

POLITECNICO DI TORINO

Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

**Bionanocompositi antibatterici
a matrice proteica**



Relatore

Prof.ssa Barbara Onida

Correlatore

Prof.ssa Francesca Bosco

Candidato:

Elena Letizia

Luglio, 2020

Acronimi

α-La	α -Lattoalbumina
β-Lg	β -Lattoglobulina
BET	Modello Brauner-Emmet-Teler
BJH	Modello Barret-Joyner-Helenda
BSA	Sieroalbumina bovina
EGF	Fattore di crescita dell'epidermide
FESEM	Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo
FGF	Fattore di crescita dei fibroblasti
Igs	Immunoglobuline
LF	Lattoferrina
LP	Lattoperossidasi
MEC	Matrice extracellulare
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Concentrazione minima inibitoria
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina
NPs	Nanoparticelle
PBS	Tampone fosfato salino

ROI	Region of interest
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Scanninig Electron Microscopy
SR	Swelling ratio
UFC	Unità formanti colonie
WP	Whey protein
WPC	Whey protein concentrate
WPH	Whey protein hydrolyzed
WPI	Whey protein isolate
XRD	Diffrattometria a raggi X
ZnO NPs	Nanoparticelle di ossido di zinco

Sommario

I materiali per *wound dressing* sono fondamentali nella guarigione delle ferite perché consentono di prevenire infezioni e di rigenerare i tessuti danneggiati. Nel *wound healing* si utilizzano una grande varietà di materiali che devono garantire protezione della cute da infezioni batteriche, assorbire gli essudati, mantenere un'adeguata umidità nel letto della ferita e consentire scambi gassosi con l'esterno.

Il lavoro di tesi è iniziato con uno studio sullo stato dell'arte delle principali strategie utilizzate nel *wound healing*. Sono state analizzate diverse tipologie di materiali impiegati nel *wound dressing* ed è stato messo in evidenza il potenziale valore dei nanomateriali in questo campo.

La parte sperimentale di questo lavoro si è basata sullo sviluppo di bionanocompositi antibatterici a matrice proteica per il *wound dressing*. I bionanocompositi sono costituiti da idrogeli a base di proteine di siero del latte in cui sono state incorporate nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO NPs) per garantire proprietà antibatteriche.

Le ZnO NPs sono state sintetizzate mediante un metodo di precipitazione chimica e successivamente caratterizzate attraverso la diffrazione di raggi X (XRD), l'analisi di fisisorbimento di azoto e la Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo (FESEM). Sono state caratterizzate allo stesso modo delle particelle di ZnO commerciale (Sigma-Aldrich), le quali hanno mostrato di avere un'area superficiale specifica 9 volte minore e volume medio specifico poroso di un ordine di grandezza inferiore rispetto allo ZnO di sintesi.

I film proteici sono stati realizzati a partire da un concentrato proteico di proteine del siero del latte mediante il metodo di *solvent casting*. Nella sospensione proteica a base acquosa, sono stati aggiunti una soluzione di NaOH per correggere il pH e sorbitolo o glicerolo come agenti plastificanti. Alla fine l'utilizzo di sorbitolo è stato scartato perché i film ottenuti presentavano elevata fragilità e non potevano essere staccati senza essere rotti dallo stampo su cui erano stati fatti colare.

Sono stati realizzati film funzionalizzati con ZnO commerciale, film non funzionalizzati e film multistrato composti da entrambi i tipi di film.

L'attività antimicrobica è stata valutata *in vitro* con il metodo di *Broth macro-dilution* sul batterio Gram-negativo *Escherichia coli* e sul Gram-positivo *Staphylococcus epidermidis* con sospensioni di ZnO commerciale in tampone fosfato salino (pH 7,4) a due diverse concentrazioni. Si sono riscontrati effetti antibatterici in entrambi i ceppi batterici con risultati migliori su *S.epidermidis*, tuttavia in nessuno dei due casi è stata determinata la concentrazione minima inibitoria (MIC).

Il lavoro può essere perfezionato effettuando prove antimicrobiche sullo ZnO di sintesi per poter confrontare l'effetto dei due diversi ZnO e riuscire a evidenziare l'influenza della dimensione e della forma delle nanoparticelle sull'attività antimicrobica. Altro obiettivo importante è la determinazione della MIC delle NPs eventualmente adottando altri metodi per la valutazione dell'attività antimicrobica.

Devono inoltre essere effettuate prove antimicrobiche sullo ZnO incorporato nei film proteici e deve essere valutato il rilascio di ioni Zn^{2+} sia dalle NPs in sospensione, sia dalle NPs e incorporate nei film.

Indice

Acronimi	I
Sommario	III
I Introduzione	2
1 La cute	5
1.1 Le ferite cutanee e il <i>wound healing</i>	8
II Stato dell'arte	13
2 Il <i>wound dressing</i>	15
2.1 Materiali utilizzati nel <i>wound dressing</i>	16
2.2 Idrogeli a base di proteine	21
2.2.1 Le proteine del siero del latte	22
2.2.1.1 Il ruolo degli agenti plastificanti	26
2.2.1.2 Effetti del pH nei film a base di WP	26
2.2.1.3 Proprietà fisico-chimiche dei film a base di WP	27
2.2.1.4 Proprietà biologiche dei film a base di WP . .	28
3 Agenti antimicrobici	31
3.1 Nanomateriali	34
3.2 L'ossido di zinco	36
3.2.1 Proprietà e strutture cristalline	37
3.2.2 Metodi di sintesi	37
3.2.2.1 Sintesi per precipitazione	39
3.2.3 Attività antimicrobica dello ZnO	40
3.2.4 Influenza della forma e della dimensione delle ZnO NPs	44

3.2.5	Bionanocompositi a base di ZnO	45
III	Ricerca sperimentale	47
4	Materiali e metodi	49
4.1	ZnO nanostrutturato	49
4.1.1	Materiali	49
4.1.2	Metodi per la caratterizzazione dello ZnO	49
4.1.2.1	Diffrazione a raggi X	49
4.1.2.2	Analisi di fisisorbimento di azoto	50
4.1.2.3	Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo	51
4.2	Valutazione dell'attività antimicrobica di ZnO commerciale . .	52
4.3	Materiali utilizzati nella preparazione di film a base di WP . .	54
5	Risultati e discussione	57
5.1	Ossido di zinco di sintesi	57
5.1.1	Sintesi dello ZnO nanostrutturato	57
5.1.2	Caratterizzazione dello ZnO nanostrutturato	59
5.1.2.1	Diffrazione a raggi X	59
5.1.2.2	Analisi di fisisorbimento di azoto	60
5.1.2.3	Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo	61
5.2	Ossido di zinco commerciale	63
5.2.1	Caratterizzazione di ZnO commerciale	63
5.2.1.1	Diffrazione a raggi X	63
5.2.1.2	Analisi di fisisorbimento di azoto	64
5.2.1.3	Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo	66
5.3	Film a base di proteine del siero del latte	68
5.3.1	Preparazione di film a base di WPC	68
5.3.2	Preparazione di film a base di WPC funzionalizzati con ZnO commerciale	69
5.3.3	Preparazione di film multistrato a base di WPC	70
5.3.4	Scelta dell'agente plastificante	71
5.4	Risultati della conta microbica	71
6	Conclusioni e sviluppi futuri	75

Ringraziamenti	81
Bibliografia	83

Parte I

Introduzione

Capitolo 1

La cute

La cute rappresenta l'organo più esteso del corpo umano e riveste interamente la sua superficie esterna. La sua massa equivale all'8% della massa corporea totale e la sua area superficiale varia in funzione del peso e dell'altezza dell'individuo: con un'altezza di 1,80 m e un peso di 95 kg equivale a circa 2,2 m². Il suo spessore varia fra 1,5 e 4 mm a seconda della zona presa in esame e in base allo stato di maturazione e di invecchiamento della cute [1].

Come si nota nella figura 1.1, la cute è costituita da tre strati: i) l'epidermide, un epitelio pavimentoso cheratinizzato; ii) il derma, un tessuto connettivo moderatamente denso; iii) l'ipoderma, costituito prevalentemente da tessuto adiposo. Elementi importanti da considerare sono anche gli annessi cutanei come le ghiandole sudoripare, le unità pilosebacee e le unghie.

L'epidermide ha uno spessore di circa 20-150 μm a seconda della regione corporea, ad esempio nelle piante dei piedi e nelle palme delle mani è più spessa [2]. Gli elementi cellulari più numerosi sono i cheratinociti. Man mano che si allontanano dallo strato basale dell'epidermide, i cheratinociti si rinnovano cambiando forma, fisiologia e funzione. L'epidermide è costituita da diversi strati cellulari, partendo dal più profondo si incontrano lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso, lo strato lucido e lo strato corneo [1].

Il derma ha uno spessore compreso fra 1 e 4 mm [2], è ricco di fibroblasti ed è composto da fibre di collagene e fibre elastiche che conferiscono resistenza meccanica alla cute. In particolare le fibre di collagene sono responsabili della resistenza alla trazione e le fibre elastiche del ritorno elastico. In questa porzione della cute sono presenti gli annessi cutanei, i vasi sanguigni e linfatici e i nervi.

L'ipoderma, che è lo strato più profondo, è costituito prevalentemente da tessuto adiposo. La componente adiposa costituisce un'importante riserva energetica e consente l'ammortizzamento di traumi e l'isolamento termico [1].

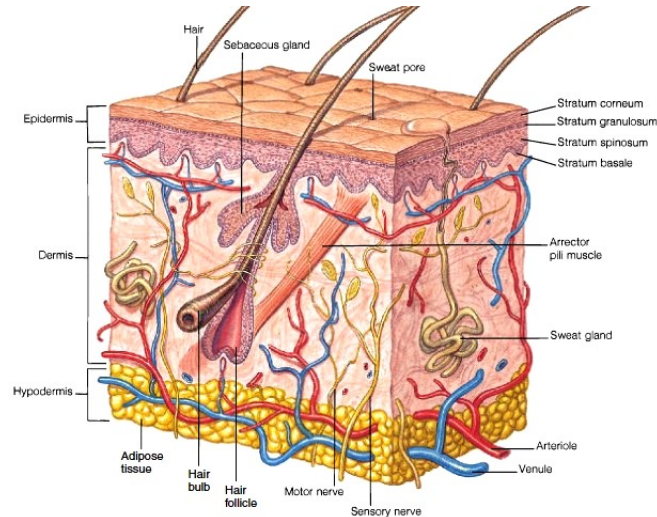


Figura 1.1: Struttura della cute [3].

La cute costituisce un'interfaccia multistrato fra il corpo umano e l'ambiente esterno ed espleta numerose funzioni. Le più importanti sono [2]:

- Funzione di barriera: offre protezione da microrganismi, agenti meccanici, chimici e termici e dalle radiazioni UV
- Funzione di riparazione e adattamento: è in grado di auto-ripararsi e di cambiare la sua struttura e composizione a seguito di ferite o esposizione a stress di tipo fisico (es. radiazioni UV), meccanico o termico
- Funzione sensoriale: grazie alla presenza di numerosi termocettori, meccanocettori e nocicettori è responsabile della percezione delle sensazioni di calore, pressione e dolore
- Funzione termoregolatrice: la produzione di sudore consente la dissipazione di calore e di conseguenza il mantenimento della temperatura corporea
- Funzione immunitaria: le cellule di Langerhans e i linfociti T presenti nell'epidermide contribuiscono alla protezione da agenti patogeni. Anche i cheratinociti hanno effetti immunomodulanti perché producono fattori solubili come citochine e chemochine [4].

Vista la sua funzione di interfaccia fra il corpo umano e l'ambiente circostante contaminato da numerosi microrganismi, la cute è colonizzata dal microbiota cutaneo. Il microbiota cutaneo è fondamentale perché protegge la pelle dalla colonizzazione di microrganismi patogeni, stimola il sistema immunitario cutaneo e contribuisce al mantenimento del pH acido della cute. Inoltre, è coinvolto in numerose patologie cutanee (acne, psoriasi, ecc) ed esercita un ruolo importante nelle infezioni delle ferite cutanee.

Un adulto sano è colonizzato approssimativamente da 10^8 - 10^{10} microrganismi che sono distribuiti in maniera differente sulla superficie corporea. La densità di microrganismi varia fra 10^2 cm^{-2} sulla schiena e sui polpastrelli e 10^6 cm^{-2} sulla fronte e le ascelle [5].

Il microbiota cutaneo è costituito da batteri, funghi (fra cui soprattutto lieviti) e virus. Gli organismi presenti in maggior quantità sono i batteri, si trovano almeno 19 *phyla* batterici e oltre 1000 specie batteriche sulla superficie della cute. I batteri presenti in maggior quantità sono quelli appartenenti a quattro *phyla* in particolare: *Actinobacteria* (52%), *Firmicutes* (24%), *Proteobacteria* (17%) e *Bacteroidetes* (7%). La composizione dei microrganismi varia a seconda delle regioni cutanee considerando la localizzazione anatomica e il contenuto di umidità [8].

Oltre alle dinamiche naturali che fanno sì che questi ecosistemi varino nel tempo e nello spazio, possono essere applicati due tipi principali di trattamenti alla cute che modificano la microflora e la densità delle cellule presenti. La prima tipologia riguarda l'utilizzo di agenti antimicrobici e ha come obiettivo la riduzione del numero di microrganismi sulla cute. Questo tipo di trattamenti è importante nel caso in cui siano presenti ferite croniche perché generi come *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* producono fattori di virulenza e compromettono la guarigione della ferita [6]. La formazione di biofilm ha un ruolo fondamentale nello sviluppo dei microrganismi e, di conseguenza, influenza anche la guarigione delle ferite. I biofilm sono costituiti da un'aggregazione di microrganismi in una matrice autoprodotta. Questi microrganismi comunicano tra loro mediante molecole segnale, secondo un processo noto con il nome di quorum sensing. La matrice è composta da polisaccaridi, lipidi e proteine; al suo interno essi possono far variare la loro attività metabolica e il loro tasso di proliferazione. [8]. In particolare, in uno studio condotto su topi, si è notato che la presenza di biofilm batterici di *Staphylococcus epidermidis*, un batterio normalmente presente sulla cute, ostacola la riepitelizzazione in una ferita cronica aperta [7]. I biofilm hanno inoltre effetti deleteri sulla migrazione dei fibroblasti [8]. L'altra tipologia di trattamenti che si possono applicare per modificare la

microflora cutanea, porta all'aumento del numero di alcuni microrganismi selezionati che sono ritenuti benefici per la cute. Questo è possibile grazie all'utilizzo di nutrienti, noti come prebiotici o anche microrganismi viventi, noti come probiotici [5].

1.1 Le ferite cutanee e il *wound healing*

Fra tutti i tessuti, la cute è il più soggetto a eventi che possono causare lesioni, abrasioni e ustioni. Un danno termico o meccanico può causare difetti e discontinuità sull'epidermide portando alla formazione di ferite cutanee.

Il *wound healing*, o guarigione delle ferite, non è un processo statico e avviene in quattro fasi che si sovrappongono: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento (Figura 1.2).

La prima di queste ha inizio subito dopo aver riportato la lesione e i fenomeni che avvengono sono la vasocostrizione e la formazione di un coagulo composto da trombociti e piastrine in una rete di fibrina. La rete di fibrina ristabilisce l'omeostasi e forma una barriera contro l'attacco dei microrganismi [9]. Inoltre, il coagulo e il tessuto della ferita rilasciano citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita fra cui il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) [10]. I fattori di crescita attraggono macrofagi, neutrofili, fibroblasti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, elementi essenziali per le fasi infiammatoria e proliferativa [11]. Una volta che il sanguinamento è controllato, e le cellule infiammatorie sono migrate nel sito della lesione, inizia la fase infiammatoria. L'essudato che viene prodotto in questa fase fornisce alla ferita un'adeguata umidità ed è il responsabile del trasporto di cellule infiammatorie [12] [13]. In ordine si ha infiltrazione di neutrofili, macrofagi e linfociti. I neutrofili puliscono la ferita dai microrganismi e dai residui cellulari e sono responsabili della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

I macrofagi rilasciano citochine, le quali promuovono la risposta infiammatoria richiamando leucociti; eliminano inoltre le cellule apoptotiche e vanno incontro a una transizione che stimola cheratinociti, fibroblasti e il processo di angiogenesi [10]. I macrofagi hanno un ruolo importante nella guarigione della ferita fra i 3 e i 5 giorni [11].

La proliferazione inizia dopo 48 ore dall'insorgere della ferita e può avere luogo fino al quattordicesimo giorno. Il ruolo di questa fase è quello di ridurre l'area della lesione e include i processi di angiogenesi, formazione di tessuto fibroso e riepitelizzazione [9]. I protagonisti di questa fase sono i fibroblasti

e le cellule endoteliali perché supportano la crescita dei capillari, la formazione del tessuto di granulazione e la formazione di collagene. I fibroblasti infatti, producono collagene, glicosamminoglicani e proteoglicani, che sono i maggiori componenti della matrice extracellulare (MEC).

A seguito della sintesi di matrice extracellulare e di una proliferazione efficace inizia il rimodellamento. Questa fase inizia due o tre settimane dopo l'insorgere della lesione e può durare anni. Il suo ruolo è riorganizzare il tessuto in modo che sia il più simile possibile a quello fisiologico. Durante questa fase infatti la densità di vasi sanguigni si riduce tornando alla normalità, la MEC si rimodella, avvicinandosi all'architettura del tessuto sano, e il tessuto di granulazione forma una cicatrice che si rimodella nel tempo.

Durante tutto il processo di guarigione la ferita subisce una contrazione mediata dai fibroblasti, i quali vanno incontro a un cambiamento fenotipico che li trasforma in miofibroblasti[9][10][11].

