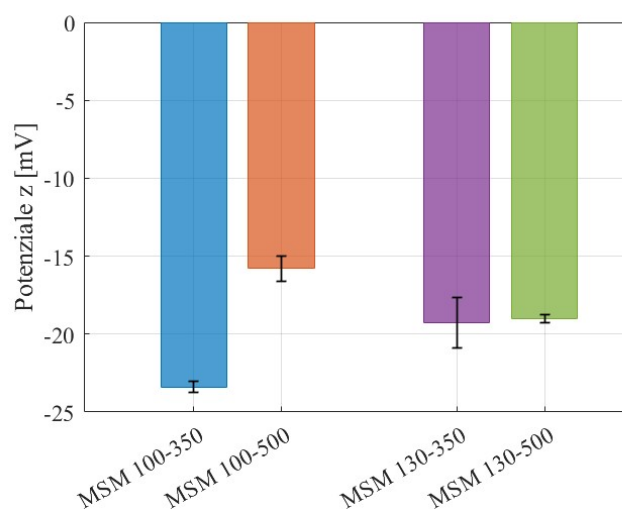


Figura 29. Potenziale ζ medio con indicatore della deviazione standard.

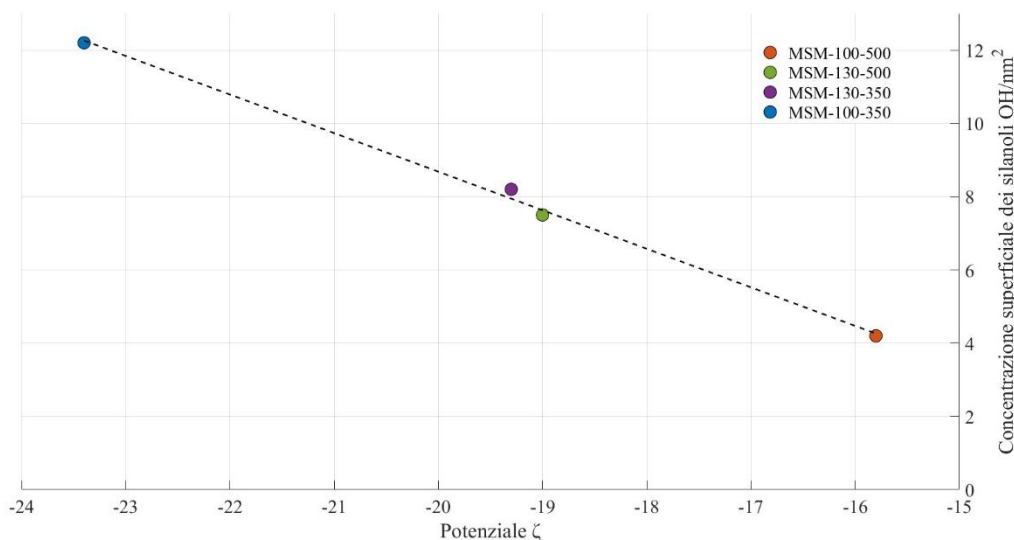


Figura 30. Relazione tra concentrazione superficiale di silanoli e potenziale ζ .

4.3.4. Risultato dei test emostatici

I campioni sono stati testati con plasma bovino per valutarne l'attività emostatica. Dopo l'aggiunta al plasma delle silici e di CaCl_2 , il sistema, dopo un tempo variabile e pari al TFC, appare come riportato in *Figura 31*. La prova è stata ripetuta tre volte su ogni campione, oltre che su un campione di plasma nel quale non sono state aggiunte silici, definito come "controllo". Ciò ha consentito di valutare la riduzione dei tempi di coagulazione rispetto al plasma tal quale. I tempi misurati, la media con deviazione standard e la differenza rispetto al campione di controllo sono riportati in *Tabella 11*; gli stessi risultati sono riassunti in *Figura 32*. I dati raccolti sono stati analizzati tramite un test ANOVA¹⁰³ per verificarne la significatività statistica. Tuttavia, come previsto, il numero esiguo di osservazioni ha ridotto notevolmente la potenza statistica dello studio, rendendo improbabile il riscontro di differenze significative tra i gruppi analizzati. La discussione che segue è pertanto da considerare circostanziale.

Tutti i campioni hanno mostrato una elevata attività emostatica, con riduzione percentuale dei tempi di coagulazione compresa tra 85% e 93% circa. Le ragioni per cui queste silici hanno una così spiccata attività emostatica è da ricercare nella natura della superficie: la presenza di silanoli conferisce alla superficie una carica negativa, il che favorisce l'attivazione dei fattori di coagulazione^{3,4}. A tal proposito, i campioni calcinati a 350°C, nonché quelli con la maggiore concentrazione superficiale di silanoli (*Tabella 3*, *Tabella 6*) presentano mediamente i tempi di coagulazione inferiori.

Benché i campioni che hanno subito trattamento idrotermale a 130°C siano quelli con dimensione dei pori maggiore e porosità più uniforme, essi presentano i tempi di coagulazione più elevati, contrariamente a quanto atteso sulla base di alcuni dati riportati in letteratura^{88,89}. È quindi possibile che l'effetto dell'area superficiale, più bassa in questi campioni, sia quello prevalente. Inoltre, alcuni studi, tra cui quello di *Su et al.*^{46,104} hanno dimostrato che una struttura di pori gerarchizzata – o comunque disordinata e con ampia distribuzione – è associata ad una più spiccata attività emostatica. Questo troverebbe conferma nel fatto che le isoterme di adsorbimento di MSM-100-350 e di MSM-100-500 (*Figura 11*, *Figura 18*) suggeriscono un certo grado di disordine e porosità con dimensioni variabili.



Figura 31. Plasma coagulato con silici.

Tabella 11. Tempi di coagulazione misurati durante i test emostatici con plasma bovino.

Campione	Test 1 [min]	Test 2 [min]	Test 3 [min]	Media [min]	Δ percentuale
MSM-100-350	3,5	3,5	3	$3,3 \pm 0,3$	92,7
MSM-100-500	4,5	4,5	5,5	$4,8 \pm 0,6$	89,4
MSM-130-350	5	4,5	5	$4,8 \pm 0,3$	89,4
MSM-130-500	7	7	6	$6,7 \pm 0,6$	85,2
Controllo	45	43	48	$45,3 \pm 2,5$	-

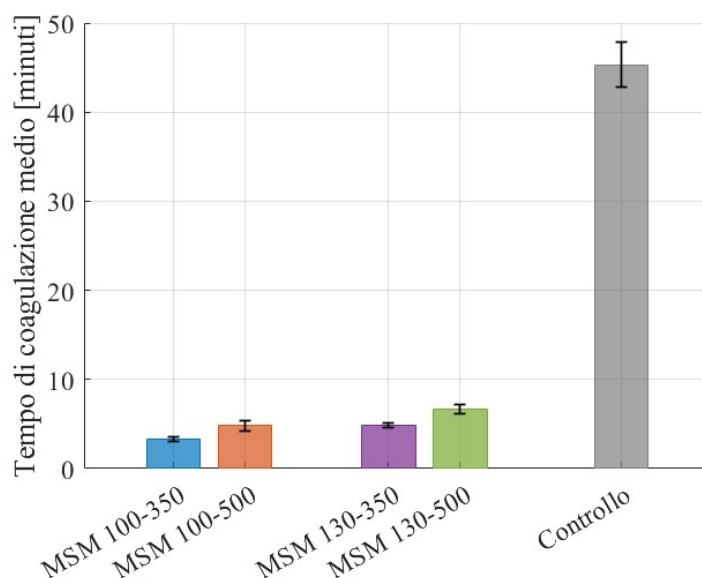


Figura 32. Tempi di coagulazione medi con indicatore della deviazione standard.

Al termine di tutte le considerazioni finora avanzate, è possibile affermare che il campione con la più spiccata attività emostatica è MSM-100-350. Garantisce, infatti, il più breve tempo di coagulazione del plasma bovino. Nonostante i test sull'attività emostatica abbiano scarsa rilevanza statistica, i risultati relativi al suddetto campione sono avvalorati da più di un'analisi. Le silici sintetizzate a 100°C e calcinate a 350°C possiedono, infatti, la più elevata area superficiale, misurata con il modello BET, e la più elevata concentrazione superficiale di silanoli tra tutti i campioni analizzati; lo stesso materiale ha mostrato, inoltre, la più grande

capacità di adsorbimento di acqua e il potenziale – nonché carica superficiale – maggiormente negativo. Benché durante l’attività sperimentale si siano individuati campioni con porosità più grandi, quelle di MSM-100-350 sono comunque di gran lunga superiori rispetto al valore soglia di 10 nm minimi che conferiscono le proprietà emostatiche al materiale. Infine, la porosità non ordinata potrebbe essere un ulteriore elemento che favorisce la formazione del coagulo.

Una eventuale problematicità strettamente relativa alla possibile reale applicazione del materiale è la presenza di un maggior numero di contaminanti rispetto allo stesso campione calcinato a 500°C, come mostrato dall’analisi FTIR (*Figura 13*). Di seguito sono pertanto presentati i risultati dell’analisi XPS volta all’individuazione di tali contaminanti. Assumendo che, indipendentemente dalla temperatura di trattamento idrotermale, i contaminanti superficiali siano invariati, e considerando la sovrapposibilità degli spettri FTIR nella regione a frequenze inferiori a 3000 cm⁻¹, per semplicità di esecuzione, l’analisi è stata condotta sui campioni MSM-130-350 e MSM-130-500.