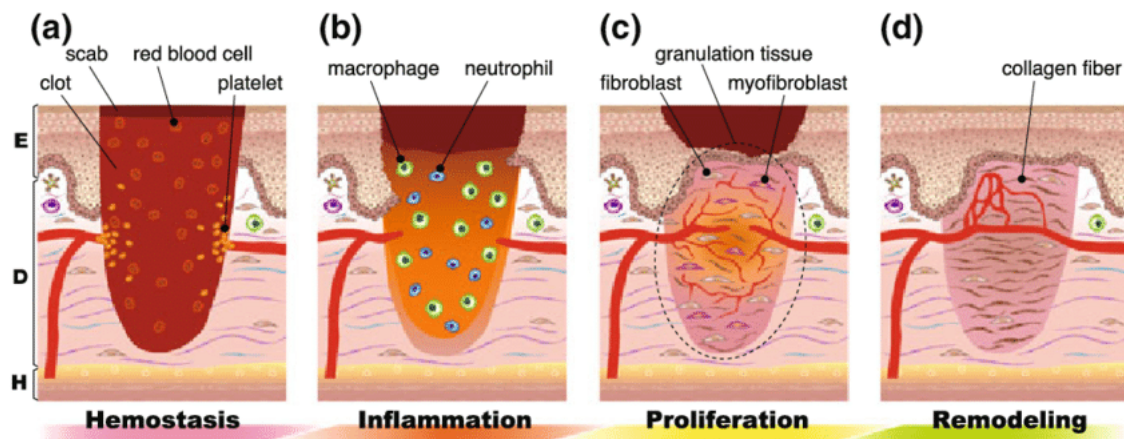


Figura 1.2: Fasi del *wound healing* [14]

Macroscopicamente, il tempo che impiega una ferita a guarire dipende da molti fattori fra cui la dimensione della ferita, la sua localizzazione, la sua profondità, l'età del paziente e la presenza di altre patologie locali o sistemiche. Alcuni fattori impediscono un *wound healing* efficace, fra questi è importante riportare la senescenza dei fibroblasti, una bassa attività mitogenica, la presenza di infezioni e la colonizzazione batterica [10].

Le ferite acute, a differenza di quelle croniche, seguono le fasi del *wound healing* in maniera ordinata e in tempi rapidi. Le ferite acute sono causate da ustioni, contusioni e traumi penetrativi, mentre tra le ferite croniche figurano le ulcere causate dal diabete, ulcere da decubito e ustioni di grande entità.

Le ferite croniche possono svilupparsi in qualsiasi momento da una ferita acuta, in particolare se dopo 12 settimane questa non mostra tendenza alla guarigione [13].

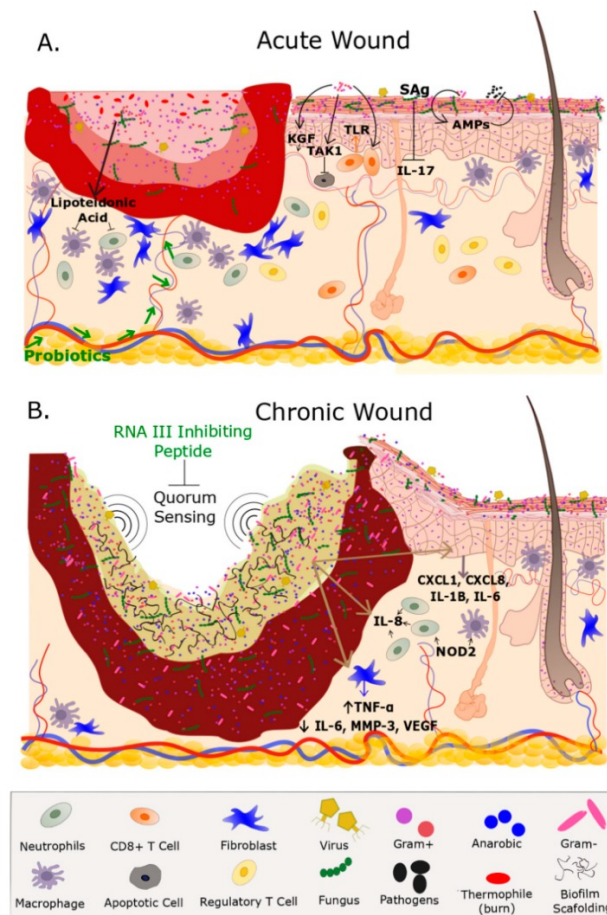


Figura 1.3: Confronto tra ferite acute (A) e ferite croniche (B) e loro guarigione [8]

Le ferite croniche sono più difficili da curare perché si forma il biofilm e una densa popolazione di microrganismi fra cui batteri anaerobi che impediscono agli antibiotici di raggiungere il letto della ferita. Inoltre, i fibroblasti non riescono a migrare a causa della presenza del biofilm. Come si può notare infatti dalla figura 1.3 si ha un'iperproliferazione dell'epidermide nella zona circostante la ferita. Nelle ferite croniche si ha quindi un basso numero di macrofagi e fibroblasti funzionanti: ciò impedisce la guarigione della ferita [8].

Per quanto riguarda il microbiota, sulle ferite acute si riscontrano per lo più

batteri Gram-positivi e la flora normale della cute, mentre le ferite croniche sono colonizzate da batteri Gram-negativi [15].

Per aiutare il processo di *wound healing* possono essere utilizzati diversi tipi di materiali come *wound dressing*.

Parte II

Stato dell'arte

Capitolo 2

Il *wound dressing*

Il *wound dressing*, o medicazione delle ferite, indica l'insieme di materiali e tecniche utilizzati per ricreare le condizioni favorevoli per il *wound healing*, proteggendo la cute da ulteriori traumi, e dall'invasione di microrganismi patogeni e favorendo la cicatrizzazione. I materiali utilizzati nel *wound dressing* dovrebbero essere in grado di [12][13][15][16]:

- Mantenere un adeguato livello di umidità sul letto della ferita: l'umidità del letto della ferita è importante per prevenire la morte cellulare per essiccazione, per creare un ambiente favorevole alla proliferazione dei fibroblasti e per permettere la riepitelizzazione grazie alla migrazione dei cheratinociti attraverso il tessuto di granulazione neoformato. Tuttavia, se l'umidità è troppo elevata, contribuisce all'aumento della colonizzazione batterica;
- Rimuovere l'essudato in eccesso: questo previene la macerazione del tessuto e permette di mantenere un'adeguata umidità e permeabilità all'ossigeno e al vapore;
- Proteggere la ferita da infezioni: questo è possibile assorbendo gli essudati, minimizzando la contaminazione esterna e rimuovendo il tessuto necrotico;
- Mantenere un adeguato scambio di gas;
- Garantire elasticità e flessibilità: si favorisce così l'adesione alla ferita e si semplifica il processo di applicazione o rimozione della medicazione senza causare traumi alla lesione;

- Garantire isolamento termico: insieme all'umidità è importante tenere sotto controllo la temperatura così che non ci sia una differenza importante fra temperatura corporea e temperatura della ferita;
- Facilitare la sintesi di collagene e la rigenerazione epiteliale rimuovendo i fattori che rendono il *wound healing* difficoltoso;
- Rimuovere il tessuto necrotico (sbrigliamento) dal fondo della lesione per aumentare la migrazione dei leucociti;
- Non causare allergie;
- Essere biocompatibili e biodegradabili:

I *dressing* dovrebbero inoltre avere una lunga *shelf-life*, essere esteticamente gradevoli e a basso costo. Inoltre, alcune medicazioni possono essere utilizzate come sistemi a rilascio di farmaco.

Nel momento in cui si seleziona il *dressing* da applicare, oltre agli aspetti citati precedentemente, si deve tenere conto della profondità della ferita e della quantità di essudato effettivamente presente [15]. Inoltre, i tipi di ferite sono numerosi e presentano sintomi, forme, dimensioni e spessori differenti tra loro. È quindi importante capire lo scopo che deve avere la medicazione nelle diverse applicazioni per ottimizzare il processo di *wound healing*.

2.1 Materiali utilizzati nel *wound dressing*

I *dressing* possono essere classificati in tradizionali e avanzati. I primi comprendono le garze, il cotone assorbente sterilizzato e i bendaggi e sono i più utilizzati a causa del loro basso costo e semplice manifattura. Presentano però numerose criticità perché nonostante offrano protezione fisica alla ferita, non la proteggono dalle infezioni. Inoltre, non riuscendo a mantenere un'adeguata umidità sul letto della ferita, rendono rischioso il processo di rimozione della medicazione perché la ferita potrebbe essersi asciugata e aver aderito al *dressing* [17][18]. I *dressing* tradizionali non riescono ad adattarsi ai cambiamenti della ferita o a fornire medicazioni in maniera controllata per migliorare il processo di guarigione. Sono quindi indicati nella cura di ferite acute che hanno un *wound healing* normale. Al contrario, le ferite croniche necessitano di medicazioni avanzate che favoriscano i processi riparativi della ferita [19]. A differenza dei *dressing* tradizionali, quelli avanzati prendono parte attivamente al processo di guarigione grazie all'attività biologica

esercitata da sostanze bioattive che possono essere incorporate nel *dressing*. Queste sostanze quando vengono rilasciate agiscono direttamente, pulendo o rimuovendo il tessuto necrotico, o indirettamente come agenti antimicrobici o come fattori di crescita che contribuiscono alla rigenerazione del tessuto. Nel trattamento di ferite croniche questo approccio è preferibile perché può migliorare gli esiti della terapia [20]. Si passa così da prodotti convenzionali che non riescono a mantenere un livello adeguato di umidità a materiali reattivi che invece la promuovono [19]. Le medicazioni avanzate sono disponibili sottoforma di idrocolloidi, schiume, film e idrogeli.

Le medicazioni avanzate possono essere inoltre classificate in primarie e secondarie. Le medicazioni primarie sono utilizzate a diretto contatto con il letto della ferita e contribuiscono al processo di guarigione direttamente. Sono utilizzate con gel e prodotti antibatterici che aiutano a mantenere la ferita pulita per evitare infezioni indesiderate. Le medicazioni secondarie servono invece a fissare e supportare le medicazioni primarie [21].

Nei prossimi paragrafi verranno descritti alcuni tipi di medicazioni avanzate.

Idrocolloidi Le medicazioni idrocolloidi si ottengono dalla combinazione di elastomeri e agenti gelificanti come la carbossimetilcellulosa, la pectina e la gelatina [22]. Si trovano sottoforma di fogli, polveri e paste. I fogli sono composti da due strati, uno interno colloidale e uno esterno impermeabile all'acqua. Sono permeabili al vapore acqueo e impermeabili ai batteri. Hanno proprietà di sbrigliamento e assorbono l'essudato. Quando vengono a contatto con l'essudato formano dei gel, offrono un ambiente umido che protegge il tessuto di granulazione e genera una leggera adesione [15]. Il gel che si viene a formare è opaco, impedisce quindi ispezioni della ferita [22]. Alcuni tipi di idrocolloidi come ad esempio il commercializzato Duoderm®, sono impermeabili all'ossigeno. Questa caratteristica sembra avere effetti come l'aumento dell'epitelizzazione, la sintesi di collagene e la diminuzione del pH della ferita che influisce sulla vitalità dei batteri. È stato comunque dimostrato che l'impermeabilità all'ossigeno è un vantaggio solo nelle prime fasi della guarigione delle ferite [23].

Gli idrocolloidi si utilizzano in ferite che producono una discreta quantità di essudati come le ferite traumatiche, le piaghe da decubito e ustioni di lieve entità. Sono inoltre indicati per l'uso pediatrico perché non causano dolore durante la rimozione [22] che di norma deve avvenire ogni 2-4 giorni [15].

Schiume Le medicazioni in schiuma sono semipermeabili e composte da una parte interna di poliuretano o silicone e uno strato esterno semi-occlusivo. La parte interna è ciò che conferisce a questi *dressing* la capacità di assorbire quantità medio-alte di essudato [17][15]. Lo strato esterno è permeabile al vapore, può avere differenti velocità di trasmissione dell'umidità in base alla manifattura e al tempo stesso riesce a proteggere la ferita dalla penetrazione di batteri [15]. I *dressing* in schiuma sono termicamente isolanti, mantengono la ferita umida ed evitano danni alla ferita nel momento della rimozione [17]. Possono essere aderenti o non aderenti, in quest'ultimo caso devono essere associati a medicazioni secondarie [18]. Si utilizzano nelle ulcere degli arti inferiori, in ferite che producono quantità medio-alte di essudati e ferite al di sopra di prominenze ossee [15][22]. Quando le medicazioni hanno assorbito una quantità eccessiva di essudato devono essere sostituite [15]. Sono sconsigliate per ferite e cicatrici asciutte perché la loro efficacia è basata sulla presenza di essudati [22].

Film semipermeabili I film semipermeabili sono composti da poliuretano poroso, sottile, aderente e sono utilizzati come medicazione primaria [18]. Permettono il passaggio di ossigeno, anidride carbonica e vapore, mentre sono impermeabili ai fluidi e ai batteri [17][18]. Come gli idrocolloidi e gli idrogeli consentono lo sbrigliamento autolitico.

I film sono elastici e flessibili, si adattano quindi a qualsiasi superficie su cui vengono applicati e si possono utilizzare sulla cute in corrispondenza delle articolazioni [18]. Sono inoltre trasparenti, è perciò possibile l'ispezione della ferita anche senza rimuovere la medicazione. Dato il loro basso costo e la loro versatilità, i film poliuretanici vengono utilizzati frequentemente per coprire ferite chirurgiche [24]. Si utilizzano in generale sulle ferite superficiali che producono basse quantità di essudato [15]. La loro natura occlusiva infatti, fa sì che l'essudato si raccolga al di sotto della medicazione, portando alla macerazione dei margini della ferita [24].

Idrogeli Un idrogelo è una rete tridimensionale di polimeri reticolati insolubili in acqua con capacità di rigonfiamento o *swelling*. Questi gel tridimensionali presentano una notevole capacità di assorbire acqua grazie alla loro struttura porosa e idrofilica. Riescono ad avere un contenuto d'acqua fino al 99,5% grazie alla presenza di gruppi funzionali idrofilici (-OH, -CONH, -CONH₂-COOH, -SO₃H) al loro interno [19][25]. È proprio la loro capacità di andare incontro a *swelling* e *de-swelling* che li rende interessanti nel campo della medicina rigenerativa, del rilascio controllato di farmaco e della

gestione delle ferite. Nel *wound dressing* si utilizzano idrogeli in tre forme diverse [19]:

- Garze impregnate: impiegate per ferite necrotiche profonde;
- Idrogeli in fogli: impiegati per trattare ulcere, piaghe da decubito, ustioni di primo e secondo grado, incisioni chirurgiche. Possono essere tagliati secondo la forma e la dimensione della ferita. Sono considerati dei *dressing* avanzati perché facilitano il *wound healing* perché hanno un effetto lenitivo, mantengono umido il letto della ferita e fanno da barriera fisica fra la lesione e l'ambiente circostante. L'effetto lenitivo e di raffreddamento fanno sì che la temperatura della ferita diminuisca [22]. Altra caratteristica importante è la trasparenza che permette il monitoraggio del processo di guarigione;
- Idrogeli amorfi: non avendo una forma prestabilita, si adattano facilmente alla forma della ferita e possono essere inseriti nella ferita tramite l'utilizzo di un applicatore.

I *dressing* in idrogelo sono adatti a tutti e quattro gli step del *wound healing*, sono inoltre non irritanti, non reattivi con il tessuto biologico e permeabili ai metaboliti [22]. Una limitazione degli idrogeli è quella di non essere aderenti e di aver bisogno di una medicazione secondaria per rimanere *in situ* [15]. Questo è al tempo stesso un vantaggio perché permette la rimozione dei *dressing* facilmente, senza causare dolore o traumi alla ferita [19]. Data la loro bassa resistenza, di norma sono ibridizzati con altri polimeri attraverso interazioni chimiche e fisiche [23].

Gli idrogeli possono essere preparati a partire da polimeri sintetici o naturali. Gli idrogeli sintetici mostrano alte capacità di assorbimento e resistenza meccanica maggiore, la loro applicazione è però limitata dalla loro bassa biocompatibilità e biodegradabilità. Inoltre nella struttura del gel possono essere presenti monomeri che non hanno preso parte alla reazione di polimerizzazione che possono causare tossicità [26]. Anche alcuni prodotti di degradazione dei polimeri possono essere dannosi. A questa categoria appartengono gli idrogeli a base di glicole polietilenico (PEG), alcol polivinilico (PVA) e polivinilpirrolidone (PVP) [19].

Gli idrogeli di origine naturale sono invece biocompatibili, biodegradabili e con proprietà meccaniche regolabili. A questa categoria appartengono gli idrogeli a base di polisaccaridi e quelli a base di proteine [26]. I polisaccaridi che si utilizzano nel *wound healing* sono il chitosano, la cellulosa, l'alginato e l'amido [27]. L'alginato è molto utilizzato come materiale per *wound dressing*.

È un polisaccaride idrofilico e biocompatibile presente nelle pareti cellulari delle alghe brune [12]. I *dressing* in alginato derivano dai sali di sodio e calcio dell'acido alginico e contengono elevate quantità di acido mannuronico e acido glucuronico [18]. Quando la medicazione viene applicata alla ferita gli ioni calcio vengono scambiati con gli ioni sodio dell'essudato, formando così un gel di alginato che è altamente assorbente e limita quindi la quantità di essudato e la contaminazione batterica [15][22]. Gli alginati possono infatti assorbire una quantità di liquido pari a 15-20 volte il loro peso. Ciò li rende adatti alle ferite che producono grandi quantità di essudati. Al contrario, utilizzarli su ferite con scarso essudato sarebbe dannoso perché potrebbero rimanere fibre non gelatinose che potrebbero essere incorporate nel tessuto di granulazione e rendere la rimozione del *dressing* difficile e dolorosa [18][24].

Alcuni fra gli idrogeli proteici sono a base di cheratina, seta, soia, zeina, albumina, caseina e proteine del siero del latte. Esistono anche idrogeli ibridi che si ottengono combinando gli idrogeli sintetici con quelli naturali. Questa classe di idrogeli integra le qualità dei due gruppi di materiali e ne modifica le proprietà chimiche, fisiche e biologiche per adattarli a specifiche applicazioni [26].

Gli idrogeli possono essere preparati con reticolazioni chimiche o fisiche. La natura della reticolazione determina la maggiorparte delle proprietà fisico-chimiche degli idrogeli. Fra i metodi di reticolazione fisica si hanno interazioni ioniche e di Van der Waals, legami idrogeno fra catene e formazione di copolimeri anfifilici. Anche i cristalli possono agire come centri fisici di reticolazione delle catene polimeriche. Questo tipo di reticolazione avviene in condizioni blande di temperatura e pressione e con semplici procedure di purificazione perché non si utilizza nessun agente chimico reticolante. Proprio per questo si ottengono idrogeli non tossici e biocompatibili [19].

La reticolazione chimica prevede la formazione di legami covalenti che rendono la rete tridimensionale molto resistente. La sintesi può avvenire tramite polimerizzazioni a catena, irraggiamento utilizzando radiazioni ad alta energia (raggi gamma o fasci elettronici), reticolazioni UV e reticolazioni per reazioni chimiche fra gruppi funzionali laterali. Queste ultime avvengono tramite la formazione di legami covalenti fra i gruppi funzionali (-COOH, -NH₂, OH) presenti sui polimeri idrofilici [19].

Per ottenere gli idrogeli ibridi si effettua un graffaggio di polimeri naturali su quelli sintetici o viceversa. I polimeri aggraffati reticolano fra loro formando la rete tridimensionale. In alternativa si può far reticolare una miscela di polimeri naturali e sintetici [26].

Dato che la velocità di degradazione dell'idrogelo può essere modificata,

il materiale può essere utilizzato come *carrier* di sostanze biologicamente attive [17]. Ciò li rende interessanti per creare medicazioni biocomposite che rilascino sostanze antimicrobiche per migliorare il processo di *wound healing* e proteggere le ferite dal rischio di infezioni.

2.2 Idrogeli a base di proteine

Negli idrogeli proteici le proteine sono di origine naturale, o preparate per vie biosintetiche [26]. Le proteine possono essere classificate in fibrose o globulari in base alla loro struttura terziaria e hanno forma, dimensione, funzioni e solubilità differenti. Le proteine fibrose sono caratterizzate da un unico tipo di struttura secondaria e le loro catene polipeptidiche sono disposte in fasci paralleli tra loro. Ciò conferisce forza e mobilità alla proteina. Sono inoltre insolubili in acqua. Le proteine globulari invece sono caratterizzate da più tipi di strutture secondarie e sono costituite da lunghe catene polipeptidiche ripiegate in strutture sferiche grazie alla formazione di ponti disolfuro, legami idrogeno, legami ionici e legami idrofobici fra gli amminoacidi della catena polipeptidica. Sono solubili in acqua. Una delle proteine che appartiene al primo gruppo è il collagene. Al secondo gruppo appartengono invece le proteine della soia, del glutine di frumento e del siero del latte.

Gli idrogeli a base di proteine mostrano migliori proprietà meccaniche rispetto a quelli polisaccaridici grazie alla capacità di formare un grande numero di legami intermolecolari [28]. Le proteine possono essere utilizzate per formare idrogeli grazie a trattamenti enzimatici, fisici come raffreddamento, riscaldamento o alta pressione e chimici come acidificazioni e aggiunta di sali. L'*unfolding* della struttura della proteina e l'aggregazione nella rete del gel costituiscono il principale processo di gelificazione. La rete del gel può essere stabilizzata utilizzando reticolazioni covalenti o non covalenti (interazioni elettrostatiche, idrofobiche, legami idrogeno). Tutte le proteine possono reticolare specialmente grazie a due gruppi funzionali: i gruppi carbossilici e i gruppi amminici che si trovano rispettivamente all'estremità C-terminale e N-terminale [26] e si uniscono per formare il legame peptidico attraverso una reazione di condensazione. Un altro meccanismo di reticolazione delle proteine è la formazione di ponti disolfuro (-S-S-) fra i gruppi tiolici (-SH) presenti nei residui di cisteina. Per modificare la resistenza meccanica e la stabilità termica di un idrogelo a base di proteine si può far reticolare chimicamente, modificando le sue proprietà meccaniche e la velocità di degradazione [26].

Gli idrogeli a base di proteine sono molto utilizzati nel *food packaging* grazie alla loro abilità di formare film facilmente, grazie al fatto che consentono di modificare le proprietà meccaniche e grazie alla loro trasparenza e al fatto che prevengano il passaggio di umidità e di gas. Offrono inoltre protezione fisica al prodotto e se caricati con agenti antimicrobici, sono protettivi nei confronti di microrganismi. [28]. Tutte queste caratteristiche sono ugualmente auspicabili in un materiale utilizzato nel *wound dressing*. Gli idrogeli hanno interessanti applicazioni anche come *carriers* nel *drug delivery* e per questo il comportamento di swelling degli idrogeli è stato ampiamente studiato variando la concentrazione di *whey proteins* (WP), il valore del pH del medium di *swelling*, il pH della soluzione di WP prima della gelificazione e la presenza di coating di alginato sulla superficie degli idrogeli a base di WP. La presenza di questo *coating* fa diminuire notevolmente la diffusione del solvente e il rilascio della sostanza incapsulata nell'idrogelo [29].

Il metodo più utilizzato per la realizzazione degli idrogeli proteici è l'evaporazione di solvente. Il metodo di evaporazione di solvente, o *solvent casting*, parte dalla preparazione di una sospensione acquosa di proteine alle quali si aggiunge un agente plastificante. La sospensione dalla quale si formerà il film, viene stesa su una superficie come ad esempio la piastra di Petri e si lascia evaporare il solvente in condizioni ambiente o con il controllo dell'umidità relativa. I film possono essere essiccati anche usando aria calda, infrarossi o microonde. La morfologia, la funzione di barriera e le proprietà meccaniche degli idrogeli sono fortemente influenzate dal metodo di essiccazione [26].

2.2.1 Le proteine del siero del latte

Il latte contiene due famiglie di proteine: le caseine e le proteine del siero del latte, in inglese *whey proteins* (WP). Le prime costituiscono l'80% in peso del totale, sono insolubili in acqua e si ottengono dal latte scremato tramite precipitazione isoelettrica o tramite coagulazione del caglio. In entrambi i casi come sottoprodotto di queste reazioni si ottiene il siero del latte [30], il quale contiene circa la metà delle sostanze solide presenti originariamente nel latte. Fra queste sostanze si trovano il lattosio, le vitamine solubili in acqua, i minerali e le proteine del siero del latte. Le proteine del siero del latte appartengono alla famiglia delle proteine globulari, hanno un contenuto notevole di alfa eliche e gli amminoacidi acidi e basici, e quelli idrofili e idrofobici al loro interno, sono distribuiti equamente nella catena polipeptidica [31].

Le WP si ottengono da processi di ultrafiltrazione, di centrifugazione o di filtrazione a seguito di precipitazione termica. Le caratteristiche dei prodotti a base di WP dipendono dalla materia prima del siero, dall'origine del latte (bovino, caprino o ovino), dalla collocazione nella stagione, dal tipo di alimentazione e dalla fase della lattazione [30].

Si utilizzano per incapsulare molecole nei sistemi a rilascio e come microsfeere per ritardare il rilascio di composti bioattivi permettendo di raggiungere l'intestino proteggendoli dal pH acido dello stomaco. [32]. La produzione mondiale di queste proteine è aumentata molto grazie ai miglioramenti nelle tecnologie a membrana e a scambio ionico che hanno reso più facile il recupero di WP con le caratteristiche desiderate [30].

Le WP vengono classificate in proteine del siero concentrate (WPC), proteine del siero isolate (WPI) e proteine del siero idrolizzate (WPH). Le WPC hanno una concentrazione tipicamente compresa fra il 50 e l'85 % su base secca, le WPI fra il 90 e il 98% [31]. Le WPH derivano dall'idrolisi del legame peptidico e sono quindi costituite da un numero maggiore di peptidi corti e ciò le rende più stabili termicamente, meno allergeniche, con proprietà emulsionanti e di gelificazione diverse e più costose [33].

Fra le proteine del siero del latte le più importanti sono:

- La **β -Lattoglobulina (β -Lg)**. Questo tipo di proteina rappresenta il 10-12% del totale delle proteine del latte e circa il 50% delle WP. È sintetizzata dalla ghiandola mammaria ed è presente nel latte di gran parte dei mammiferi, ma non in quello umano. Contiene 162 residui amminoacidici e ha un peso molecolare di 18,3 kDa [34]. La presenza di gruppi tiolici (-SH) nei residui di cisteina permette la stabilizzazione della struttura quaternaria delle β -lattoglobuline. Inoltre, la presenza di un gruppo -SH libero in posizione CYS-121 è fondamentale per la gelificazione delle WP e la formazione di film. In seguito alla denaturazione termica che avviene a 78 °C in un tampone fosfato (0,7 M, pH 6), si ha polimerizzazione, formazione di ponti disolfuro e di legami non covalenti come legami a idrogeno e interazioni di Van der Waals [36].
- La **α -Lattoalbumina (α -La)**. La α -lattoalbumina nel latte bovino rappresenta il 3,5% del totale delle proteine del latte e il 20% delle WP ed è sintetizzata dalla ghiandola mammaria. Nel latte umano, vista la mancanza della β -Lg, rappresenta la proteina più abbondante [34]. Contiene 123 residui amminoacidici, ha un peso molecolare di 14,2 kDa e il suo punto isoelettrico si trova a pH 4,8. Ciò rende la proteina caratteristica per la sua acidità. Fra i 123 amminoacidi si ha una grande

quantità di amminoacidi essenziali e quattro residui di triptofano che fanno sì che la α -La venga considerata un nutraceutico [31].

La struttura della α -La è stabilizzata dalla presenza di quattro legami disolfuro e dalla presenza di un sito affine agli ioni calcio che serve a tenere insieme i due domini della proteina: un'alfa elica e un foglietto beta. La presenza del calcio è fondamentale per il *refolding* della proteina in caso di denaturazione [35]. La digestione della α -La da parte di enzimi proteolitici come la tripsina e la chimotripsina permette la formazione di peptidi battericidi soprattutto nei confronti di batteri Gram-positivi. Questa proteina ha anche un effetto soppressivo nei confronti del rilascio di citochine proinfiammatorie [31].

- La **sieroalbumina bovina (BSA)** . La BSA nel latte bovino rappresenta il 1,5% del totale delle proteine del latte e l'8% delle WP. Non è sintetizzata dalla ghiandola mammaria, ma è trasportata nel latte da una fuoriuscita dal flusso sanguigno [34]. È costituita da 582 amminoacidi e ha quindi un peso molecolare di 66,267 kDa [31]. Quando non è denaturata è in grado di legarsi agli acidi grassi e a ioni metallici [34]. Come le β -Lg la gelificazione inizia con la formazione di un ponte di disolfuro. Dal punto di vista biologico presenta proprietà antitumorali, antiossidanti ed è fonte di amminoacidi essenziali [31].
- Le **immunoglobuline (IGs)**. Le immunoglobuline, o anticorpi, nel latte e nel colostro sono componenti importanti per il sistema immunitario. Le immunoglobuline principali nel latte sono le IgG, le IgA e le IgM le quali hanno rispettivamente un peso molecolare di circa 160 kDa, circa 370 kDa e 900-1000 kDa [34].

Fra le WP si trovano altre proteine presenti in concentrazioni minori, al massimo di 300 mg/L. Fra queste ci sono la lattoferrina (LF), l'osteopontina e la lattoperossidasi.

- La lattoferrina (LF): è importante per le sue proprietà antibatteriche e batteriostatiche. Può essere considerata batteriostatica grazie alla sua abilità di legare il ferro libero che è fondamentale per la crescita dei batteri. La sua attività antimicrobica previene lo sviluppo dell'infiammazione e i conseguenti danni ai tessuti dovuti al rilascio di citochine proinfiammatorie e di specie reattive dell'ossigeno (ROS)[31].
- L'osteopontina: svolge numerosi ruoli nell'angiogenesi, nell'infiammazione, nell'apoptosi e nel *wound healing* [34]. L'osteopontina è anche

presente come proteina della matrice extracellulare ed è coinvolta in molti processi cellulari. Durante la fase infiammatoria nel *wound healing*, l'osteopontina è espressa dai neutrofili e i macrofagi, provoca il reclutamento e la proliferazione di fibroblasti e aiuta la deposizione di MEC e collagene [37].

- La lattoperossidasi (LP): costituisce lo 0,5% delle proteine del siero del latte [34]. Il sistema LP-tiocianato-perossido di idrogeno agisce contro diversi microrganismi: batteri Gram-negativi e Gram-positivi, virus e funghi [31].

Oltre alle proprietà menzionate precedentemente, le proteine del siero del latte sono in grado di formare film. I tratti che distinguono le WP da altri biopolimeri utilizzati per la formazione di film sono la loro natura anfifilica, le cariche elettrostatiche e il cambiamento nella loro conformazione a seguito di denaturazione. Fra i fattori che influenzano la conformazione delle WP ci sono la densità di carica e l'equilibrio fra sostanze idrofiliche e idrofobiche

Affinché si formi un film è necessario che avvenga la gelificazione. La gelificazione è il risultato di interazioni chimiche e fisiche che si creano fra le molecole delle WP. Fra le interazioni chimiche si ha la formazione di ponti disolfuro, fra quelle fisiche le interazioni elettrostatiche e idrofobiche. Per destabilizzare le proteine si possono aggiungere sostanze chimiche, cambiare la carica netta, aumentare la pressione idrostatica, riscaldare o raffreddare. Questi processi inducono la denaturazione delle proteine portandole ad aggregarsi e a formare un gel [30].

La formazione di film a base di WP si basa sulla denaturazione termica delle proteine in soluzione acquosa fra 80°C e 90°C. Il calore modifica la struttura tridimensionale delle proteine, causando l'esposizione di gruppi tiolici interni alla struttura e gruppi idrofobici. Si promuove così la formazione di legami disolfuro intermolecolari e interazioni idrofobiche al momento dell'essiccamento. A seguito della denaturazione termica, si procede con la disidratazione che di norma avviene fra i 21 °C e i 23°C e al 50% di umidità. Il processo di essiccamento deve essere controllato perché cambiamenti nelle condizioni porterebbero alla variazione della cinetica e del meccanismo di formazione dei film [30].

Per applicazioni nel *food packaging* è consigliabile incorporare nei film a base di WP, degli agenti antimicrobici che inibiscano la crescita di microrganismi patogeni. Di solito queste sostanze vengono aggiunte durante la formazione della matrice, ma a volte la loro efficienza potrebbe diminuire a

causa di interazioni con componenti della matrice stessa [30]. La scelta di incorporare agenti antimicrobici nei film a base di WP è condivisibile anche per applicazioni nel *wound healing* perché la ferita, durante la rigenerazione, deve essere protetta dall'attacco di patogeni.

2.2.1.1 Il ruolo degli agenti plastificanti

Per la formazione dei film è necessario incorporare degli agenti plastificanti che sono in grado di modificare le proprietà chimiche, fisiche e meccaniche dei film, la loro forza di adesione e la loro permeabilità. In particolare, l'aggiunta di agenti plastificanti consente di diminuire la fragilità dei film rendendoli più flessibili. Anche l'acqua potrebbe essere utilizzata a questo scopo. Il rischio è però che venga persa facilmente durante la disidratazione in condizioni di bassa umidità relativa [30].

Di norma sono utilizzati per questo scopo dei polioli, come il sorbitolo e il glicerolo che formano legami idrogeno. Si hanno così interazioni con il polimero che interrompono i legami polimero-polimero e portano all'aumento dello spazio intermolecolare. Le molecole dell'agente plastificante si posizionano fra quelle del polimero influenzando così la flessibilità, la durezza e la resistenza alla lacerazione [30].

La resistenza meccanica dei film a base di WPI diminuisce all'aumentare della concentrazione di plasticizzante. L'effetto del plasticizzante sulla deformazione del film è maggiormente visibile nel caso in cui si utilizzi glicerolo piuttosto che sorbitolo. La maggiorparte dei plasticizzanti è idrofilico e igroscopico. Ciò permette l'assorbimento di grandi quantità d'acqua. L'abilità di legarsi all'acqua e l'effetto plasticizzante dipendono dalla forma e dalla dimensione delle molecole, dal numero di atomi di ossigeno e dalla loro distanza all'interno della molecola. L'aggiunta di plasticizzanti idrofili aumenta inoltre la permeabilità dei film ai gas. L'effetto è visibile soprattutto in condizioni di elevata umidità relativa [30].

2.2.1.2 Effetti del pH nei film a base di WP

La gelificazione delle proteine dipende dalla carica netta che a sua volta è dipendente dal pH dell'ambiente dove avviene la gelificazione. Se il pH è vicino al punto isoelettrico (pI) della maggiorparte delle WP (intorno a 5), la carica netta si avvicina a zero e si ha aggregazione. A valori di pH maggiori o minori, invece, si manifesta una carica netta che provoca repulsione. Questi effetti sono visibili in figura 2.1 [30].