4.3.5. Valutazione dei contaminanti superficiali

L’analisi XPS survey riportata in *Figura 33* conferma la presenza esclusiva di silicio, ossigeno e carbonio. In *Tabella 12* è riportata la composizione dei campioni: si osserva che aumentando la temperatura di calcinazione la percentuale di carbonio è più che dimezzata e diminuisce anche quella relativa all’ossigeno. La riduzione di ossigeno è giustificata dal fatto che, a 500°C, i fenomeni di condensazione dei silanoli interagenti portano alla perdita di acqua. Inoltre, è possibile che, nei contaminanti, il carbonio sia legato anche all’ossigeno, oltre che al silicio e all’idrogeno.

Osservando gli spettri XPS HR, in *Figura 34* e in *Figura 35*, relativi al picco del carbonio, si nota che questo è asimmetrico; è quindi possibile effettuare una deconvoluzione, il cui risultato sono due picchi parzialmente sovrapposti. Il primo si trova ad una BE di circa 284,5 eV, il secondo a circa 286,1 eV. Questi valori di energia sono riconducibili a C-H alifatici¹⁰⁵, il che conferma le ipotesi finora avanzate, per cui i picchi individuati nell’analisi FTIR sono relativi a residui di templante. La presenza di tali residui potrebbe rappresentare un potenziale limite alla biocompatibilità, in quanto in grado di interagire con le proteine inducendone fenomeni di aggregazione indesiderata⁸⁵. Tuttavia, alla luce delle ridotte percentuali di carbonio rilevate, la cui origine potrebbe essere in parte attribuibile anche a contaminazioni ambientali, l’eventuale persistenza di residui di templante sulla superficie potrebbe essere trascurabile. Rimane comunque opportuno approfondirne la valutazione al fine di determinarne un’eventuale tossicità.

Tabella 12. Composizione atomica percentuale di MSM-130-350 e MSMS-130-500.

<i>Campione</i>	<i>Si 2p [%]</i>	<i>O 1s [%]</i>	<i>C 1s [%]</i>
MSM-130-350	26,6	70,7	2,7
MSM-130-500	29,1	69,7	1,2

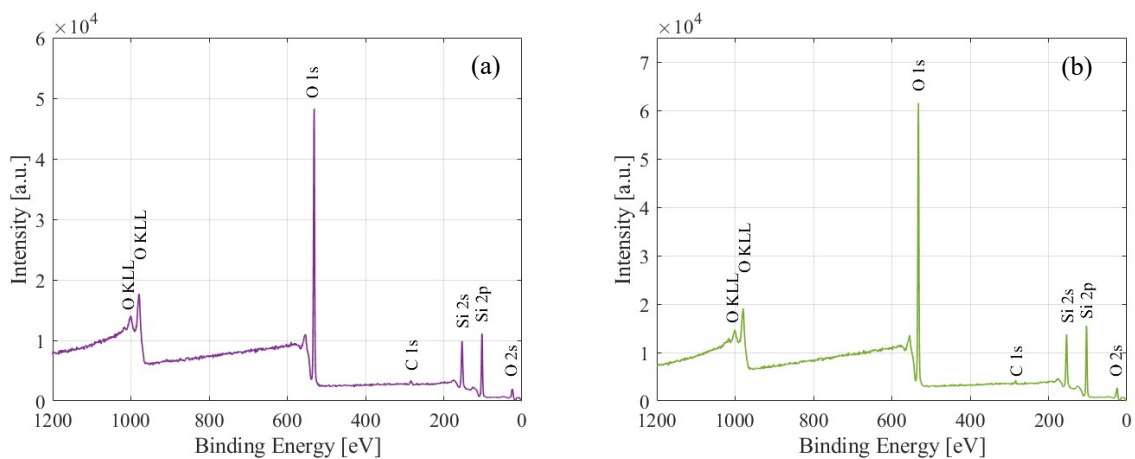


Figura 33. Spettro XPS survey di MSM-130-350 (a) e di MSM-130-500 (b).

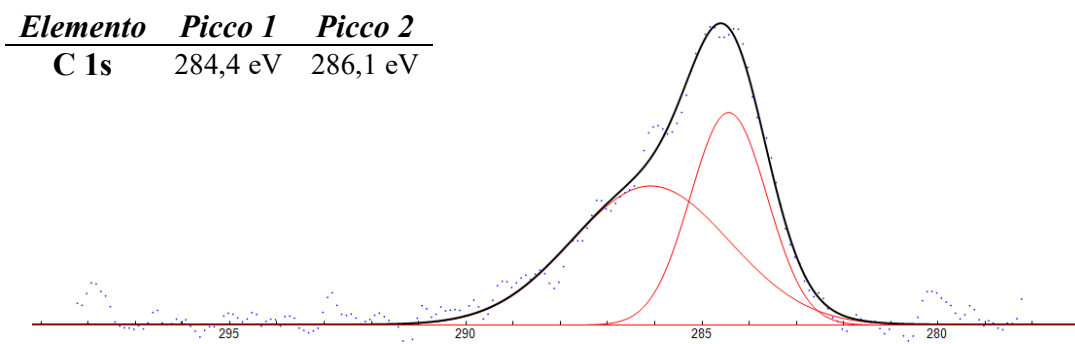


Figura 34. Spettro XPS HR di MSM-130-350, relativo al picco del carbonio e deconvoluzione.

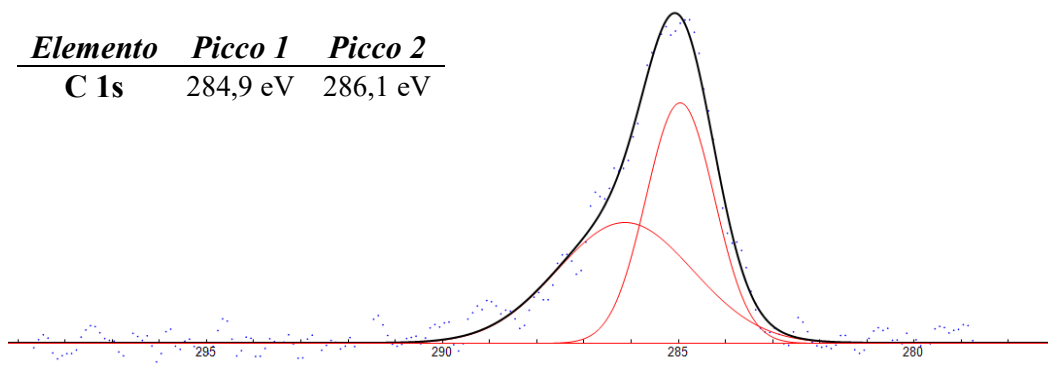


Figura 35. Spettro XPS HR di MSM-130-500, relativo al picco del carbonio e deconvoluzione.

4.4. Risultato dei test di degradazione in plasma

MSM-100-500-PostDegP è stato analizzato al FESEM. La micrografia riportata in *Figura 36* mostra particelle principalmente sferiche, con diametri di circa $3\ \mu\text{m}$ (*Tabella 13*). Come si può osservare in *Figura 37*, sia la distribuzione che il valore medio è rimasto simile al campione non degradato, sebbene la curva sia spostata a valori leggermente più bassi e la popolazione di particelle con diametro superiore a $4\ \mu\text{m}$ sia drasticamente crollata. Osservando *Figura 36* si nota la comparsa di strutture dalla forma irregolare. Per stabilirne la natura ed accertarsi che non si tratti di residui di plasma, il campione è stato sottoposto ad una analisi EDX, i cui risultati sono presentati in *Figura 38* e in *Tabella 14*. Poiché non si sono individuate tracce di azoto, tipico componente del plasma, se n'è esclusa la possibile presenza sottoforma di cristalli; l'elevato contenuto di carbonio suggerisce che sono comunque presenti delle contaminazioni. Per quanto riguarda le scaglie, è più probabile che si tratti di frammenti di particelle che si sono frantumate durante il processo di degradazione.

Tabella 13. Dimensione delle particelle di MSM-100-500 e MSM-100-500-PostdegP.