Il pH ha anche effetti sullo *swelling ratio* (SR). Lo SR si valuta negli idrogeli per quantificare il valore di liquido che può essere assorbito dal materiale e si calcola dopo aver misurato la massa del gel bagnato (m_w) e del gel secco (m_d).

$$SR = (m_w - m_d)/m_d \quad (2.1)$$

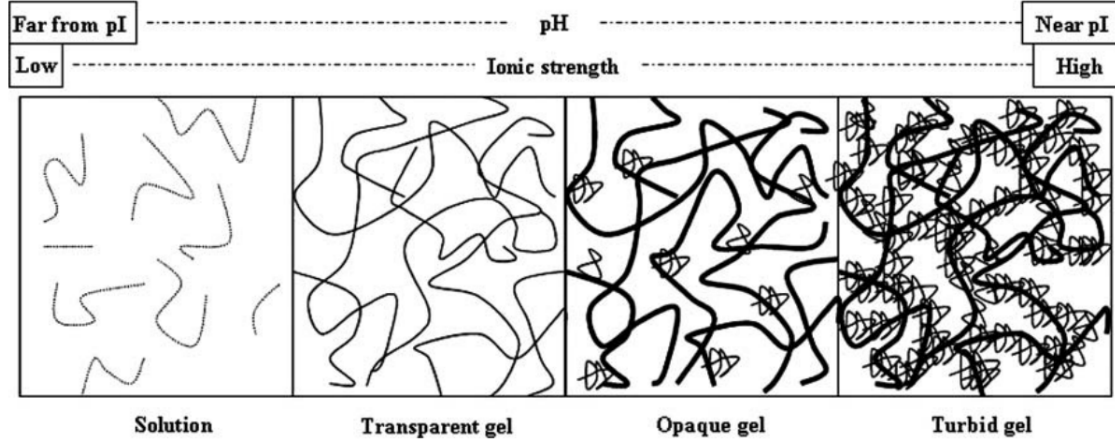


Figura 2.1: Influenza del pH e della forza ionica nella gelificazione dei film [30]

Lo swelling dell'idrogelo è regolato dalla ionizzazione dei gruppi carichi negativamente. Quando il pH è minore del pI, si ha un piccolo aumento dello SR perché ci sono pochi gruppi amminici deprotonati nelle catene peptidiche e il numero di cariche positive è limitato. Quando il pH è vicino al pI non c'è repulsione elettrostatica fra le catene e si ha il minimo valore di SR. Quando invece il pH è maggiore del pI, si ha un numero elevato di gruppi carichi negativamente che porta a un aumento dello SR perché un valore elevato di pH implica un maggiore numero di cariche superficiali e una maggiore forza repulsiva. Questo comportamento è illustrato nella figura 2.2 tratta dal lavoro di Gunasekaran et al. [25]. Nel lavoro è stata valutata la variazione dello SR al variare pH del medium dove è avvenuto lo *swelling* (*swelling medium*), mantenendo costante la concentrazione di WPC al 15%.

2.2.1.3 Proprietà fisico-chimiche dei film a base di WP

Per capire in quale ambito possono essere utilizzati i film a base di WP si devono valutare le proprietà di barriera (permeabilità al vapore e ai gas), le

proprietà meccaniche e ottiche dei film.

- Permeabilità al vapore: la natura idrofila delle proteine del siero del latte limita la capacità di formare film con buone proprietà di barriera per l'umidità. Al tempo stesso, la permeabilità al vapore, evita la condensazione di vapore al di sotto del film, che potrebbe essere causa di crescita e proliferazione di microrganismi. Per ridurre la permeabilità al vapore si potrebbero aggiungere composti idrofobici all'interno della struttura del film.
La presenza di agenti plasticizzanti aumenta la permeabilità all'acqua. Il glicerolo mostra le migliori proprietà di barriera all'umidità [30].
- Permeabilità all'ossigeno: è minore rispetto ai film sintetici, ma maggiore rispetto ai film a base di collagene, proteine della soia e del glutine di frumento [30]. Una bassa permeabilità all'ossigeno è però vantaggiosa nelle fasi iniziali del *wound healing* perché permette di aumentare l'epitelizzazione e la sintesi di collagene [23].
- Proprietà meccaniche: dipendono dalle condizioni in cui si forma il film. In assenza di agenti plastificanti i film sono fragili e rigidi. Aggiungendo plasticizzanti diventano più flessibili e deformabili, diventando più adattabili a diverse superfici [30].
- Proprietà ottiche: hanno maggiore trasparenza rispetto ad alcuni tipi di film a base di polimeri sintetici. L'aggiunta di altri composti potrebbe però diminuire la trasparenza dei film. Ciò non avviene nel caso di aggiunta di glicerolo perché è un composto trasparente [30].

2.2.1.4 Proprietà biologiche dei film a base di WP

I film a base di WP sono ottimi candidati per applicazioni biomediche perché sono biodegradabili, biocompatibili e non tossici nei confronti di fibroblasti e cheratinociti. In uno studio di Gilbert et al. [38] sono state effettuate colture cellulari di fibroblasti e cheratinociti al di sopra di film a base di proteine del siero del latte. Sono stati testati due tipi diversi di film: uno a base di WPI con dietilenglicole (DEG), etilenglicole (EG) e glicerolo come agenti plastificanti, l'altro a base di β -lattoglobuline con glicerolo come agente plastificante.

I risultati di questo studio hanno dimostrato che i cheratinociti e i fibroblasti aderivano indifferentemente sul substrato di controllo e sui substrati a

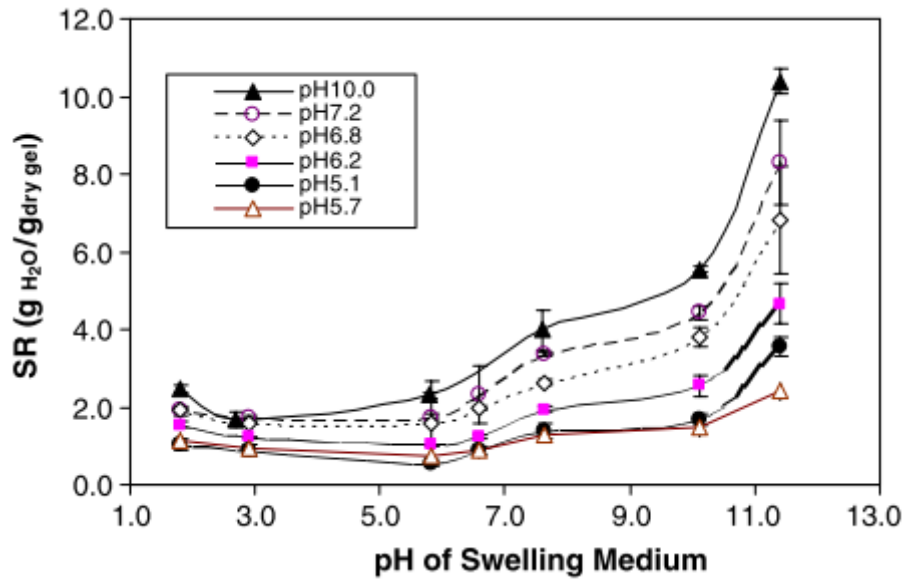


Figura 2.2: SR di gel a base di WPC con swelling medium a pH (5.1, 5.7, 6.2, 6.8, 7.2, e 10.0) e concentrazione di WPC al 15% [25].

base del film proteico dimostrando la loro non tossicità. Si è osservata anche crescita e proliferazione di fibroblasti e cheratinociti. Questi ultimi iniziavano anche a produrre una struttura stratificata, ottenendo una morfologia simile a quella cutanea. Risultati simili si erano ottenuti utilizzando come substrato proteine della matrice extracellulare denaturata, sottolineando così che questi film possono essere utilizzati come superficie per le colture cellulari.

Lo studio è stato condotto da Rouabhia et al. [32] e sono stati ottenuti risultati positivi anche nelle valutazioni *in vivo*. In particolare dopo 15 giorni dall'applicazione del film sul ceppo Balb/C di topi da laboratorio, si è notato che non si era formato tessuto necrotico. Ciò è un'ulteriore prova della non tossicità di questi materiali. È stata valutata anche la biodegradabilità dopo 30 e 60 giorni. La biodegradazione è avvenuta per erosione e sbriciolamento. Un possibile fattore che ha portato alla biodegradazione è la presenza di leucociti infiltrati a causa dell'infiammazione.

È stata valutata anche l'immunogenicità di questi film misurando il peso della milza dei topi dopo 30 e 60 giorni dall'impianto dei film. La milza è responsabile della produzione di globuli rossi e alcuni tipi di globuli bianchi e fa parte del sistema immunitario e del sistema linfatico. Proprio per questo in presenza di infezioni si ingrandisce. Non si sono riscontrati aumenti significativi nel peso della milza e ciò ha portato a concludere che i film a

base di WP non sono immunogenici.

Capitolo 3

Agenti antimicrobici

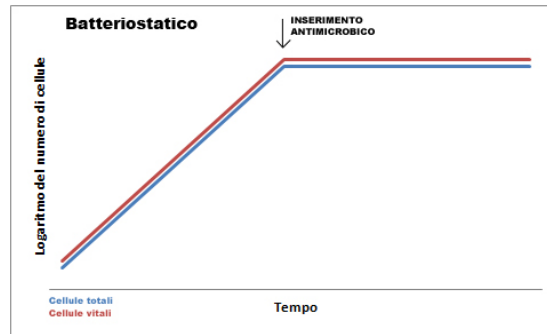
Gli agenti antimicrobici hanno contribuito negli anni al controllo di infezioni. La parola antimicrobico deriva dal greco: *anti* significa contro, *mikros* piccolo e *bios* vita. Si tratta quindi di agenti che uccidono microrganismi o inibiscono la loro crescita. Gli agenti antimicrobici sono sostanze naturali, semisintetiche o sintetiche che uccidono o inibiscono la crescita di microrganismi senza causare danni all'ospite. Possono essere classificati in antibatterici, antivirali, antifungini e antiprotozoari [39]. Parlando invece di antibiotici, ci si riferisce a sostanze che agiscono esclusivamente contro i batteri inibendone la crescita e la proliferazione.

Gli agenti antibatterici possono avere effetti battericidi o batteriostatici. Si parla di battericidi quando uccidono i batteri, mentre batteriostatici se ne inibiscono la crescita. Questi effetti sono mostrati in figura 3.1.

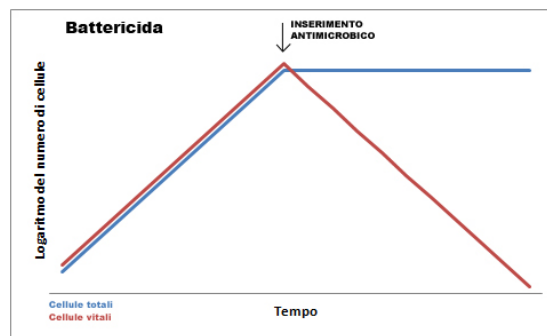
Le infezioni delle ferite rappresentano la maggiore causa di ritardo nella guarigione, per questo è necessario trovare l'antimicrobico più adatto all'applicazione. Gli agenti antimicrobici utilizzati nelle ferite dovrebbero soddisfare i seguenti requisiti [41]:

- Non essere tossici e sicuri da utilizzare sulla cute lesionata;
- Non causare reazioni allergiche;
- Avere un effetto antimicrobico ad ampio spettro e duraturo;
- I microrganismi non devono sviluppare resistenza all'antimicrobico.

La resistenza agli antimicrobici rappresenta una delle maggiori sfide nel campo della medicina. Basti pensare che la resistenza agli antimicrobici potrebbe portare alla morte di 10 milioni di persone all'anno entro il 2050 [42].



(a)



(b)

Figura 3.1: Confronto fra effetto batteriostatico (a) ed effetto battericida (b) sull'andamento della crescita batterica [40].

Questo problema è dovuto all'utilizzo eccessivo e inappropriato di antibiotici, specialmente nei paesi in via di sviluppo, a causa del basso costo e della facile reperibilità [43]. Nei batteri, le mutazioni casuali possono conferire la resistenza agli antibiotici. Tali mutazioni, grazie alla ricombinazione genica, diffondono rapidamente nelle popolazioni batteriche. Considerando che i batteri, quando le condizioni sono ottimali, si riproducono molto velocemente, in tempi relativamente brevi tutta la popolazione diventa resistente a un determinato antimicrobico.

Per limitare il problema della resistenza agli antimicrobici, nel *wound healing* è preferibile utilizzare antimicrobici topici piuttosto che sistemici. Gli antimicrobici topici si distinguono in disinfettanti, antisettici, antibiotici e antimicrobici di origine naturale. I disinfettanti riescono ad eliminare tutti i tipi di microrganismi, tuttavia non possono essere applicati nei tessuti vivi a causa della loro tossicità.

Gli antisettici sono sostanze chimiche che possono essere utilizzate sulla cute intatta, su ferite aperte e sulle mucose per impedire la crescita e lo sviluppo

di microrganismi [44]. Alcuni antisettici utilizzati sono:

- La clorexidina: ha un'attività battericida veloce e contro un ampio spettro di batteri. Agisce danneggiando la membrana cellulare, modificandone la permeabilità e facendo fuoriuscire i componenti cellulari [41]. Agisce contro batteri Gram-positivi, Gram-negativi, virus e funghi [44].
- Lo iodoprovidone: i suoi effetti antimicrobici derivano dal rilascio di iodio dalla molecola di iodoprovidone. Lo iodio è tossico nei confronti dei microrganismi perché si lega in maniera irreversibile con i residui di tirosina delle proteine, interferisce con la formazione di legami idrogeno fra alcuni amminoacidi e acidi nucleici, ossida i gruppi tiolici e reagisce con i siti di insaturazione dei lipidi. L'utilizzo dello iodoprovidone presenta però numerosi svantaggi perché rallenta il *wound healing* inibendo l'aggregazione dei fibroblasti, la migrazione di leucociti e inducendo la morte cellulare. Agisce contro batteri Gram-positivi, Gram-negativi, alcune spore batteriche, lieviti e virus [44].
- Il perossido di idrogeno (H_2O_2): si utilizza nell'irrigazione delle ferite e il suo effetto è di breve durata. La sua azione è dovuta al fatto di essere un agente ossidante. Produce radicali liberi che reagiscono con lipidi, proteine e acidi nucleici. Agisce su un ampio spettro di batteri, con un maggiore effetto sui Gram-positivi. A basse concentrazioni favorisce la guarigione, mentre se si supera la concentrazione di 10–50 mM si potrebbe avere un danneggiamento delle cellule nel letto della ferita e la distruzione delle cellule limitrofe [41][44].
- Nanoparticelle di argento: hanno una dimensione variabile fra 1 e 100 nm e grazie alla loro elevata area superficiale esercitano un efficace effetto antimicrobico [44]. L'argento metallico in ambiente acquoso rilascia ioni argento (Ag^+), i quali sono i responsabili dell'attività antimicrobica. Gli ioni Ag^+ si legano ai componenti carichi negativamente nelle proteine e negli acidi nucleici provocando cambiamenti strutturali nelle pareti e nelle membrane cellulari dei batteri. Interagiscono in particolare con le ammine, i fosfati, gli ossidrilici, i gruppi tiolici, sia singolarmente che in combinazione così da provocare numerosi danneggiamenti contemporaneamente. Gli ioni argento che si legano al DNA bloccano la trasmissione, quelli che si legano alla superficie della cellula interrompono la respirazione cellulare e la sintesi di ATP [45]. Le nanoparticelle di argento agiscono contro lieviti, virus e batteri Gram-positivi, Gram-negativi, compresi quelli multiresistenti [44].

Gli antibiotici, rispetto agli antisettici, hanno uno spettro di azione più stretto perché il loro meccanismo di azione è specifico per pochi batteri. I microrganismi inoltre sviluppano maggiore resistenza nei confronti di questi antimicrobici rispetto agli antisettici. Un esempio di antibiotici utilizzati nel *wound healing* è la Mupirocina che è un acido grasso corto prodotto dalla fermentazione di *Pseudomonas fluorescens* e serve per contrastare le infezioni cutanee da Stafilococco. Agisce inibendo la sintesi batterica di RNA e proteine [44].

Per quanto riguarda gli agenti antimicrobici naturali, viene molto utilizzato il miele, il quale agisce contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Il miele è un fluido viscoso, igroscopico con basso pH e alta osmolarità e contiene un'alta concentrazione di zuccheri e numerose sostanze naturali. L'attività antimicrobica del miele è frutto sia della sua alta osmolarità e acidità, sia della presenza del perossido di idrogeno e di componenti non-perossidi come il metilgliossale e la defensina-1 [44].

Per ovviare al problema della resistenza agli antimicrobici, una possibilità è quella di utilizzare come agenti antimicrobici le nanoparticelle di alcuni metalli. Nel paragrafo successivo saranno descritte le proprietà di questa classe di antimicrobici.

3.1 Nanomateriali

Le nanoparticelle (NPs) agiscono nei confronti di microrganismi patogeni secondo tre meccanismi diversi: inducendo stress ossidativo, rilasciando ioni metallici e attraverso meccanismi non ossidativi. In particolare distruggono la membrana cellulare dei batteri, generano ROS, penetrano la membrana cellulare, inducono effetti antibatterici intracellulari interagendo con il DNA e le proteine. Il fatto che l'attività antimicrobica delle nanoparticelle segua diverse vie biologiche, fa sì che lo sviluppo della resistenza sia molto improbabile perché dovrebbero avvenire più mutazioni contemporaneamente [39].

Si definiscono nanomateriali quei materiali che presentano almeno una delle tre dimensioni compresa fra 1 e 100 nm. Presentano proprietà uniche dal punto di vista elettronico, ottico, magnetico e meccanico e la loro elevata area superficiale riesce a garantire migliori interazioni con le cellule [39][46]. Fra le nanoparticelle inorganiche più utilizzate troviamo quelle a base di metalli o ossidi di metalli come Ag, Cu, CuO, ZnO, TiO₂, Fe₃O₄, MgO. Queste

NPs hanno una significativa attività antibatterica, ma al tempo stesso presentano elevata citotossicità. Per questo motivo vengono spesso incapsulate in materiali biocompatibili e biodegradabili come ad esempio il chitosano [48]. Un altro tipo di materiali noti per la loro attività antimicrobica sono le nanostrutture di carbonio. Fra queste si trovano i fullereni, i nanotubi di carbonio, il grafene e il diamond like carbon [49].

Le nanoparticelle a base di metalli o ossidi di metalli per espletare la loro funzione antibatterica devono venire a contatto con le cellule batteriche. Le interazioni che possono avvenire sono l'attrazione elettrostatica, le forze di Van der Waals e le interazioni idrofobiche. Le NPs attraversano la membrana influenzando la forma e la funzione della stessa. Inoltre, interagiscono con i componenti della cellula batterica portando a stress ossidativo, cambiamenti nella permeabilità, disordini nell'equilibrio elettrolitico, inibizione degli enzimi, disattivazione di proteine e cambiamenti nell'espressione genica [46].

I meccanismi d'azione principali delle nanoparticelle a base di ossidi metallici sono [46]:

- Lo stress ossidativo: è indotto dalle specie reattive dell'ossigeno. La produzione di ROS avviene a causa di difetti e vacanze di ossigeno nella struttura cristallina. In condizioni normali la produzione e l'eliminazione di ROS nelle cellule batteriche si bilanciano. Se invece si ha una produzione eccessiva di ROS si favorisce l'ossidazione. Questo sbilanciamento porta a stress ossidativo che danneggia i componenti della cellula batterica.
In base al tipo di NP che si prende in considerazione vengono prodotti quattro tipi diversi di ROS: l'anione superossido (O_2^-), il radicale ossidrilico ($-OH$), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e l'ossigeno singoletto (O_2).
- Il rilascio di ioni metallici: gli ioni metallici sono rilasciati dagli ossidi dei metalli e assorbiti dalla membrana cellulare. Questi interagiscono con i gruppi funzionali delle proteine e degli acidi nucleici come i gruppi tiolici, amminici e carbossilici inibendo l'attività enzimatica, danneggiando la parete cellulare e influenzando i normali processi fisiologici delle cellule batteriche.
- Meccanismi non ossidativi: si ha una diminuzione del metabolismo degli amminoacidi, dei carboidrati e dei nucleotidi nella cellula batterica.

Questi effetti non sono correlati alla perossidazione lipidica dovuta allo stress ossidativo.

L'effetto antimicrobico delle nanoparticelle è influenzato da[46]:

- Dimensione: le NPs di più piccola dimensione hanno maggiori aree superficiali. Ciò aumenta la probabilità di entrare in contatto e passare attraverso la membrana cellulare. Sono inoltre più reattive perché una maggiore area superficiale implica l'esposizione di più siti attivi.
- Forma: esistono NPs di diverse forme che provocano effetti differenti. La forma influenza l'area superficiale e di conseguenza la solubilità delle NPs nei medium acquosi e il rilascio di ioni metallici. Le NPs di forma triangolare mostrano maggiori interazioni con la membrana cellulare dei batteri e hanno quindi una maggiore attività antibatterica rispetto alle NPs sferiche o ai nanorod [50].
- Carica superficiale: a causa dell'attrazione elettrostatica fra le NPs cariche positivamente e la membrana cellulare carica negativamente, le NPs con carica positiva vengono adsorbite più facilmente dalla superficie batterica. Le NPs cationiche sono inoltre responsabili della produzione di un maggior numero di ROS [46].
- Drogaggio: dato che un limite delle NPs è la loro aggregazione, diverse ricerche si sono concentrate sulla modificazione delle NPs per prevenire l'aggregazione e per permettere la dispersione in ambienti acquosi e media idrofilici. Il drogaggio è un buon metodo anche per regolare le interazioni fra nanoparticelle e batteri. Ad esempio, drogando le nanoparticelle di ossido di zinco con fluoro si è notata una maggiore produzione di ROS e quindi un maggiore danno alle cellule batteriche [46].
- Condizioni ambientali: il pH, la pressione osmotica del medium influenzano la carica superficiale, l'aggregazione e la solubilità delle NPs. Ad esempio è stato dimostrato che la diminuzione del pH causa una maggiore velocità di dissoluzione delle nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO NPs) che comporta migliori proprietà antimicrobiche.

3.2 L'ossido di zinco

L'ossido di zinco (ZnO) è un materiale utilizzato in molte applicazioni grazie alle sue elevate stabilità chimica e fotostabilità e alle sue basse tossicità,

biocompatibilità e attività antimicrobica. Le sue proprietà ottiche e piezoelettriche fanno sì che venga utilizzato come materiale nei nanosensori e in device nanoelettronici. Nel settore biomedicale è molto utilizzato come agente antitumorale e antibatterico e come *carrier* in applicazioni di *drug delivery* [51].

3.2.1 Proprietà e strutture cristalline

L'ossido di zinco è un materiale inorganico del gruppo semiconduttori II-VI. A temperatura ambiente si presenta sotto forma di solido bianco ed è completamente insolubile in acqua. È caratterizzato da un'energia di legame di 60 meV e un energy gap di 3,3 eV a temperatura ambiente. L'ampio energy gap ha effetti significativi sulla conducibilità elettrica e sull'assorbimento ottico. Lo ZnO è un semiconduttore di tipo n e, se drogato con altri metalli, aumenta la sua conducibilità. Possiede un'elevata attività catalitica e fotochimica e assorbimento ottico nell'UVA (315-400 nm) e nell'UVB (280-315 nm), che lo rendono adatto in applicazioni cosmetiche per la protezione dai raggi UV. Presenta inoltre notevoli proprietà antibatteriche e antifungine [52].

Lo ZnO cristallizza in tre forme diverse: la wurzite, la zincoblenda e salgemma (Figura 3.2). La wurzite è la forma termodinamicamente stabile a temperatura ambiente. Ha una struttura esagonale con parametri di cella $a=0,325$ nm, $c=0,521$ nm e un rapporto c/a pari a 1,6, molto vicino al valore ideale della cella esagonale ($c/a = 1,633$). Schematicamente si rappresenta come un numero di piani alternati di zinco e ossigeno disposti intorno all'asse c . Ogni Zn^{2+} è circondato da quattro atomi di ossigeno che si dispongono ai vertici di un tetraedro e viceversa [52].

3.2.2 Metodi di sintesi

Le ZnO NPs si trovano sottoforma di strutture unidimensionali, bidimensionali e tridimensionali. Fra le strutture unidimensionali si hanno nanoeliche, nanoaghi, nanorod, nanotubi, nanofili. Fra le bidimensionali si riscontrano nanofogli e nanopellet e fra le tridimensionali nanoparticelle a forma di fiori o fiocchi di neve [54]. Le diverse strutture, forme e dimensioni si ottengono con metodi di sintesi diversi.

I metodi di sintesi possono essere suddivisi in:

- Metodi fisici: fra questi si annoverano l'evaporazione termica, l'ablazione laser e la deposizione fisica da fase vapore. Nella maggior parte dei

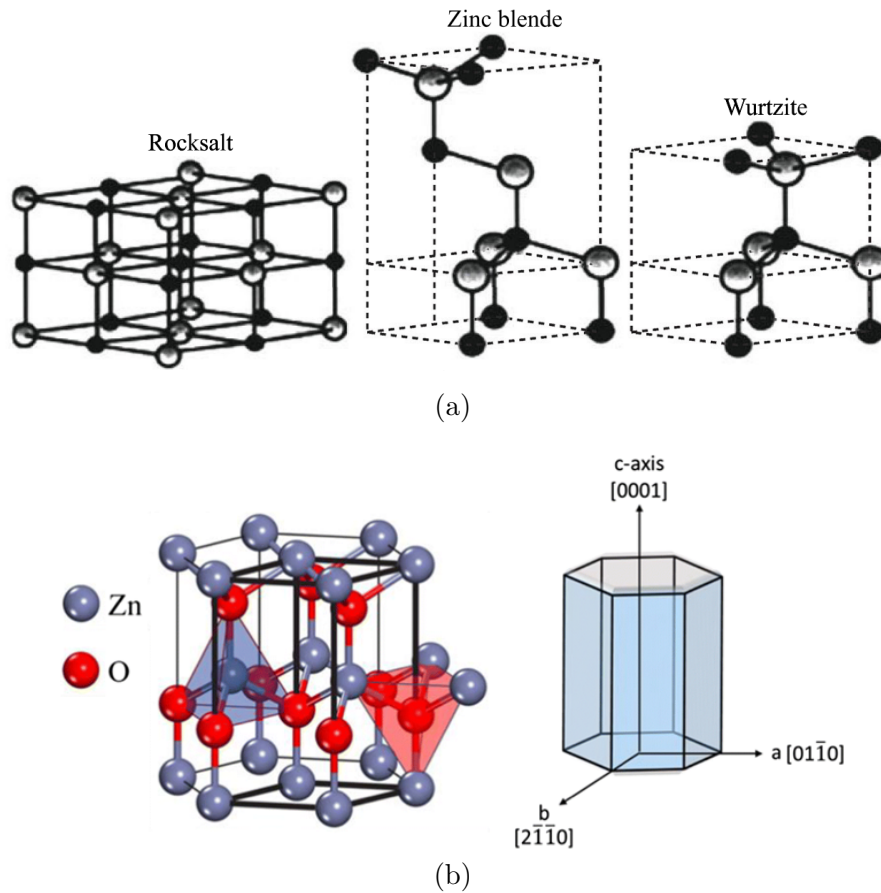


Figura 3.2: (a) Strutture cristalline dello ZnO (salgemma, zincoblenda, wurtzite) [52] (b) Dettaglio struttura cristallina della wurtzite [53].

metodi fisici di sintesi si ottengono tassi di produzione di NPs elevati e si utilizzano quindi nei processi industriali [55].

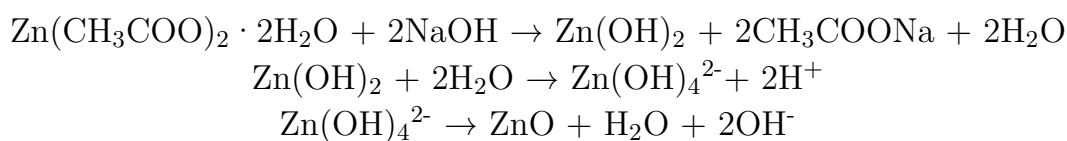
- Metodi chimici: si suddividono in metodi a fase liquida, a fase vapore e a fase solida, in base allo stato fisico in cui avvengono. I più frequentemente utilizzati sono quelli a fase liquida perché permettono di controllare i parametri del processo per ottenere nanoparticelle con specifica composizione, forma e dimensione. Le microemulsioni, la sintesi sol-gel, i metodi idrotermali e la precipitazione appartengono a questa categoria di metodi di sintesi. Per rendere il processo più green ed economico, per la sintesi delle nanoparticelle si può utilizzare l'acqua [55].
- Metodi biologici: rappresentano un'alternativa ai metodi fisici e chimici.

Rispetto ai metodi chimici non richiedono l'utilizzo di solventi organici e tossici, sono ecosostenibili e permettono un controllo della forma e dimensione delle NPs. Per i metodi biologici si devono selezionare gli organismi più adatti e le condizioni ottimali per far avvenire la sintesi. Fra questi metodi si distinguono sintesi mediate da microrganismi (batteri, lieviti, funghi) e mediate da piante. Per la biosintesi mediata da microrganismi si utilizzano sia eucarioti sia procarioti e la sintesi può essere intracellulare o extracellulare [51]. Per quella mediata dalle piante, la produzione di NPs avviene tramite la riduzione del metallo a opera di flavonoidi, terpenoidi e polisaccaridi [55].

3.2.2.1 Sintesi per precipitazione

I metodi di sintesi per precipitazione prevedono la riduzione rapida e spontanea di una soluzione di sale di zinco, utilizzando un agente riducente, seguita dalla precipitazione di un precursore di ZnO dalla soluzione. In seguito si ha un ulteriore step in cui il precursore viene sottoposto a trattamenti termici e a macinatura per rimuovere le impurezze [54]. I sali di zinco utilizzati di solito sono il nitrato di zinco ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$), l'acetato di zinco ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e il solfato di zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Questi vengono fatti reagire con agenti basici come l'idrossido di ammonio (NH_4OH) e l'idrossido di sodio (NaOH).

Di seguito si riporta un esempio di sintesi per precipitazione utilizzata da Wahab et al. per la produzione di microfiori di ZnO composti da nanorod esagonali [56].



Queste reazioni spiegano il meccanismo di crescita dei nanorod di ZnO esagonali tramite la formazione di $\text{Zn}(\text{OH})_2$ e successivamente di $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$. In una soluzione acquosa con pH superiore a 9, si ha una parziale dissoluzione di $\text{Zn}(\text{OH})_2$ per formare complessi di $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$, i quali rappresentano le basi per la formazione della struttura cristallina di ZnO [56].

La sintesi per precipitazione deve avvenire controllando il pH, la temperatura e il tempo di precipitazione per ottenere nanoparticelle della forma e dimensione desiderata.

3.2.3 Attività antimicrobica dello ZnO

Le nanoparticelle di ossido di zinco sono usate come agenti antibatterici in creme, unguenti, lozioni e coating. Presentano effetti antifungini e antibatterici contro batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativi (*Escherichia coli*). L'effetto antibatterico varia in funzione della diversa composizione della parete cellulare dei batteri (Figura 3.3), la quale è responsabile del mantenimento della pressione osmotica e della forma della cellula. La parete cellulare dei Gram+ è costituita da uno spesso strato (20-80 nm) di peptidoglicano, mentre quella dei Gram- è costituita da un sottile strato di peptidoglicano (7-8 nm) e una membrana esterna composta da lipopolisaccaridi (LPS), nella parte esterna, e da fosfolipidi nella parte interna. Le nanoparticelle riescono a oltrepassare lo strato di peptidoglicano [57]. Non è ancora chiaro quali siano le interazioni fra le NPs e la cellula batterica, infatti alcuni studi sostengono che il fatto che lo strato di peptidoglicano dei Gram- sia più sottile fa sì che la rottura della membrana cellulare avvenga più facilmente. Altri studi evidenziano invece una maggiore difficoltà a penetrare la cellula dei batteri Gram- a causa della presenza della membrana esterna.

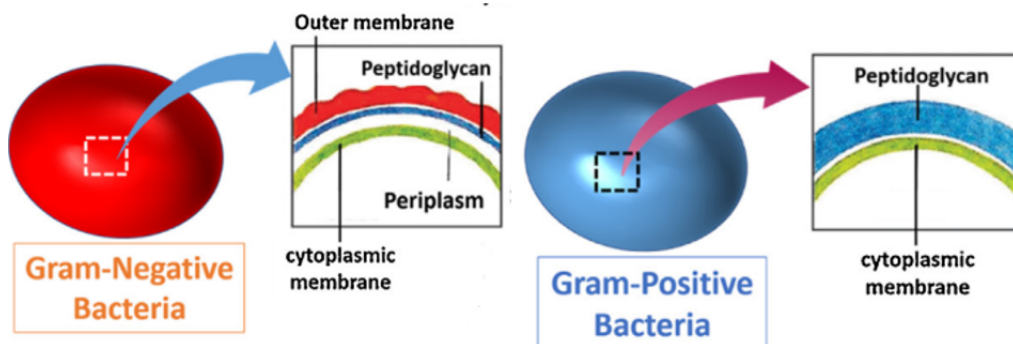


Figura 3.3: Struttura della parete cellulare dei batteri Gram- e Gram+ [58].

Rispetto ad altre nanoparticelle a base di ossidi di metalli (MgO , TiO_2 , Al_2O_3 , CuO), le ZnO NPs presentano effetti antimicrobici maggiori nei confronti di *S. aureus*, anche nei confronti del ceppo resistente alla meticillina (MRSA). Questo dimostra l'efficacia delle NPs anche contro ceppi batterici che hanno sviluppato resistenza agli antibiotici [47].

L'attività antimicrobica delle ZnO NPs dipende dalla dimensione delle nanoparticelle e dalla loro concentrazione. Infatti è migliore con NPs di piccola dimensione, ad alta concentrazione e con una maggiore area superficiale [55].

Esistono diversi meccanismi secondo i quali le ZnO NPs espletano la loro funzione antimicrobica: la produzione di ROS, il rilascio di ioni Zn^{2+} , le interazioni elettrostatiche fra la parete batterica e le ZnO NPs, l'accumulo di ZnO NPs all'interno delle cellule batteriche e il danneggiamento meccanico delle cellule batteriche (Figura 3.4).