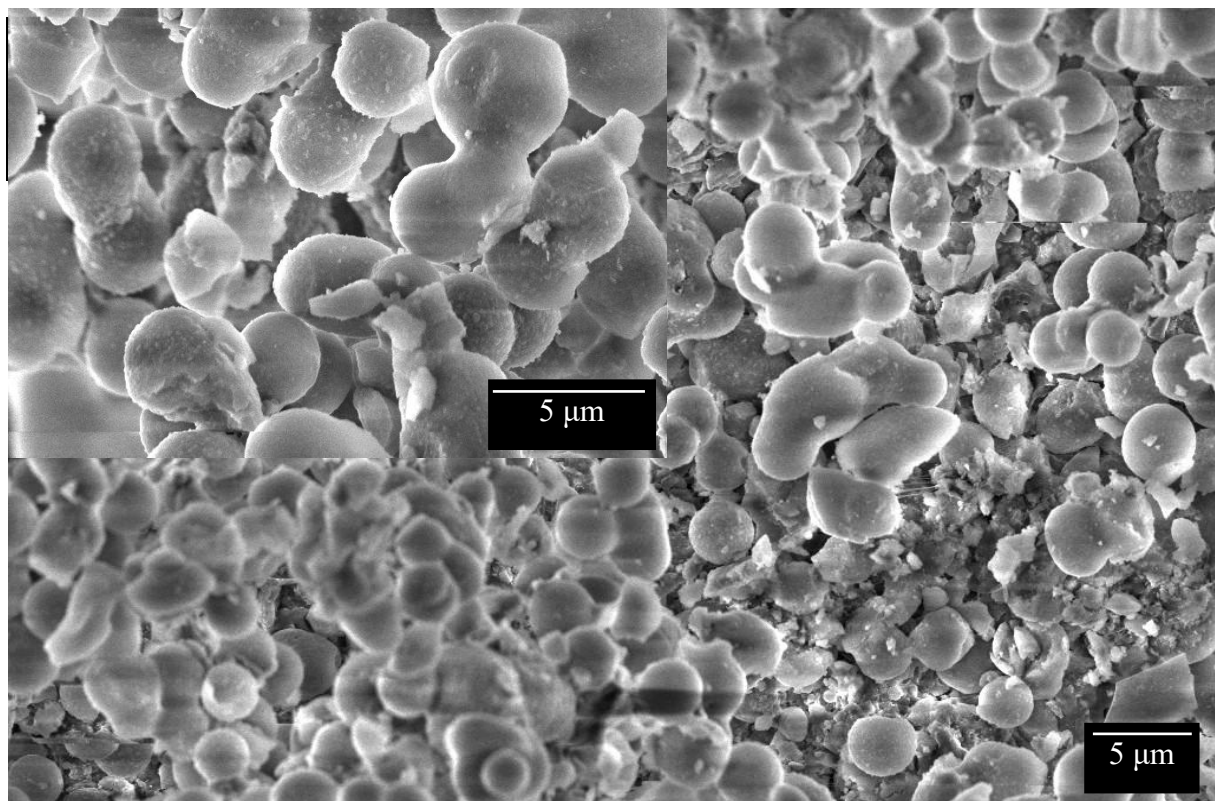


Figura 36. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 5.00kX di MSM-100-500-PostDegP

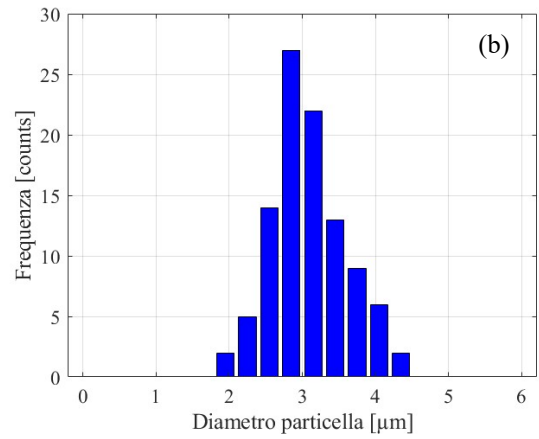
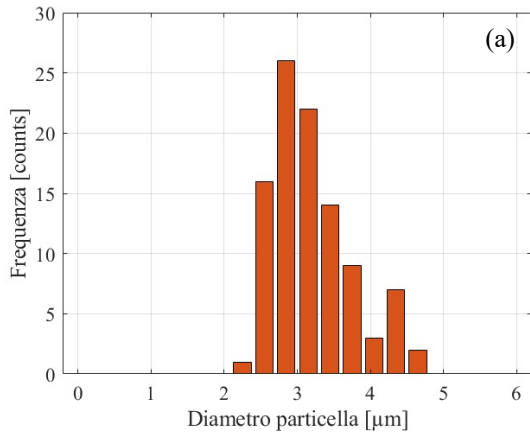


Figura 37. Distribuzione dei diametri di MSM-100-500 (a) e di MSM-100-500-PostDegP (b)

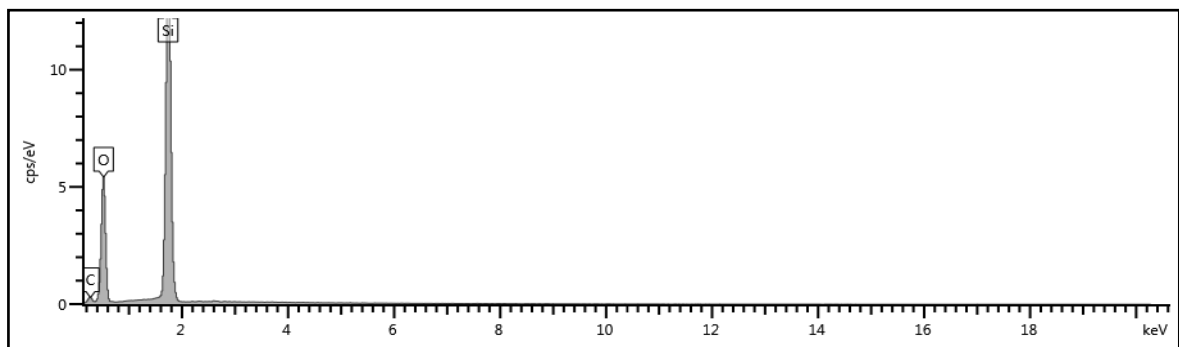


Figura 38. Spettro EDX relativo al campione MSM-100-500-PostDegP

Tabella 14. Composizione del campione MSM-100-500-PostDegP ottenuta con EDX

Elemento	C	O	Si
%at	17,8 ± 0,9	58,0 ± 2,8	24,2 ± 3,7

Per meglio comprendere come la superficie si sia modificata durante la degradazione, all'analisi al FESEM si è affiancata l'analisi mediante spettroscopia FTIR, il cui risultato è riportato in *Figura 39*. Si osserva che il picco a 3740 cm^{-1} dei silanoli isolati è ridotto drasticamente in intensità, mentre la banda caratteristica dei silanoli interagenti attorno a 3500 cm^{-1} è diventata molto più evidente, così come i picchi relativi ai C-H alifatici a lunghezze d'onda più basse. Questo risultato trova conferma negli studi di *Downing et al.*⁵: durante la degradazione, infatti, i silanoli isolati e i ponti silossanici possono reagire con l'acqua e altre molecole presenti in soluzione, portando alla formazione di silanoli interagenti, più reattivi, alla graduale disgregazione del network siliceo e al conseguente rilascio di acido silicico. Confrontando lo spettro IR ottenuto con quello di un generico gel di silice¹⁰⁶, si osserva come il sistema stia effettivamente evolvendo in questa direzione, con la graduale scomparsa di silanoli isolati.

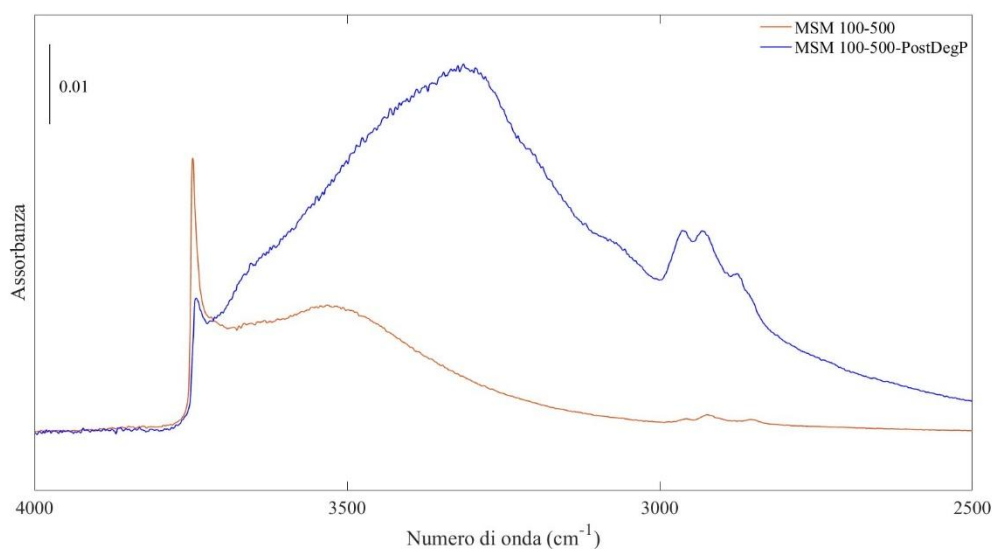


Figura 39. Spettroscopia FTIR di MSM-100-500 e MSM-100-500-PostDegP

4.5. Caratterizzazione di MSM-100-350-2X e di MSM-100-500-2X

Al fine di ottenere un materiale più attivo rispetto a MSM-100-350, è stata proposta un'ulteriore sintesi, come descritto nella sezione 3.2: mantenendo invariate le temperature di sintesi, si è utilizzata una quantità doppia di TMB con l'obiettivo di aumentare ulteriormente la dimensione dei pori. Di seguito, è riportata la caratterizzazione strumentale dei materiali così ottenuti.

Per caratterizzare i campioni MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X è stato utilizzato il FESEM. In *Figura 40* e in *Figura 41* si osserva come le particelle abbiano una forma per lo più sferica; le silici calcinate a 500°C presentano un certo grado di coalescenza. Inoltre, in entrambi i casi si osservano dei corpi estranei dell'ordine della decina di μm , probabilmente riconducibili a residui di TMB; in MSM-100-350-2X si osservano anche dei residui non più grandi del μm , presumibilmente attribuibili al TMB. Con il software Fityk si è analizzata una popolazione di 100 sfere di silice per campione: come emerge da *Tabella 15* e da *Figura 42* le dimensioni delle particelle variano tra i 2 e i 6 μm , come atteso, e la distribuzione è monomodale.

Tabella 15. Dimensione delle particelle di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.