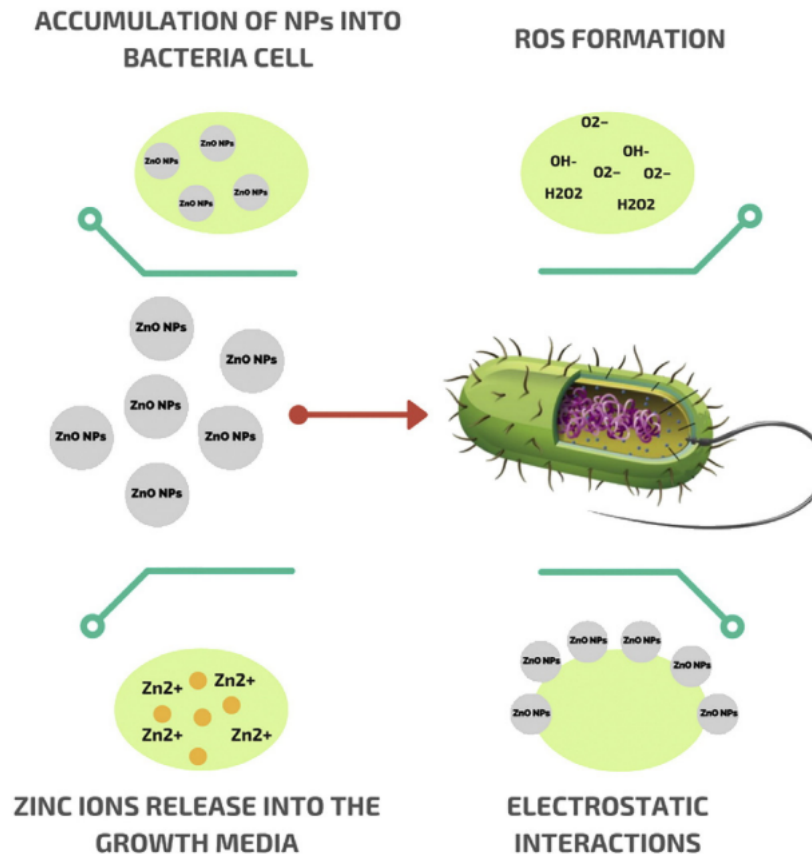


Figura 3.4: Meccanismi che determinano l'antimicrobicITÀ delle ZnO NPs [55].

Produzione di ROS La produzione fotocatalitica di ROS in presenza di acqua e ossigeno rappresenta uno dei più efficaci meccanismi di azione antibatterica nelle ZnO NPs. Le ROS (ione superossido, perossido di idrogeno e ione idrossido) nel momento in cui vengono internalizzate nella cellula batterica comportano la distruzione di componenti cellulari come lipidi, proteine e DNA [52].

Come visto nelle sezioni precedenti, lo ZnO è un semiconduttore con energy gap pari a 3,3 eV ed è quindi costituito da una banda di valenza (VB) e una banda di conduzione (CB). Quando lo ZnO in soluzione acquosa viene eccitato da una radiazione fotonica di energia ($h\nu$) superiore a 3,3 eV, l'energia viene assorbita dagli elettroni (e^-). Gli elettroni eccitati lasciano la banda di valenza e si spostano nella banda di conduzione, lasciando delle lacune cariche positivamente (h^+) nella banda di valenza. La coppia elettrone-lacuna dà origine a reazioni di ossidoriduzione con l'acqua e l'ossigeno.

A livello delle lacune avviene l'ossidazione delle molecole d'acqua che portano alla formazione di radicali liberi $\bullet\text{OH}$ e di ioni H^+ . Gli elettroni della banda di conduzione provocano la riduzione delle molecole di ossigeno che vengono trasformate in ioni superossido ($\bullet\text{O}_2^-$). Gli ioni superossido reagiscono con gli ioni H^+ e formano i radicali liberi $\bullet\text{HO}_2$, che quando collidono con gli elettroni generano anioni idroperossido (HO_2^-). Gli anioni HO_2^- a loro volta reagiscono con gli ioni H^+ e producono il perossido di idrogeno (H_2O_2). Questi meccanismi sono illustrati in figura 3.5 [57].

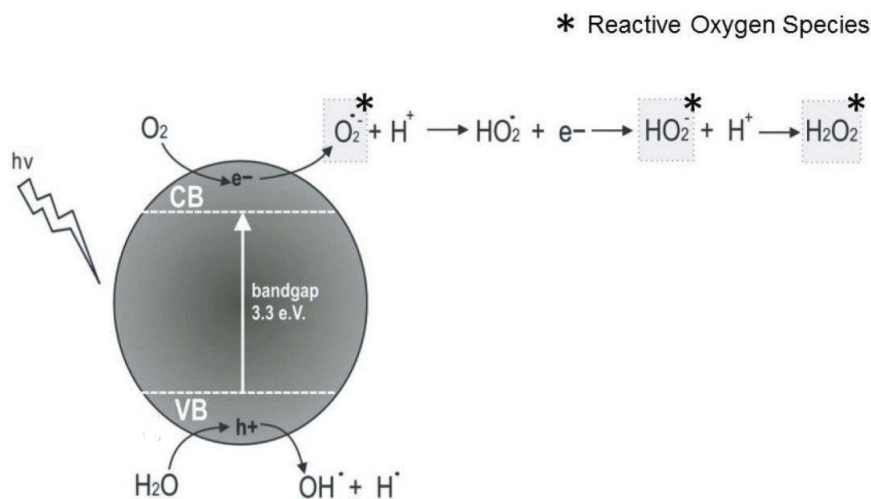


Figura 3.5: Produzione di ROS [57].

Gli ioni superossido e idrossido non penetrano nella cellula a causa della carica negativa della membrana, rimangono tuttavia sulla superficie esterna della cellula batterica. Potrebbero però essere prodotti all'interno della cellula qualora le nanoparticelle riuscissero a penetrarla. Al contrario, H_2O_2 attraversa la parete cellulare batterica portando a danneggiamenti della cellula che potrebbero condurla alla morte [52].

Le ROS possono essere prodotte anche senza esposizione alla luce, tuttavia si è notato che l'attività antibatterica migliora a seguito dell'esposizione ai

raggi UV perché si ha una maggiore produzione di ROS [57].

Rilascio di ioni Zn^{2+} Un altro meccanismo che determina l'antimicrobicITÀ delle nanoparticelle a base di ossido di zinco è il rilascio di ioni Zn^{2+} in un medium che contiene sia batteri che nanoparticelle. Questo effetto è però limitato dall'insolubilità di ZnO in acqua che impedisce una distribuzione di ioni zinco nel medium e limita l'attività antimicrobica [52]. In condizioni acide però le nanoparticelle dissolvono e producono ioni zinco [57]. Il meccanismo di rilascio di Zn^{2+} è influenzato dalle proprietà fisico-chimiche delle particelle (porosità, dimensione e morfologia) e dalle condizioni in cui avviene il rilascio di Zn^{2+} , in particolare in base al pH del medium, a un'eventuale illuminazione UV, al tempo di esposizione e la presenza di altri elementi [52].

Gli ioni Zn^{2+} hanno un effetto significativo sul metabolismo del batterio perché inibiscono i meccanismi di trasporto attivo di membrana e alcuni degli enzimi chiave per il processo di glicolisi, portando all'esaurimento di ATP e alla conseguente morte cellulare [59]. Gli ioni Zn^{2+} inibiscono l'attività degli enzimi causando dei cambiamenti nella conformazione dell'enzima o delle deformazioni nel suo sito attivo [50]. Gli ioni zinco causano inoltre il danneggiamento della parete e della membrana cellulare e ne cambiano la permeabilità. Questo porta quindi a un aumento della probabilità che le nanoparticelle penetrino la cellula batterica [55].

Interazioni elettrostatiche Le interazioni elettrostatiche fra la parete batterica e le nanoparticelle portano al danneggiamento dell'integrità cellulare. La superficie cellulare è carica negativamente, mentre le ZnO NPs in sospensione hanno carica positiva. Si creano quindi delle forze elettrostatiche che portano alla formazione di legami fra le nanoparticelle e la superficie batterica, provocando il danneggiamento della membrana cellulare e la conseguente internalizzazione di ZnO NPs [52].

Accumulo di ZnO NPs all'interno delle cellule batteriche L'ingresso delle ZnO NPs nella cellula batterica può avvenire per diffusione, attraverso i canali di membrana [60]. Una volta che le nanoparticelle sono all'interno del batterio causano danni ai componenti cellulari.

Danneggiamento meccanico Le nanoparticelle di ossido di zinco presentano proprietà abrasive a causa dei difetti superficiali. Fra questi si riscontrano difetti di natura chimica, spigoli e angoli che influenzano le proprietà antibatteriche, causando un danno meccanico alla parete cellulare [52]. I

danni meccanici della parete cellulare causano modificazioni alla morfologia cellulare, fuoriuscita di organelli e strutture intracellulari e ingresso di NPs all'interno della cellula batterica [60].

3.2.4 Influenza della forma e della dimensione delle ZnO NPs

In base al metodo di sintesi con cui vengono preparate, le nanoparticelle possono avere diverse forme e dimensioni che influenzano l'attività antibatterica in maniera differente. La forma delle nanoparticelle ha effetti sul meccanismo di internalizzazione. Ad esempio nanorod e nanofili penetrano la parete cellulare molto più facilmente rispetto alle nanoparticelle di forma sferica [52].

Per quanto riguarda la dimensione delle NPs, numerosi studi hanno riportato che una minore grandezza delle nanoparticelle consente di ottenere proprietà antimicrobiche migliori perché una dimensione minore consente più facilmente l'ingresso delle NPs all'interno della cellula batterica. Inoltre, le NPs di più piccole dimensioni presentano una maggiore area interfacciale, la quale è responsabile dell'esposizione di un gran numero di siti attivi [52].

In uno studio di Kaushik et al. [61] si è però riscontrato che mentre l'attività antibatterica migliora con ZnO NPs di piccole dimensioni, la crescita di fibroblasti è più evidente con nanoparticelle di più grandi dimensioni. Andrebbe quindi trovato un compromesso per poter applicare efficacemente le nanoparticelle di ZnO nel *wound healing*.

Nel dettaglio Kaushik et al. hanno praticato un processo di annealing delle ZnO NPs per provocare un aumento delle loro dimensioni, passando quindi da NPs con dimensioni dei grani di 15 nm a NPs con dimensioni dei grani pari a 55 nm. La dimensione aumenta con l'annealing perché la crescita dei cristalli viene favorita dall'esposizione alla temperatura per lunghi periodi. Ciò permette alle NPs di saldarsi e formare così particelle di più grosse dimensioni.

Tramite un microscopio a fluorescenza, gli studiosi hanno notato che i fibroblasti aderiscono e proliferano al di sopra delle ZnO NPs di tutte le dimensioni senza modificare la propria morfologia. Si nota però che all'aumentare della dimensione delle NPs si ha maggiore adesione e proliferazione. All'aumentare della dimensione delle NPs, le cellule formano delle strutture con le nanoparticelle sulle superfici delle stesse, ottenendo quindi una maggiore adesione fra i fibroblasti e le ZnO NPs. Le NPs quindi fungono da substrato per l'adesione e la proliferazione cellulare. Con le NPs di minori dimensioni

è invece prevalente il fenomeno di assorbimento cellulare delle ZnO NPs e quindi si ha minor proliferazione.

3.2.5 Bionanocompositi a base di ZnO

Nel *foodpackaging*, come nel *wound dressing*, è importante la realizzazione di materiali biocompositi composti da film e idrogeli, incorporati con ZnO NPs. Si riescono così a sfruttare le proprietà di barriera dei film e le proprietà antimicrobiche delle ZnO NPs limitandone la tossicità [48][62]. Un biomateriale ideale utilizzato per il *wound dressing* dovrebbe avere proprietà antinfiammatorie e antibatteriche, senza causare tossicità alle cellule ospiti. Dovrebbe inoltre migliorare il processo di *wound healing*. Quando le NPs metalliche sono incorporate in idrogeli a matrice polimerica, la loro tossicità è ridotta e la loro efficacia è maggiore perché si riesce ad avere un rilascio controllato. Quindi l'utilizzo di materiali biocompositi permette di avere la stessa efficacia con dosi minori di ZnO e a minimizzare gli effetti indesiderati [63]. In letteratura si trovano molti esempi di questi materiali biocompositi.

Raguvaran et al. [63] hanno realizzato degli idrogeli a base di alginato di sodio e gomma di acacia caricati con ZnO NPs (SAGA-ZnO NPs). I polimeri alginato di sodio e gomma di acacia sono efficaci nel processo di guarigione della ferita, sono inoltre biocompatibili e biodegradabili. Le ZnO NPs presentano invece proprietà antibatteriche e antinfiammatorie e accelerano la guarigione di ferite croniche e acute. Gli effetti di citotossicità sono stati valutati nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di cavallo e cellule Vero. Rispetto al caso di utilizzo di sole ZnO NPs si è osservato un notevole decremento della citotossicità. Questo non è andato a intaccare le proprietà antibatteriche delle nanoparticelle, infatti si è notato un considerevole alone di inibizione nelle colture del batterio Gram- *Pseudomonas aeruginosa*. Un altro aspetto che conferma l'efficacia di questo tipo di materiali biocompositi è la proliferazione di fibroblasti. Invece utilizzando solo ZnO NPs non incorporate nella matrice polimerica si era invece notata una tossicità nei confronti dei fibroblasti.

Mohandas et al.[64] hanno effettuato uno studio sull'utilizzo di bendaggi biocompositi a base di alginato e ossido di zinco nelle ferite infette. Anche in questo caso gli effetti sono stati positivi. Per prima cosa è stata valutata la capacità emostatica di questi biocompositi e si è notato che la capacità di formare coaguli dell'alginato non era variata dopo l'aggiunta di ZnO NPs. Inoltre, gli effetti antimicrobici dei biocompositi con concentrazione di ZnO

NPs al 5% e 7,5% contro MRSA hanno evidenziato il potenziale dei biocompositi per trattare ferite infette. Si è notato che la vitalità dei fibroblasti con basse concentrazioni (0,1%, 0,5%) di ZnO NPs era ancora elevata e comparabile con il controllo di solo alginato. La vitalità tuttavia diminuiva nel corso del tempo a causa della generazione di ROS da parte delle ZnO NPs. Sono necessari quindi ulteriori studi per comprendere la tossicità *in vivo* e il meccanismo di *wound healing*.

Parte III

Ricerca sperimentale

Capitolo 4

Materiali e metodi

4.1 ZnO nanostrutturato

4.1.1 Materiali

I reagenti utilizzati nella sintesi per precipitazione sono: l'idrossido di potassio (KOH), l'acetato di zinco diidrato ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), il metanolo (CH_3OH). Il KOH utilizzato è prodotto da Merck e ha purezza $\geq 85\%$, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CH_3OH da Sigma-Aldrich e ha purezza $\geq 98\%$.

Le prove antimicrobiche sono state effettuate sull'ossido di zinco commerciale prodotto da Sigma-Aldrich con purezza $\geq 99\%$.

4.1.2 Metodi per la caratterizzazione dello ZnO

4.1.2.1 Diffrattometria a raggi X

La diffrattometria a raggi X (XRD) è un metodo di analisi non distruttivo utilizzato nella caratterizzazione dei solidi cristallini per ottenere informazioni sulla cristallinità del materiale, sulla dimensione dei grani, sulla struttura del materiale e sulle fasi che lo costituiscono.

In questo lavoro di tesi lo strumento utilizzato per l'analisi è stato PANalytical X'Pert Pro ($\text{Cu K}\alpha$ radiation) diffractometer. Il campione da analizzare è stato realizzato polverizzando finemente lo ZnO ed è stato successivamente posizionato sull'apposito supporto per effettuare l'analisi, la quale è avvenuta in un intervallo di valori di 2θ compreso fra 10° e 80° .

4.1.2.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

L'analisi di fisisorbimento di azoto serve a quantificare l'area superficiale del materiale, la dimensione media dei pori e il volume poroso. Ciò è possibile attraverso l'analisi della quantità di gas adsorbito dalla superficie del materiale. L'analisi permette di ottenere un'isoterma di adsorbimento attraverso la quale è possibile valutare i suddetti parametri. Esistono sei tipi di isoterme di adsorbimento, secondo la classificazione IUPAC (Figura 4.1), che permettono di stabilire la tipologia di porosità del materiale.

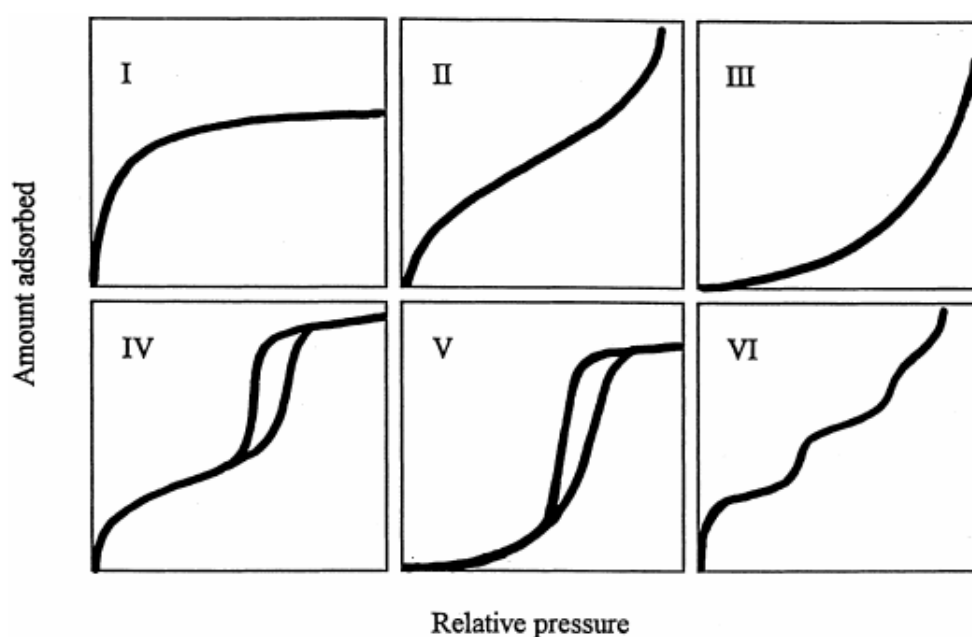


Figura 4.1: Isoterme di adsorbimento secondo la classificazione IUPAC [65].