<i>Campione</i>	<i>Diametro [μm]</i>
MSM-100-350-2X	$3,68 \pm 0,68$
MSM-100-500-2X	$3,52 \pm 0,67$

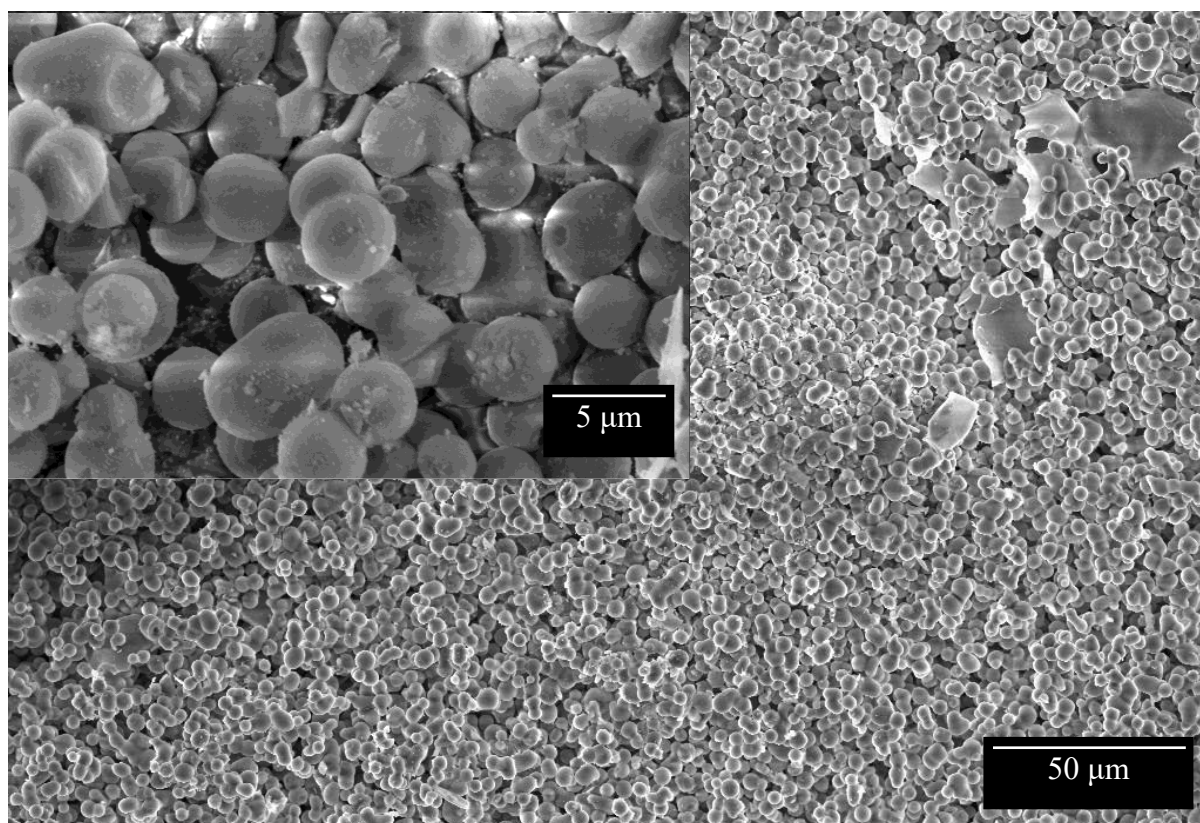


Figura 40. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-100-350-2X

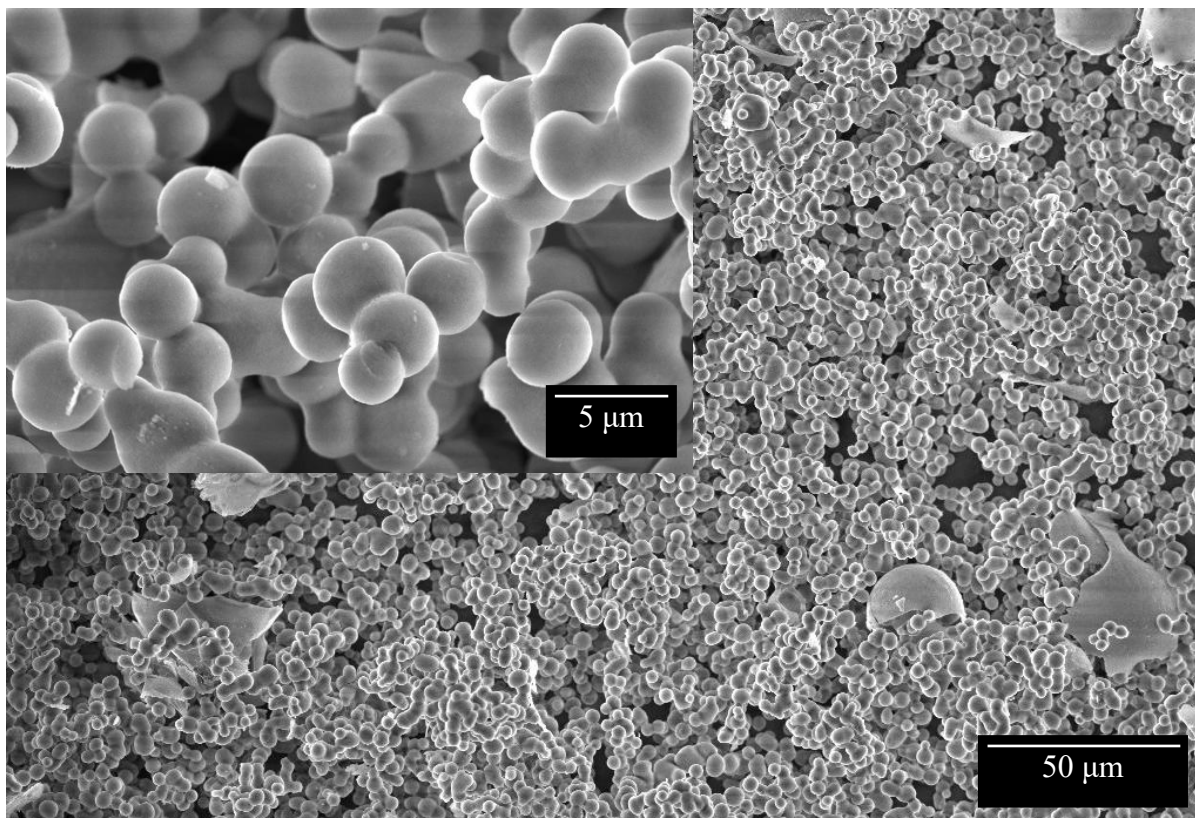


Figura 41. Immagine al FESEM con ingrandimento 1.00kX e 10.00kX di MSM-100-500-2X

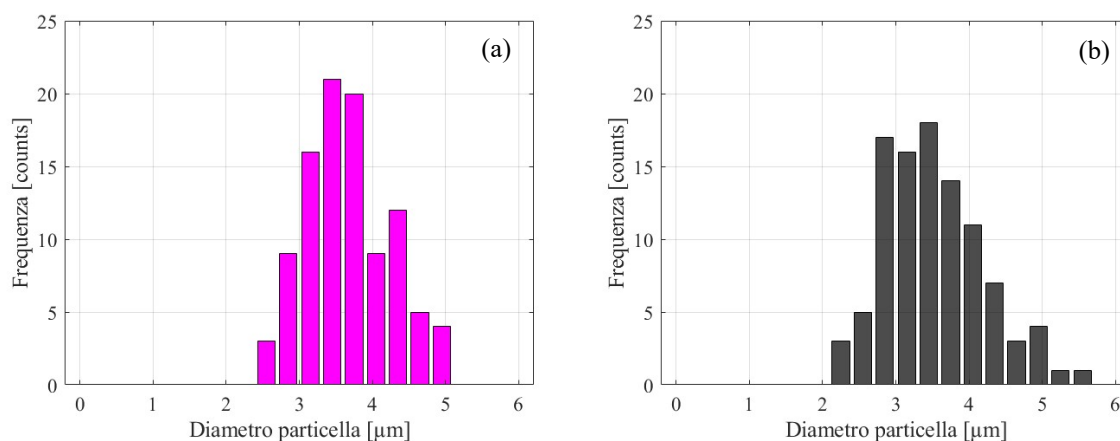


Figura 42. Distribuzione dei diametri di MSM-100-350-2X (a) e di MSM-100-500-2X (b).

Come definito dalla classificazione IUPAC, le isoterme di adsorbimento e desorbimento di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X nella Figura 43 sono di tipo IV(a). Anche se non si osservano gradini nel ramo di desorbimento, il coppia di isteresi rientra nella classificazione H2(b). Questo tipo di coppia è generalmente associato a strutture mesoporose con pori a collo di bottiglia o parzialmente occlusi, con una distribuzione dei diametri di ingresso al poro molto ampia⁹¹.

Utilizzando il modello BET, si sono ottenuti i valori di SSA_{BET} e di V_p , riportati in Tabella 16, mentre con il metodo DFT⁹² si è valutata la distribuzione della dimensione dei pori, presentata in Figura 44. I valori di SSA_{BET} e di V_p del campione calcinato a 500°C sono inferiori rispetto a quello calcinato a 350°C, così come il picco nella distribuzione dei pori. Questi

risultati sono molto simili a quelli ottenuti per i campioni analizzati nella sezione 4.1. Ne segue che l'aggiunta di TMB in un quantità doppia rispetto a quella proposta da *Mohamed et al.*⁹⁷ non ha restituito i risultati attesi. È possibile che il TMB in eccesso non sia entrato nel framework micellare, accumulandosi viceversa al di fuori dello stesso.

Tabella 16. Area superficiale e volume poroso di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.