Lo strumento utilizzato è Quantachrome AUTOSORB-1. Il campione, costituito da 100 mg di ZnO, è stato inizialmente sottoposto a un processo di degassaggio per 2 ore a 150 °C per consentire la rimozione di specie adsorbite sulla superficie. In seguito, dopo aver portato la temperatura a 77 K e aver inserito il cilindro contenente il campione in una trappola di azoto, è stata avviata la misurazione dell'isoterma di adsorbimento, dalla quale sono stati ricavati i valori dell'area superficiale specifica e della distribuzione dei pori. I valori dell'area superficiale sono stati ottenuti con il modello Brauner-Emmet-Teller (BET) selezionando il range di pressioni relative 0,04-0,01. Il modello Barret-Joyner-Helenda (BJH) è stato invece utilizzato per ottenere la distribuzione dei pori.

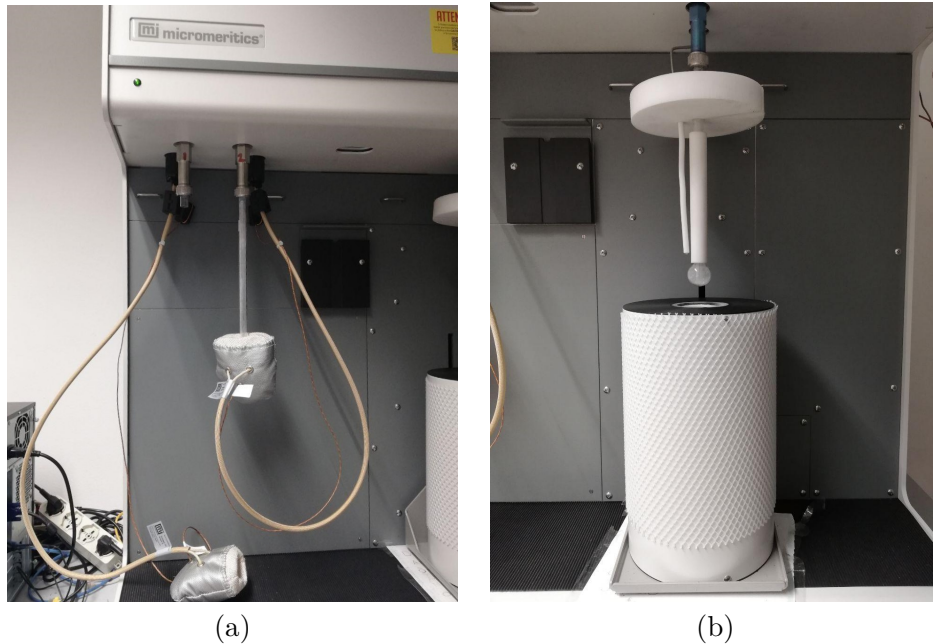


Figura 4.2: Dettaglio di Quantachrome AUTOSORB-1 durante la fase di degasaggio (a) e con trappola di azoto (b).

4.1.2.3 Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo

La microscopia a Scansione Elettronica (SEM) a emissione di campo consente di ottenere immagini a elevati ingrandimenti per valutare la morfologia di un materiale. Il segnale si ottiene da elettroni secondari che provengono dall'interazione fra il fascio di elettroni generato dallo strumento e il materiale analizzato. Nei microscopi a scansione elettronica i materiali da analizzare devono essere conduttivi, altrimenti gli elettroni rimarrebbero intrappolati nel materiale e si creerebbe un campo elettrico che respingerebbe gli elettroni in arrivo portando alla registrazione di un segnale errato. Per evitare questo inconveniente i campioni vengono ricoperti da un sottile strato di materiale conduttivo.

Lo strumento utilizzato in questo lavoro è il FESEM ZEISS MERLIN e le immagini registrate hanno un ingrandimento pari a 5000, 25000, 25000 X. Il campione di ZnO in questo caso è stato ricoperto da un sottile strato di platino prima della registrazione delle immagini.

4.2 Valutazione dell'attività antimicrobica di ZnO commerciale

Per la valutazione dell'attività antimicrobica dello ZnO commerciale in sospensione con PBS, è stato utilizzato il metodo basato sulla macro diluizione in brodo (metodo di *Broth macro-dilution*) effettuato in provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL. Questo è un metodo quantitativo, utilizzato per determinare l'attività antimicrobica *in vitro*. È un metodo particolarmente adatto per la determinazione della concentrazione minima inibitoria (MIC). Questo valore è definito come la minima concentrazione di antimicrobico necessario a inibire la crescita dei microrganismi [69].

In questo lavoro di tesi si è usata come riferimento la procedura standard CLSI M07-A9 per batteri aerobi e sono stati testati il Gram+ *S.epidermidis* (LMG 10474) e il Gram- *E.coli* (LMG 08063) mantenuti su terreno solido Mueller Hinton Agar (MHA).

Preparazione dell'inoculo standardizzato Per preparare l'inoculo standardizzato si è partiti da una coltura batterica cresciuta sul terreno solido Mueller Hinton Agar (MHA). La coltura batterica è stata fatta crescere per 12 ore in un incubatore alla temperatura di 37°C, nel caso di *S.epidermidis*, e di 20°C nel caso di *E.coli*. Trascorse le 12 ore, è stata preparata una sospensione di cellule batteriche in acqua.

Tramite l'utilizzo dello spettrofotometro LAMBDA 465 UV/Vis Spectrophotometer, si è poi valutata la densità ottica a 600 nm (OD_{600}) e le sospensioni sono state opportunamente diluite per ottenere un valore di OD_{600} pari a 0,5. Per ottenere un inoculo corrispondente a 10^6 Unità Formanti Colonie per mL (UFC/mL), le sospensioni sono state ulteriormente diluite di un fattore 10.

Preparazione delle sospensioni di ZnO Sono state preparate sospensioni di ZnO commerciale in tampone fosfato salino (PBS) a pH 7,4 alle concentrazioni di 15000 µg/mL e 7500 µg/mL prendendo come riferimento il lavoro di Leone et al. [70].

Per favorire la dispersione dello ZnO nella sospensione ed evitare aggregazione fra particelle, la sospensione è stata sottoposta a sonicazione per 1 ora all'interno di un bagnetto a ultrasuoni alla frequenza di 35 Hz.

Allestimento dei campioni Per entrambe le tipologie di batteri testati sono state allestite tre provette Eppendorf di capacità 2 mL. Una di queste contiene il controllo biotico, le altre due i campioni biotici alle concentrazioni di ZnO commerciale di 15000 µg/mL e 7500 µg/mL. Ogni provetta contiene un volume di 500 µL così ripartito:

- Controllo biotico:
 - 50 µL di inoculo standardizzato corrispondente al 10% del volume totale;
 - 225 µL di terreno liquido di coltura MHB doppiamente concentrato;
 - 225 µL di PBS sterile.
- Campione contenente ZnO a concentrazione 15000 µg/mL:
 - 50 µL di inoculo standardizzato corrispondente al 10% del volume totale;
 - 225 µL di terreno liquido di coltura MHB doppiamente concentrato;
 - 225 µL di sospensione di ZnO in PBS a concentrazione 30000 µg/mL.
- Campione contenente ZnO a concentrazione 7500 µg/mL:
 - 50 µL di inoculo standardizzato corrispondente al 10% del volume totale;
 - 225 µL di terreno liquido di coltura MHB doppiamente concentrato;
 - 225 µL di sospensione di ZnO in PBS a concentrazione 15000 µg/mL.

Il terreno di coltura è doppiamente concentrato, così come le sospensioni di ZnO in PBS, affinché al momento dell'allestimento dei campioni, si ottenga la concentrazione desiderata di ZnO in PBS.

Prima di inserire le sospensioni di ZnO nei campioni, queste vengono sottoposte all'azione di un agitatore vortex. Questo passaggio garantisce l'assenza di sedimenti di ZnO sul fondo delle provette.

Una volta preparati i campioni, questi vengono incubati per 24 ore alla temperatura di 20°C per *E.coli* e 37°C per *S.epidermidis*. L'incubatore viene impostato con velocità di 200 rpm. Le provette Eppendorf, come mostrato in figura 4.3, vengono posizionate in modo che la rotazione sia più efficace per garantire l'agitazione dei campioni.

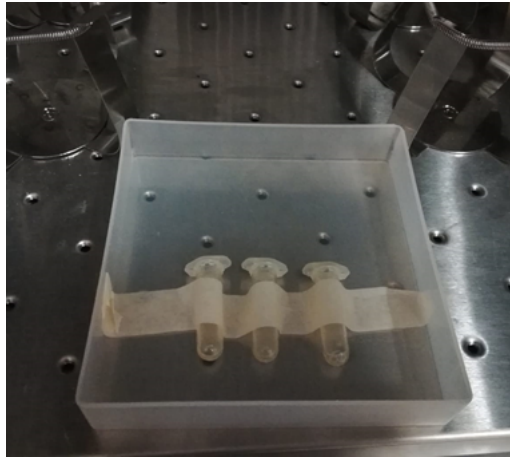


Figura 4.3: Posizionamento delle Eppendorf all'interno dell'incubatore.

Preparazione delle piastre Trascorse le 24 ore vengono preparate 11 diluizioni seriali (da 10^{-1} a 10^{-11}) del controllo biotico e dei campioni biotici. La prima diluizione si effettua con 100 μL di controllo biotico e 900 μL di acqua distillata. Lo stesso procedimento si utilizza nel caso dei campioni biotici. 100 mL di liquido colturale così diluito vengono inoculati nelle piastre di Petri su terreno MHA.

Le piastre di Petri vengono incubate per 24 ore a 20°C per *E.coli* e a 37°C per *S.epidermidis*.

Conta microbica Dopo le 24 ore si può procedere alla conta microbica delle colonie presenti sulle piastre per determinare le UFC/mL. Le UFC/mL vengono valutate così:

$$UFC/mL = (n \cdot F_D)/v \quad (4.1)$$

In questa equazione F_D rappresenta il fattore di diluizione, v il volume inoculato sulla piastra (100 mL) e n il numero di colonie contate.

4.3 Materiali utilizzati nella preparazione di film a base di WP

In questo lavoro di tesi sono stati sviluppati film a base di proteine del siero del latte. In particolare è stato utilizzato il concentrato proteico ®Milei 80. Queste WPC sono solubili e hanno un pH compreso fra 6,3 e 6,7. Sono state

ricavate dal siero del latte per ultrafiltrazione o con il metodo di spray drying. Nella tabella 4.1 è stata sintetizzata la composizione del concentrato proteico ®Milei 80.

Quantità di proteine	min. 80%
Quantità di lattosio	min. 8,5%
Quantità di polvere	min. 4%
Quantità di grasso	min. 7%
Umidità	min. 5%

Tabella 4.1: Proprietà del concentrato ®Milei 80.

Per realizzare i film si sfrutta la denaturazione termica delle proteine che permette la formazione di ponti disolfuro e la conseguente reticolazione. Come solvente si è utilizzata acqua distillata e una soluzione 1,5 M di idrossido di sodio per regolare il pH della sospensione proteica. Gli agenti plastificanti utilizzati sono stati i polioli glicerolo e sorbitolo. Sono stati inoltre preparati film a base di WP contenenti ZnO NPs.

Capitolo 5

Risultati e discussione

5.1 Ossido di zinco di sintesi

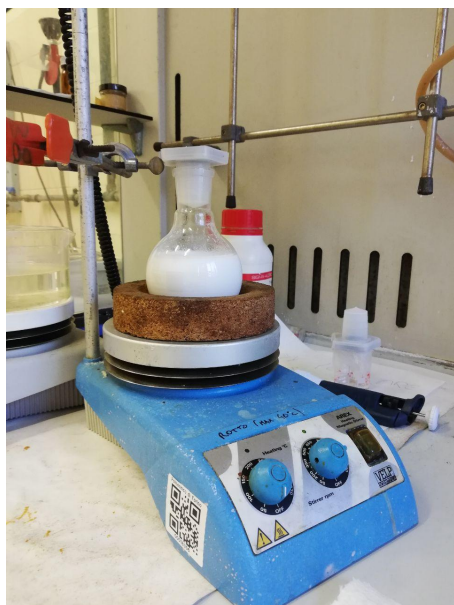
5.1.1 Sintesi dello ZnO nanostrutturato

Per la sintesi di ZnO nanostrutturato è stato utilizzato un metodo chimico di precipitazione e come riferimento si è preso il lavoro di Mitra et al. [66]. Al fine di ottenere un'adeguata quantità di materiale prodotto, Le le quantità di reagenti sono state però raddoppiate rispetto alla procedura originale [66].

Per la sintesi sono stati seguiti i seguenti step:

1. Sono stati disciolti 14,8 g di KOH in 64 mL di CH_3OH e 29,5 g di $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 120 mL di CH_3OH ;
2. Le due soluzioni sono state miscelate a temperatura ambiente utilizzando un agitatore magnetico (Figura 5.1a) e la soluzione così ottenuta è stata sottoposta ad agitazione a 60°C per 72 ore con riflusso. Il riflusso consente di mantenere costante il volume di metanolo che altrimenti evaporerebbe a 60°C . Per farlo avvenire, si collega la miscela a un condensatore ad acqua, il quale permette il raffreddamento del metanolo e la sua conseguente condensazione.
Il contenitore con la miscela è inserito in un bagno d'olio che viene riscaldato e la cui temperatura viene monitorata attraverso un sensore di temperatura (Figura 5.1b);
3. Al termine delle 72 ore, il prodotto ottenuto è stato sottoposto a 3 cicli di centrifugazione e lavaggio con metanolo. La centrifugazione è avvenuta a 4000 rpm per una durata di 30 minuti. Il lavaggio è stato effettuato per rimuovere i residui di KOH.

4. Il prodotto è stato essiccato in stufa per 24 ore alla temperatura di 50°C;
5. Il prodotto ottenuto è stato polverizzato per procedere alle caratterizzazioni e per poter effettuare le prove antimicrobiche. L'aspetto della polvere di ZnO è mostrato in Figura 5.2.



(a) Miscelazione delle sospensioni attraverso l'agitatore magnetico



(b) Miscela sottoposta a riflusso

Figura 5.1: Dettagli della sintesi di ZnO.



Figura 5.2: Polvere di ZnO.

Al termine della sintesi si sono ottenuti circa 7g di materiale.

5.1.2 Caratterizzazione dello ZnO nanostrutturato

5.1.2.1 Diffrattometria a raggi X

Lo spettro ottenuto dall'analisi XRD è mostrato in figura 5.3. I picchi di diffrazione sono stati riscontrati per valori di 2θ pari a $31,83^\circ$, $34,5^\circ$, $36,32^\circ$, $47,53^\circ$, $56,62^\circ$, $62,94^\circ$, $66,52^\circ$, $68,14^\circ$, $68,88^\circ$, $72,61^\circ$, $76,97^\circ$ e corrispondono rispettivamente ai riflessi dei piani (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) e (202). Il pattern di diffrazione mostra che il campione di ZnO possiede struttura esagonale wurzitica [66]. Inoltre, l'assenza di altri picchi suggerisce che non siano presenti altre fasi cristalline nel materiale [67].

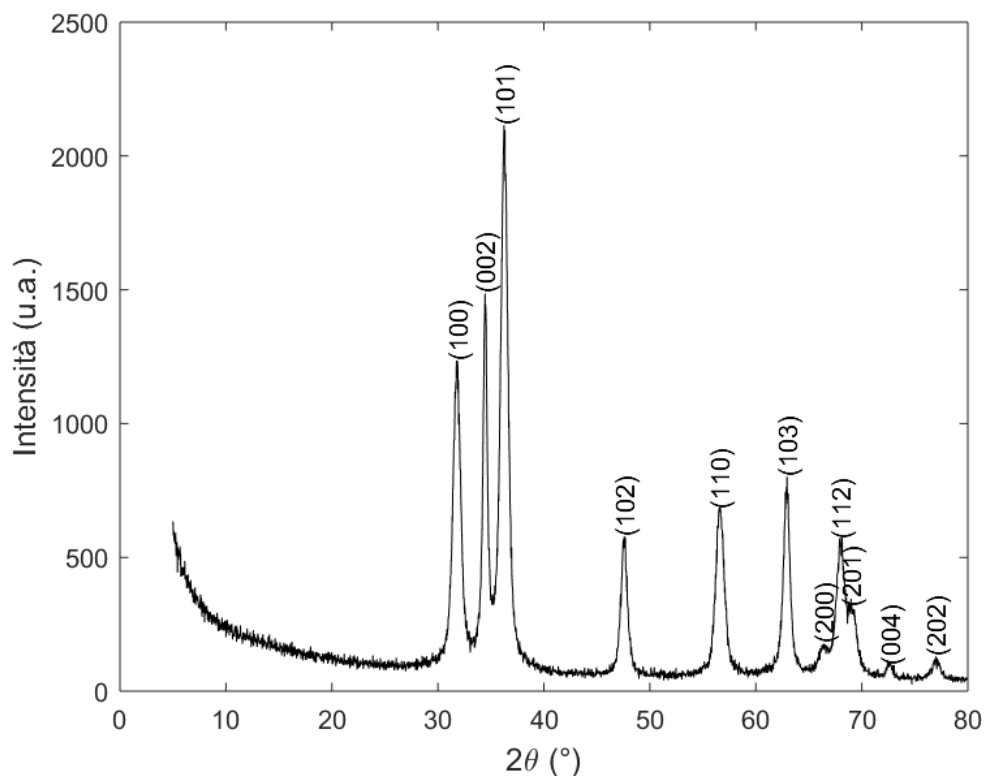


Figura 5.3: Spettro XRD di ZnO nanostrutturato

5.1.2.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

Dall'analisi di fisisorbimento di azoto è stata ottenuta l'isoterma di adsorbimento illustrata in figura 5.4. Confrontando la curva ottenuta con le isoterme di adsorbimento della classificazione IUPAC (Figura 4.1), si può concludere che l'isoterma ottenuta è di tipo IV e lo ZnO sintetizzato è di tipo mesoporoso.