Campione	SSA_{BET} [m^2/g]	V_p [cm^3/g]
MSM-100-350-2X	701,01	1,99
MSM-100-500-2X	462,27	1,58

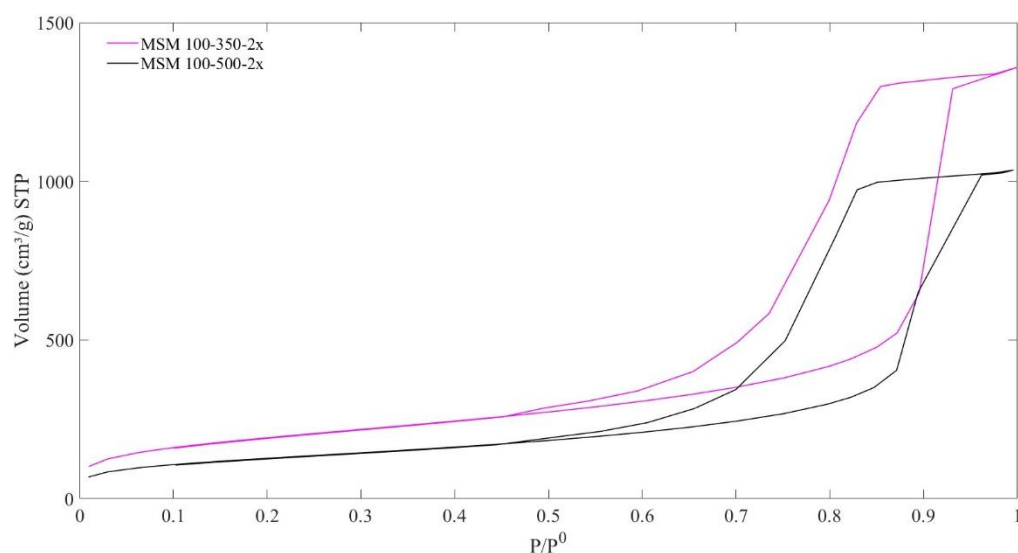


Figura 43. Isotherme di adsorbimento e desorbimento di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.

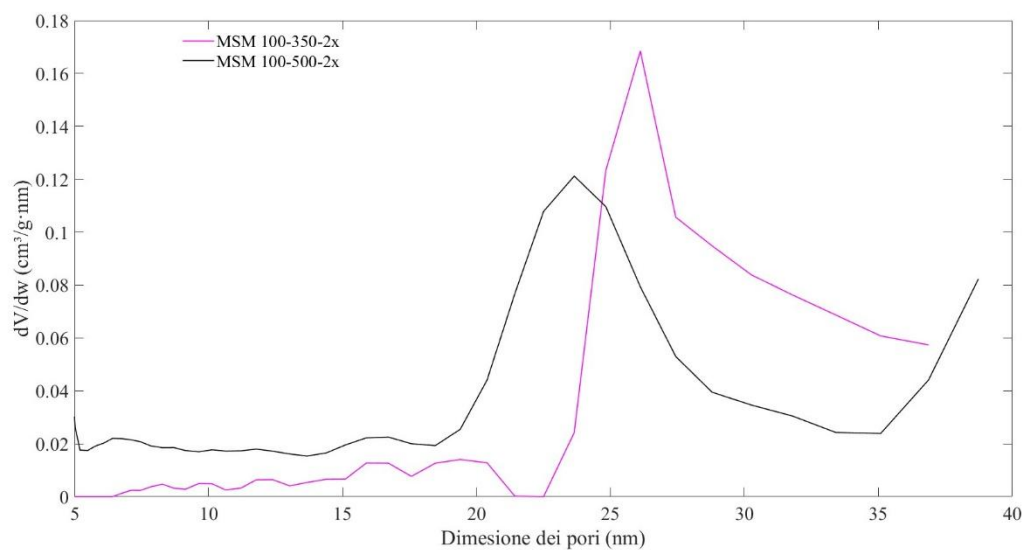


Figura 44. Distribuzione del diametro dei pori di MSM-100-350-2X e di MSM-100-500-2X, calcolata con DFT.

L'analisi FTIR di MSM-100-350-2X e di MSM-100-500-2X è presentata in *Figura 45*. Si osserva un picco a 3740 cm^{-1} , così come una banda larga attorno a 3500 cm^{-1} , riconducibili rispettivamente ai silanoli isolati e a quelli interagenti¹⁰¹. La banda relativa ai silanoli interagenti nel campione calcinato a 500°C è molto meno intensa, il che indica che durante la calcinazione parte dei silanoli è condensata. I picchi che appaiono nel range 3000 e 2850 cm^{-1} sono riconducibili a residui del templante, come discusso nelle sezioni precedenti.

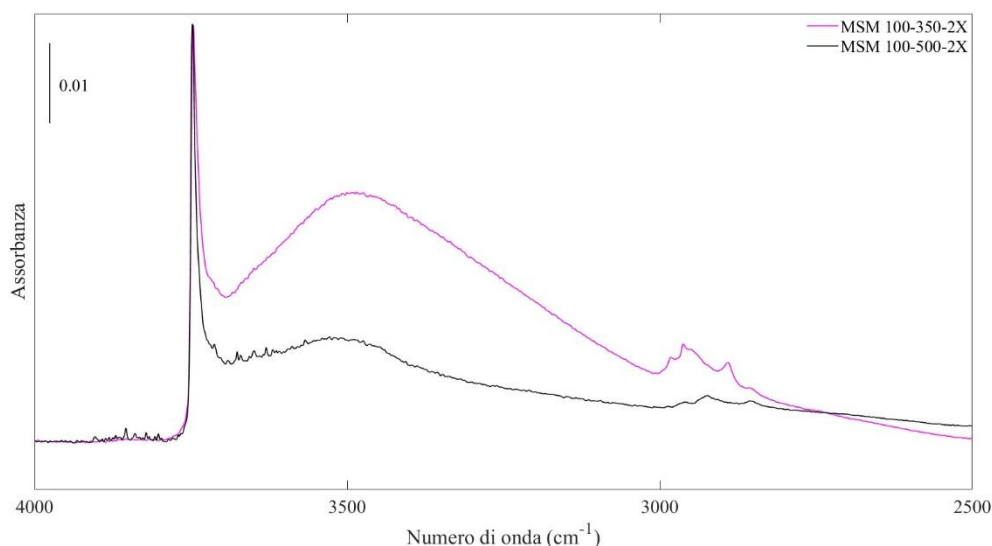


Figura 45. Spettroscopia FTIR di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.

In *Figura 46* sono riportate le curve TGA di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X. L'acqua fisisorbita che viene persa durante la prova fino a 150°C è pari al 17% per il campione calcinato a 350°C e al 15% per quello calcinato a 500°C . A temperature più elevate si osserva la condensazione dei silanoli interagenti, con conseguente ulteriore perdita d'acqua e riduzione in peso. L'*Equazione 1* è utilizzata per calcolare la concentrazione superficiale di silanoli, il cui valore è riportato in *Tabella 17*. Anche questa misura, come le precedenti, non mostra differenze degne di nota rispetto ai campioni sintetizzati senza modificare la quantità dei reagenti.

Tabella 17. Concentrazione superficiale di silanoli di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.

<i>Campione</i>	<i>Silanoli [OH/nm²]</i>
MSM-100-350-2X	9,6
MSM-100-500-2X	3,9

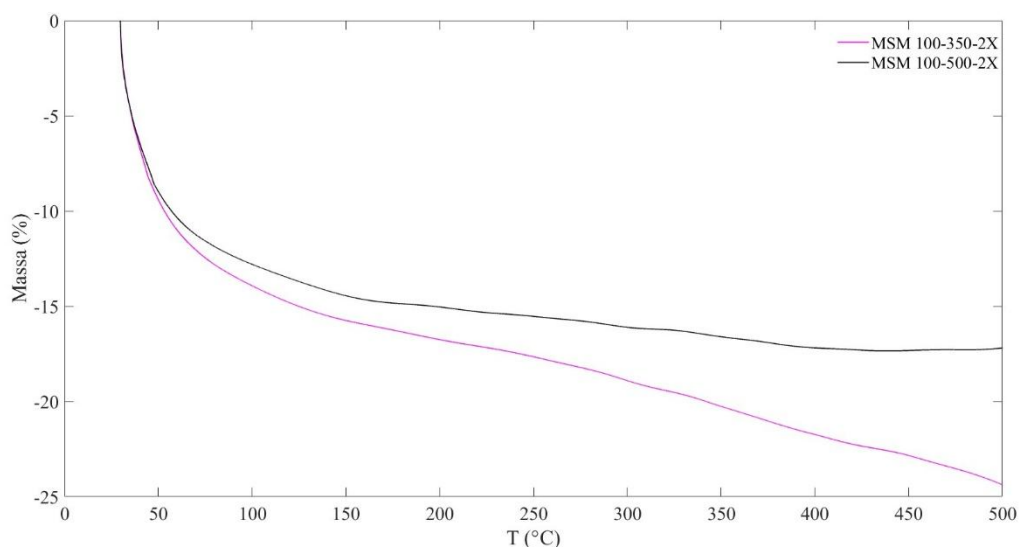


Figura 46. Curve termogravimetriche di MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X.

Nonostante il materiale ottenuto non presenti proprietà chimico-fisiche più favorevoli all'attività emostatica rispetto ai materiali presentati nei paragrafi precedenti, si è comunque voluto procedere ad un test con plasma per valutarne l'attività emostatica. I risultati sono riportati in *Tabella 18*. Confrontando questi dati con quelli in *Tabella 11*, MSM-100-350-2X e MSM-100-500-2X presentano dei tempi di coagulazione intermedi rispetto agli altri campioni.

Non avendo mostrato dei tempi di coagulazione particolarmente promettenti, questi due campioni non sono stati sottoposti ad ulteriori analisi.

Tabella 18. Tempi di coagulazione misurati sui campioni con doppio TMB.

Campione	Test 1 [min]	Test 2 [min]	Test 3 [min]	Media [min]
<i>MSM-100-350-2X</i>	3,5	4	5,5	4,3 ± 1,0
<i>MSM-100-500-2X</i>	5	5,5	7	5,8 ± 1,0
<i>Controllo</i>	45	43	48	45,3 ± 2,5

5. Sviluppi futuri

Il lavoro sperimentale svolto lascia ampio spazio ad approfondimenti futuri. Di seguito vengono riportate alcuni filoni di ricerca che potrebbero essere approfonditi.

A seguito delle analisi effettuate, sono più volte emerse delle dirette relazioni tra parametri di sintesi, morfologia del campione ed attività emostatica. Al fine di meglio comprendere la natura di queste relazioni e poter fornire al materiale la combinazione di proprietà più adatta, si potrebbero effettuare nuove sintesi, andando a variare in un range più ampio la temperatura di calcinazione e quella di trattamento idrotermale. Inoltre, tramite lo studio di questi campioni, si potrebbe definire una nuova relazione tra le condizioni di sintesi e la forma del coppia di isteresi – e dunque delle mesoporosità. Così facendo, si potrebbe evidenziare più chiaramente il contributo dell'omogeneità delle porosità sull'attività emostatica delle silici.

I test per valutare l'attività emostatica sono stati effettuati in plasma, ragion per cui potrebbe essere interessante valutare il comportamento delle silici direttamente nel sangue. Le finalità di questo studio sarebbero molteplici e riguarderebbero aspetti diversi del materiale. In primis, valutare l'efficacia delle silici nel sangue è fondamentale per eventuali test *in vivo*, mai effettuati fino ad ora. Il sangue, rispetto al plasma, contiene la porzione proteica, che potrebbe reagire in modi differenti con il materiale stesso. A tal proposito, questi studi sarebbero fondamentali per capire se le tracce di templante individuate nel presente lavoro di tesi possano precludere l'applicazione finale.

Avendo dimostrato che le silici sintetizzate non sono inerti, per meglio comprendere come queste si comporterebbero una volta applicate sulla ferita, si propongono degli studi di degradazione mirati a comprendere la reattività del materiale. Nello specifico, sarebbe interessante testare le silici in mezzi di degradazione differenti e per diversi tempi, così da confermare che nelle condizioni di effettivo utilizzo il materiale degradi rilasciando acido silicico.

Un ulteriore settore di ricerca riguarda il mercato nel quale le silici mesoporese andrebbero ad inserirsi (TAM – Total Addressable Market), ovvero il mercato globale dei prodotti emostatici, che vale almeno 5 miliardi USD, con ragguardevoli prospettive di crescita¹⁰⁷. Tuttavia, il mercato dei materiali a base di silice è molto più piccolo e raggiunge al più l'ordine dei milioni di USD¹⁰⁸. Il SAM – Serviceable Addressable Market, ovvero il mercato target che il prodotto può effettivamente raggiungere – sarebbe quello degli “agenti emostatici topici”¹⁰⁷, all'interno il quale le silici mesoporese dovrebbero competere con tecnologie già consolidate quali QuickClot Combact GauzeTM 49 e WoundStatTM 50. In questo contesto, sarebbe importante riuscire a far risaltare i vantaggi dell'utilizzo delle silici, ad esempio proponendo un caso studio in cui ne viene confrontata l'attività con altri prodotti.

È inoltre fondamentale comprendere le modalità di applicazione del materiale sulla ferita. Considerando che le silici verrebbero utilizzate in contesti emergenziali quali incidenti stradali o per ferite da armi da fuoco e da guerra, l'applicazione dell'emostatico potrebbe essere effettuata direttamente sottoforma di polveri. Si possono quindi ipotizzare delle bustine, impermeabili all'acqua e agli agenti esterni, che all'occorrenza possano essere aperte permettendo di versarne il contenuto sulla ferita. Attualmente, le principali soluzioni commercializzate prevedono l'immobilizzazione delle polveri su garze o al più idrogeli, così da semplificarne la gestione e ridurre la dispersione nell'ambiente^{49,50}. Lo stesso sistema si

potrebbe applicare anche alle silici, ma questo farebbe aumentare i costi del prodotto finito, senza avere particolari vantaggi sull'efficacia.

Una volta che le polveri sono state applicate, benché queste vadano incontro a degradazione, prima di richiudere la ferita è necessario rimuoverle con acqua¹⁰⁹. Questo apre un'ulteriore aspetto di indagine che riguarda lo smaltimento di rifiuti speciali. Benché non esistano indicazioni specifiche riguardo allo smaltimento esclusivo di polveri, si può fare riferimento alle normative della World Health Organization – WHO. L'acqua con la quale la ferita è irrigata, contenente non solo le silici ma anche tracce di sangue, viene classificata come rifiuto liquido biologico infetto. È pertanto necessario raccogliere il rifiuto, sul quale verranno applicati dei trattamenti preliminari di sterilizzazione e inattivazione microbiologica, prima dello smaltimento finale. Discorso analogo vale anche per eventuali garze, nel caso in cui si approfondisca la formulazione di un dispositivo che immobilizza le silici¹¹⁰.

In sintesi, i risultati ottenuti aprono la strada a una duplice prospettiva: da un lato, l'approfondimento scientifico delle correlazioni tra struttura e attività biologica del materiale; dall'altro, la valutazione della sua reale collocazione nel mercato dei dispositivi emostatici. Solo attraverso l'integrazione di questi due aspetti sarà possibile definire con chiarezza i margini di applicabilità clinica delle silici mesoporose e il loro potenziale contributo all'innovazione in campo biomedico.

6. Conclusioni

Le silici mesoporose sono un materiale dalle rilevanti proprietà emostatiche, caratterizzato dall'ottima biocompatibilità e biodegradabilità. Queste caratteristiche le hanno elette a materiale scelto per gli studi approfonditi in questa tesi^{3,4}.

L'obiettivo del lavoro sperimentale effettuato è stato quello di individuare delle relazioni tra parametri del materiale, proprietà morfologiche e chimico-fisiche e attività emostatica. Per raggiungere questo obiettivo si sono sintetizzate delle silici seguendo il protocollo di *Mohamed et al.*⁶, applicandovi poi alcune modifiche: si è variata la temperatura di calcinazione (350°C e 500°C) e di trattamento idrotermale (100°C e 130°C), e si è modificata la quantità di agente rigonfiante.

Le particelle così ottenute sono state caratterizzate con diverse tecniche complementari. L'analisi FESEM ha mostrato che tutte le particelle hanno una morfologia prettamente sferica, con dimensioni comprese tra i 2 e i 6 µm. Temperature di sintesi e di calcinazione più elevate hanno causato un blando fenomeno di coalescenza. L'analisi di fisisorbimento di azoto ha restituito delle isoterme di tipo IV con coppia di isteresi, a conferma della mesoporosità dei materiali. Il trattamento idrotermale a 130°C ha ridotto l'effetto di pore-blocking, consentendo l'ottenimento di una struttura più ordinata. Inoltre, ha causato un aumento nel diametro dei pori e nel loro volume complessivo, a scapito tuttavia dell'area superficiale. I campioni sintetizzati con quantità doppia di agente rigonfiante non hanno mostrato delle porosità più grandi rispetto al campione sintetizzato senza modifiche, ragion per cui non sono stati presi in considerazione per ulteriori analisi.

Ulteriori analisi di spettroscopia FTIR hanno evidenziato la presenza, in superficie, di silanoli interagenti e isolati. Come confermato anche dalla TGA, all'aumentare in particolare della temperatura di calcinazione, si osserva una parziale condensazione dei silanoli interagenti. L'effetto si osserva anche con l'aumento della temperatura di trattamento idrotermale, ma risulta meno importante. La quantità di silanoli superficiali, calcolata a seguito della TGA, risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di acqua adsorbita durante un test di adsorbimento; la stessa relazione si evidenzia anche prendendo in considerazione il potenziale ζ della superficie.

Questi dati trovano poi conferma nel test in plasma bovino, durante il quale si aggiungono silici e CaCl₂ in plasma diluito. Benché il significato statistico del test sia scarso a causa del ridotto numero di prove effettuate, tutti i campioni mostrano una elevata attività emostatica, con riduzione dei tempi di coagulazione di circa il 90% rispetto al plasma senza silici. Il campione che ha ridotto maggiormente i tempi di formazione del coagulo è stato quello che ha subito trattamento idrotermale a 100°C e calcinazione a 350°C. Questo campione è quello che ha mostrato anche la più elevata area superficiale e maggior capacità di adsorbire acqua, a indicazione del fatto che probabilmente sono questi i parametri che più influenzano l'attività emostatica delle silici. Un altro contributo potrebbe essere dato dalla disomogeneità nella mesostruttura che, in alcuni studi⁴⁶, è stato proposto essere un fattore in grado di favorire l'emostasi. Una eventuale problematica di questo campione potrebbe essere la presenza, in superficie, di piccole quantità di residui di template.

Dopo aver delineato alcune relazioni tra proprietà strutturali e funzionali, è stata effettuato anche un test di degradazione in plasma. I risultati di questo test hanno confermato che il

materiale non è inerte e che, dopo 24 ore, presenta un grado di degradazione importante, associato ad alcune modifiche superficiali che rendono il sistema simile ad un gel di silice.

In conclusione, i risultati sperimentali hanno evidenziato come i parametri di sintesi – in particolare la temperatura di calcinazione e quella di trattamento idrotermale – influenzino in modo significativo la morfologia, la porosità e la chimica superficiale delle silici mesoporose, determinandone, allo stesso tempo, le proprietà emostatiche. L'elevata riduzione dei tempi di coagulazione ottenuta dai campioni testati, insieme alla comprovata capacità di degradarsi in ambiente fisiologico, conferma il potenziale di questi materiali come candidati per future applicazioni biomediche. Tali evidenze offrono una base solida per ulteriori approfondimenti, volti a chiarire le relazioni tra le proprietà e a valutare l'effettiva trasferibilità clinica delle silici mesoporose.

Bibliografia

1. Ribatti, D. William Harvey and the discovery of the circulation of the blood. *J Angiogenes Res* **1**, 3 (2009).
2. Periyah, M. H., Halim, A. S., Zaharil, A. & Saad, M. *Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research IJHOSCR* vol. 11 (2017).
3. Li, Q. & Zhou, Y. Brief History, Preparation Method, and Biological Application of Mesoporous Silica Molecular Sieves: A Narrative Review. *Molecules* vol. 28 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules28052013> (2023).
4. Hong, H. *et al.* Novel porous silica granules for instant hemostasis. *RSC Adv* **6**, 78930–78935 (2016).
5. Downing, M. A. & Jain, P. K. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, properties, and biomedical applications. in *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications* 267–281 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-816662-8.00016-3.
6. Mohamed, S. S. Y. *et al.* New insights in large-pores mesoporous silica microspheres for hemostatic application. *J Mater Sci Mater Med* **36**, 18 (2025).
7. Deryło-Marczewska, A., Marczewski, A. W., Skrzypek, I., Pikus, S. & Kozak, M. The effect of aging temperature on structure characteristics of ordered mesoporous silicas. in *Applied Surface Science* vol. 252 625–632 (Elsevier, 2005).
8. Mazinani, B., Beitollahi, A., Masrom, A. K., Ibrahim, S. & Jamil, F. The effect of aging temperature on the pores of mesoporous SBA-15 silica. in *AIP Conference Proceedings* vol. 1502 272–279 (2012).
9. Ying, W. & Dongyuan, Z. On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates. *Chem Rev* **107**, (2007).
10. Ahmad, W., Aquil, Z. & Alam, S. Historical background of wound care. *Hamdan Medical Journal* **13**, 189 (2020).
11. Bhattacharya, S. Wound healing through the ages. *Indian Journal of Plastic Surgery* vol. 45 177–179 Preprint at <https://doi.org/10.4103/0970-0358.101255> (2012).
12. Broughton, G., Janis, J. E. & Attinger, C. E. A brief history of wound care. *Plastic and Reconstructive Surgery* vol. 117 Preprint at <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225429.76355.dd> (2006).
13. Yu, P. & Zhong, W. Hemostatic materials in wound care. *Burns and Trauma* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1093/burnst/tkab019> (2021).
14. Hangge, P. *et al.* Hemostasis and nanotechnology. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* vol. 7 S267–S275 Preprint at <https://doi.org/10.21037/cdt.2017.08.07> (2017).
15. Palta, S., Saroa, R. & Palta, A. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia* vol. 58 515–523 Preprint at <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643> (2014).
16. McMichael, M. Primary hemostasis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* vol. 15 1–8 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2005.04021.x> (2005).

17. Obeagu, E. I. Stress-induced hemostasis: mechanisms and implications for health. *Annals of Medicine & Surgery* **87**, 3300–3309 (2025).
18. Risman, R. A. *et al.* Internal fibrinolysis of fibrin clots is driven by pore expansion. *Sci Rep* **14**, (2024).
19. Guo, Y. *et al.* Recent advances in the medical applications of hemostatic materials. *Theranostics* vol. 13 161–196 Preprint at <https://doi.org/10.7150/thno.79639> (2023).
20. Cheng, J. *et al.* Hydrogel-Based Biomaterials Engineered from Natural-Derived Polysaccharides and Proteins for Hemostasis and Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.780187> (2021).
21. Sundaram, C. P. & Keenan, A. C. Evolution of hemostatic agents in surgical practice. in *Indian Journal of Urology* vol. 26 374–378 (2010).
22. Paulo, D. *et al.* History of Hemostasis in Neurosurgery. *World Neurosurgery* vol. 124 237–250 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.12.015> (2019).
23. Montazerian, H. *et al.* Engineered Hemostatic Biomaterials for Sealing Wounds. *Chemical Reviews* vol. 122 12864–12903 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01015> (2022).
24. Landsman, T. L. *et al.* Embolic Applications of Shape Memory Polyurethane Scaffolds. in *Advances in Polyurethane Biomaterials* 561–597 (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-08-100614-6.00020-2.
25. Sultan, M. T. *et al.* Silk Fibroin-Based Biomaterials for Hemostatic Applications. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12050660> (2022).
26. Huang, T. *et al.* A silk nanofiber and hyaluronic acid composite hemostatic sponge for compressible hemostasis. *Int J Biol Macromol* **307**, (2025).
27. Jackson, M. R. *Fibrin Sealants in Surgical Practice: An Overview*. (2001).
28. Cziperle, D. J. Avitene™ microfibrillar collagen hemostat for adjunctive hemostasis in surgical procedures: A systematic literature review. *Medical Devices: Evidence and Research* **14**, 155–163 (2021).
29. Xu, H. *et al.* Preparation and application of collagen-based hemostatic materials: a review. *Collagen and Leather* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s42825-025-00193-x> (2025).
30. Zhang, C. *et al.* Enhanced Hemostatic and Procoagulant Efficacy of PEG/ZnO Hydrogels: A Novel Approach in Traumatic Hemorrhage Management. *Gels* **10**, (2024).
31. Bu, Y. *et al.* Tetra-PEG Based Hydrogel Sealants for In Vivo Visceral Hemostasis. *Advanced Materials* **31**, (2019).
32. Achneck, H. E. *et al.* A comprehensive review of topical hemostatic agents: Efficacy and recommendations for use. *Annals of Surgery* vol. 251 217–228 Preprint at <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181c3bcca> (2010).
33. Beaman, H. T. *et al.* Hemostatic shape memory polymer foams with improved survival in a lethal traumatic hemorrhage model. *Acta Biomater* **137**, 112–123 (2022).
34. Duggan, M. *et al.* Self-expanding polyurethane polymer improves survival in a model of noncompressible massive abdominal hemorrhage. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* **74**, 1462–1467 (2013).

35. Tamer, T. M. *et al.* Development of polyvinyl alcohol/kaolin sponges stimulated by marjoram as hemostatic, antibacterial, and antioxidant dressings for wound healing promotion. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
36. Lemma, S. M., Bossard, F. & Rinaudo, M. Preparation of pure and stable chitosan nanofibers by electrospinning in the presence of poly(ethylene oxide). *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
37. Deineka, V. *et al.* Hemostatic and tissue regeneration performance of novel electrospun chitosan-based materials. *Biomedicines* **9**, (2021).
38. Tiwari, S., Kansara, V. & Bahadur, P. Targeting anticancer drugs with pluronic aggregates: Recent updates. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 586 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119544> (2020).
39. Pellerin, O. *et al.* Microvascular Plug: A New Embolic Material for Hepatic Arterial Skeletonization. *Cardiovasc Intervent Radiol* **37**, 1597–1601 (2014).
40. Mellado, C. *et al.* Development of Graphene Oxide Composite Aerogel with Proanthocyanidins with Hemostatic Properties As a Delivery System. *ACS Appl Mater Interfaces* **10**, 7717–7729 (2018).
41. Borges-Vilches, J., Figueroa, T., Guajardo, S., Aguayo, C. & Fernández, K. Improved hemocompatibility for gelatin-graphene oxide composite aerogels reinforced with proanthocyanidins for wound dressing applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* **206**, (2021).
42. Wang, Y. *et al.* In situ biosynthetic BC/zeolite hybrid hemostat for quick clot. *J Appl Polym Sci* **140**, (2023).
43. Li, J. *et al.* Zeolite-based hemostat QuikClot releases calcium into blood and promotes blood coagulation in vitro. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 367–372 (2013).
44. Alam, H. B. *et al.* Application of a zeolite hemostatic agent achieves 100% survival in a lethal model of complex groin injury in swine. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care* **56**, 974–983 (2004).
45. Yu, L. *et al.* A tightly-bonded and flexible mesoporous zeolite-cotton hybrid hemostat. *Nat Commun* **10**, (2019).
46. Su, C. *et al.* Diatomite hemostatic particles with hierarchical porous structure for rapid and effective hemostasis. *Colloids Surf B Biointerfaces* **219**, (2022).
47. Laurenti, J. B. *et al.* Enhanced pro-coagulant hemostatic agents based on nanometric zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials* **239**, 263–271 (2017).
48. Arnaud, F. *et al.* Exothermic reaction in zeolite hemostatic dressings: QuikClot ACS and ACS+®. *Ann Biomed Eng* **36**, 1708–1713 (2008).
49. Pourshahrestani, S., Zeimaran, E., Djordjevic, I., Kadri, N. A. & Towler, M. R. Inorganic hemostats: The state-of-the-art and recent advances. *Materials Science and Engineering C* vol. 58 1255–1268 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.008> (2016).
50. Kheirabadi, B. S. *et al.* Safety evaluation of new hemostatic agents, smectite granules, and kaolin-coated gauze in a vascular injury wound model in swine. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care* **68**, 269–277 (2010).
51. Gordy, R. & Schreiber. *Military Applications of Novel Devices. Expert Rev. Med. Devices* vol. 8 (2011).

52. Wang, C. *et al.* Synergistic Procoagulant Mechanism and Application of Kaolin-Zeolite Composite Hemostat for Effective Hemorrhage Control. *ACS Appl Mater Interfaces* **16**, 49186–49196 (2024).
53. Wang, J. *et al.* Investigating the efficacy and safety of mineral smectite granules on wound healing. *Exp Ther Med* **21**, (2020).
54. Gerlach, T. *et al.* Preliminary study of the effects of smectite granules (WoundStat) on vascular repair and wound healing in a swine survival model. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care* **69**, 1203–1209 (2010).
55. Carraway, J. W. *et al.* Comparison of a new mineral based hemostatic agent to a commercially available granular zeolite agent for hemostasis in a swine model of lethal extremity arterial hemorrhage. *Resuscitation* **78**, 230–235 (2008).
56. Ostomel, T. A., Shi, Q., Tsung, C. K., Liang, H. & Stucky, G. D. Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity. *Small* **2**, 1261–1265 (2006).
57. Roy, P. *et al.* Bioactive glass incorporated dressing matrix for rapid hemostatic action with antibacterial activity. *Mater Chem Phys* **315**, (2024).
58. Nagrath, M. *et al.* Tantalum-containing mesoporous bioactive glass powder for hemostasis. *J Biomater Appl* **35**, 924–932 (2021).
59. Wang, Y. *et al.* Multi-layer-structured bioactive glass nanopowder for multistage-stimulated hemostasis and wound repair. *Bioact Mater* **25**, 319–332 (2023).
60. Zhou, Y. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B* vol. 8 165–177 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007> (2018).
61. C.T., K. & M.E., L. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* **359**, 710–712 (1992).
62. Narayan, R., Nayak, U. Y., Raichur, A. M. & Garg, S. Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances. *Pharmaceutics* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030118> (2018).
63. Liichel, B. *et al.* The Synthesis of Micrometer-and Submicrometer-Size Spheres of Ordered Mesoporous Oxide MCM-41**. *Jpn. J. Appl. Phys* ~ vol. 14 (1996).
64. Romero, A. A., Alba, M. D., Zhou, W. & Klinowski, J. *Synthesis and Characterization of the Mesoporous Silicate Molecular Sieve MCM-48*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1997).
65. Rahmat, N., Abdullah, A. Z. & Mohamed, A. R. A Review: Mesoporous Santa Barbara Amorphous-15, Types, Synthesis and Its Applications towards Biorefinery Production. *Am J Appl Sci* **7**, 1579–1586 (2010).
66. Zhu, Y. *et al.* Preparation of novel hollow mesoporous silica spheres and their sustained-release property. *Nanotechnology* **16**, 2633–2638 (2005).
67. Asefa, T. & Tao, Z. Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology* vol. 25 2265–2284 Preprint at <https://doi.org/10.1021/tx300166u> (2012).
68. Ma, Y. *et al.* Large-pore mesoporous silica spheres: Synthesis and application in HPLC. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **229**, 1–8 (2003).

69. Dongyuan, Z., Jianglin, F., Quisheng, H., Nicholas, M. & Glenn H., F. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science (1979)* **279**, (1998).
70. Tang, F., Li, L. & Chen, D. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials* **24**, 1504–1534 (2012).
71. Zhu, Y. *et al.* Preparation of novel hollow mesoporous silica spheres and their sustained-release property. *Nanotechnology* **16**, 2633–2638 (2005).
72. Tanev, P. T. & Pinnavaia, T. J. *Mesoporous Silica Molecular Sieves Prepared by Ionic and Neutral Surfactant Templating: A Comparison of Physical Properties*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1996).
73. Igarashi, N. *et al.* Investigation of the factors influencing the structural stability of mesoporous silica molecular sieves. *Microporous and Mesoporous Materials* **59**, 43–52 (2003).
74. Zhao, D., Sun, J., Li, Q. & Stucky, G. D. Morphological control of highly ordered mesoporous silica SBA-15. *Chemistry of Materials* **12**, 275–279 (2000).
75. Naik, S. P., Elangovan, S. P., Okubo, T. & Sokolov, I. Morphology control of mesoporous silica particles. *Journal of Physical Chemistry C* **111**, 11168–11173 (2007).
76. Ojeda-López, R., Pérez-Hermosillo, I. J., Marcos Esparza-Schulz, J., Cervantes-Urbe, A. & Domínguez-Ortiz, A. SBA-15 materials: calcination temperature influence on textural properties and total silanol ratio. *Adsorption* **21**, 659–669 (2015).
77. Ambati, J. *et al.* Engineered silica nanocarriers as a high-payload delivery vehicle for antioxidant enzymes. *Acta Biomater* **8**, 2096–2103 (2012).
78. Niculescu, V. C. Mesoporous Silica Nanoparticles for Bio-Applications. *Frontiers in Materials* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00036> (2020).
79. Zhou, Y. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B* vol. 8 165–177 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007> (2018).
80. Zhang, Z. *et al.* Fabrication of effective mesoporous silica materials for emergency hemostasis application. *Silicon* **14**, 10521–10534 (2022).
81. Mohamed, S. S. Y. *et al.* Tranexamic acid-loaded mesoporous silica microspheres as a hemostatic material. *Mater Today Commun* **34**, (2023).
82. Frickenstein, A. N. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles: Properties and strategies for enhancing clinical effect. *Pharmaceutics* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040570> (2021).
83. Lin, Y. S. & Haynes, C. L. Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *J Am Chem Soc* **132**, 4834–4842 (2010).
84. Farjadian, F., Roointan, A., Mohammadi-Samani, S. & Hosseini, M. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment. *Chemical Engineering Journal* vol. 359 684–705 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.156> (2019).
85. Bindini, E. *et al.* Following in Situ the Degradation of Mesoporous Silica in Biorelevant Conditions: At Last, a Good Comprehension of the Structure Influence. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**, 13598–13612 (2020).

86. Margolis, J. *The Effect of Colloidal Silica in Blood Coagulation*. (1961).
87. Dai, C. *et al.* Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control. *Biomaterials* **30**, 5364–5375 (2009).
88. Chen, Z. *et al.* Blood clot initiation by mesoporous silica nanoparticles: Dependence on pore size or particle size? *J Mater Chem B* **4**, 7146–7154 (2016).
89. Baker, S. E. *et al.* Blood clot initiation by mesocellular foams: Dependence on nanopore size and enzyme immobilization. *Langmuir* **24**, 14254–14260 (2008).
90. Alyamani, A. & Lemine, O. M. *FE-SEM Characterization of Some Nanomaterial*. www.intechopen.com.
91. Thommes, M. *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **87**, 1051–1069 (2015).
92. Orio, M., Pantazis, D. A. & Neese, F. Density functional theory. *Photosynthesis Research* vol. 102 443–453 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9404-8> (2009).
93. C.-P. Sherman Hsu. Infrared Spectroscopy. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry* **249**, (1997).
94. De Blasio, C. Thermogravimetric Analysis (TGA). in *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology* 91–101 (Springer, Cham, 2019).
95. Aziz, M. & Ismail, A. F. X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). in *Membrane Characterization* 81–93 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00005-X.
96. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* vol. 235 337–351 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017> (2016).
97. Mohamed, S. S. Y. *et al.* Tranexamic acid-loaded mesoporous silica microspheres as a hemostatic material. *Mater Today Commun* **34**, (2023).
98. Basso, A. M., Nicola, B. P., Bernardo-Gusmão, K. & Pergher, S. B. C. Tunable effect of the calcination of the silanol groups of KIT-6 and SBA-15 mesoporous materials. *Applied Sciences (Switzerland)* **10**, (2020).
99. Van Der Voort, P. *et al.* Plugged hexagonal templated silica: A unique micro- and mesoporous composite material with internal silica nanocapsules. *Chemical Communications* **2**, 1010–1011 (2002).
100. Ojeda-López, R., Pérez-Hermosillo, I. J., Marcos Esparza-Schulz, J., Cervantes-Uribe, A. & Domínguez-Ortiz, A. SBA-15 materials: calcination temperature influence on textural properties and total silanol ratio. *Adsorption* **21**, 659–669 (2015).
101. Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts*. (2001).
102. Mazinani, B., Beitollahi, A., Masrom, A. K., Ibrahim, S. & Jamil, F. The effect of aging temperature on the pores of mesoporous SBA-15 silica. in *AIP Conference Proceedings* vol. 1502 272–279 (2012).
103. Stahle, L. & Wold, S. *Analysis of Variance (ANOVA)*.

104. Su, C. *et al.* The hierarchical porous structures of diatom biosilica-based hemostat: From selective adsorption to rapid hemostasis. *J Colloid Interface Sci* **651**, 544–557 (2023).
105. NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database (SRD 20), Version 5.0. <https://srdata.nist.gov/xps/SpectralIdentifier>.
106. Khair, M., Salsabila, R., Saputra, E. & Ardi. Microwave-Assisted Synthesis of Silica Gel from Clear Glass Waste for Moisture Control and Lead Ion Adsorption. in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* vol. 1521 (Institute of Physics, 2025).
107. Hemostats Market Size, Share & Industry Analysis, By Product . *Fortune Business Insight* (2025).
108. GVR Report cover Mesoporous Silica Market Size, Share & Trends Analysis Report . *Grand View Research* <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/mesoporous-silica-market> (2021).
109. Lewis, K. & Pay, J. Wound Irrigation. in *StatPearls* (StatPearls Publishing LLC, 2025).
110. Chartier, Yves. *Safe Management of Wastes from Health-Care Activities*. (World Health Organization, 2014).