Mediante il modello BET si è ottenuta un'area superficiale specifica di circa $63 \text{ m}^2/\text{g}$, e il volume medio specifico dei pori, ottenuto dal modello BJH, è pari a $0,14 \text{ cm}^3/\text{g}$.

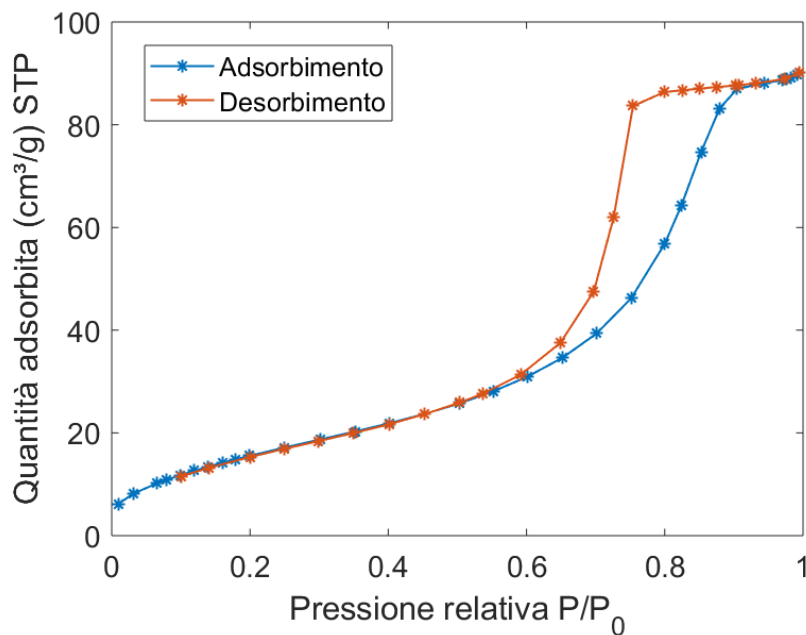


Figura 5.4: Isoterma di adsorbimento ZnO di sintesi.

La distribuzione porosimetrica, ottenuta mediante il modello BJH, è illustrata in figura (5.5). Sull'asse dell'ascisse si trova il diametro dei pori (w) mentre sulle ordinate la derivata del volume dei pori rispetto al diametro (dV/dw). Il diametro medio dei pori è $7,6 \text{ nm}$.

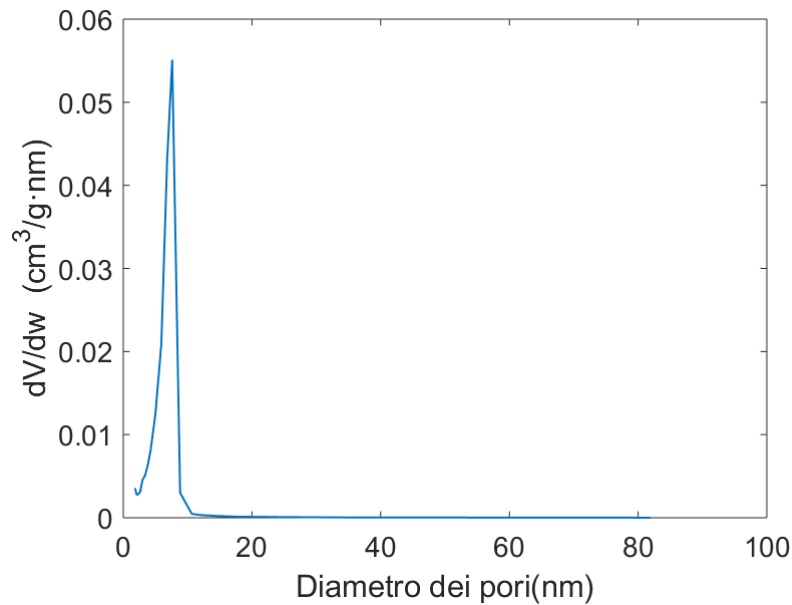


Figura 5.5: Distribuzione porosimetrica ZnO nanostrutturato.

5.1.2.3 Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo

Dall'analisi delle immagini ottenute con il FESEM si osserva la morfologia e la dimensione delle particelle. In particolare si nota che sono state ottenute nanoparticelle di forma pressoché sferica con diametro variabile, le quali formano aggregati micrometrici e sono interconnesse tra loro. Si sono ottenute immagini con ingrandimenti a 5000 (Figura 5.6), 25000 (Figura 5.7), 250000 X (Figura 5.8).

L'immagine con ingrandimento 250000 X è stata analizzata utilizzando il software Imagej. In particolare sono state selezionate 30 ROI (*Region of interest*) corrispondenti a 30 NPs e di queste è stato misurato il diametro. Le NPs ottenute hanno diametri variabili fra i 20 e i 45 nm. La dimensione media delle particelle è 36 ± 6 nm.

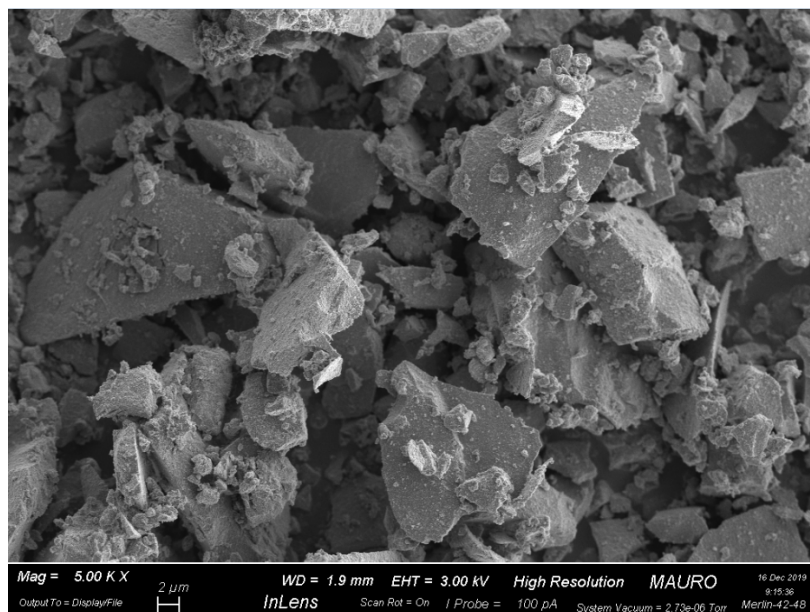


Figura 5.6: Immagine FESEM di ZnO di sintesi a ingrandimento 5000 X.

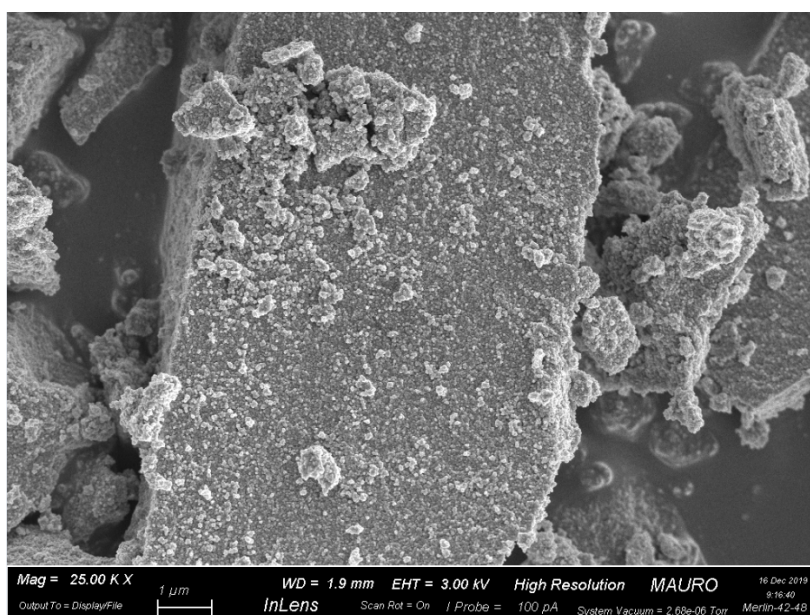


Figura 5.7: Immagine FESEM di ZnO di sintesi a ingrandimento 25000 X.

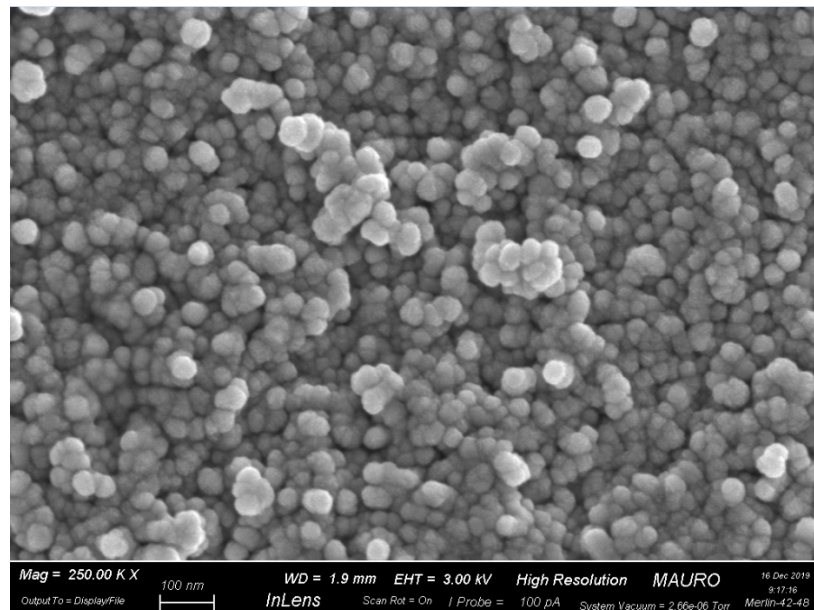


Figura 5.8: Immagine FESEM di ZnO di sintesi a ingrandimento 250000 X.

5.2 Ossido di zinco commerciale

5.2.1 Caratterizzazione di ZnO commerciale

5.2.1.1 Diffrazione a raggi X

Dall'analisi dello spettro XRD si riscontrano picchi di diffrazione per valori di angoli 2θ pari a $31,80^\circ$, $34,45^\circ$, $36,26^\circ$, $47,56^\circ$, $56,62^\circ$, $62,87^\circ$, $66,41^\circ$, $67,96^\circ$, $69,09^\circ$, $72,58^\circ$ e $76,97^\circ$ corrispondenti ai riflessi dei piani (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) e (202) (Figura 5.9). Come nel caso di ZnO di sintesi, lo spettro di ZnO suggerisce che si tratta di ZnO con struttura wurtzitica e indica l'assenza di altre fasi cristalline nel materiale.

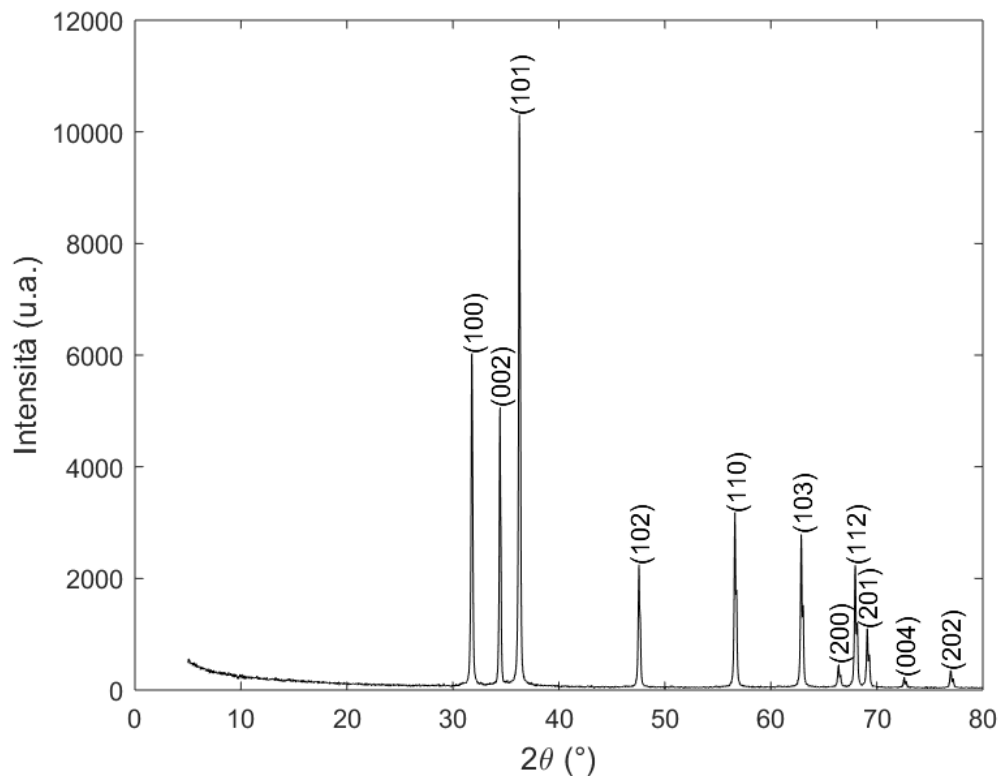


Figura 5.9: Spettro XRD di ZnO commerciale.

5.2.1.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

In figura 5.10 si riporta l'isoterma di adsorbimento dello ZnO commerciale. Il tipo di isoterma ottenuta ricade nella classificazione di isoterma di tipo II secondo la classificazione IUPAC (Figura 4.1). Questo tipo di isoterma è tipica dei materiali macroporosi e non-porosi [65]. L'area superficiale specifica è circa 9 volte minore rispetto allo ZnO di sintesi ed equivale a 7,67 m²/g. Il volume medio specifico dei pori è pari a 0,03 cm³/g, un ordine di grandezza inferiore rispetto allo ZnO di sintesi.

In figura 5.11 si può osservare la distribuzione porosimetrica del materiale e si nota che il diametro dei pori è molto variabile.

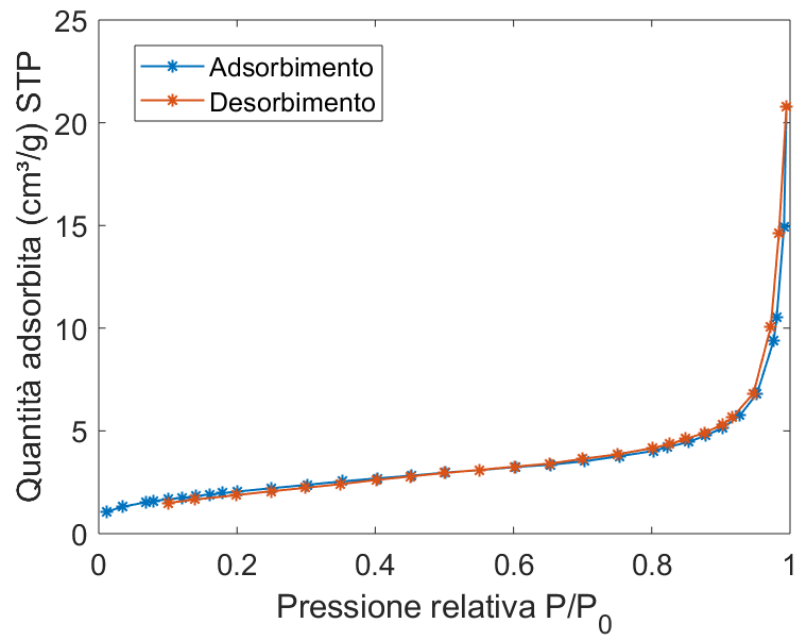


Figura 5.10: Isotherma di adsorbimento di ZnO commerciale.

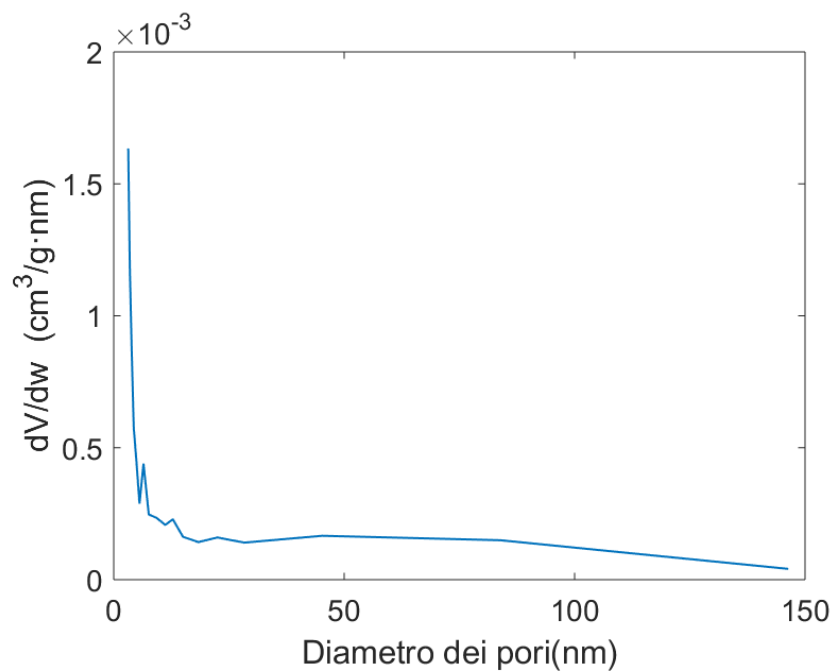


Figura 5.11: Isotherma di adsorbimento di ZnO commerciale.

5.2.1.3 Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo

Nelle figure 5.12, 5.13, 5.14 sono mostrate le immagini FESEM con ingrandimenti rispettivamente di 5000, 25000, 25000 X. Si nota che in questo caso le particelle hanno dimensioni maggiori e presentano una forma allungata.

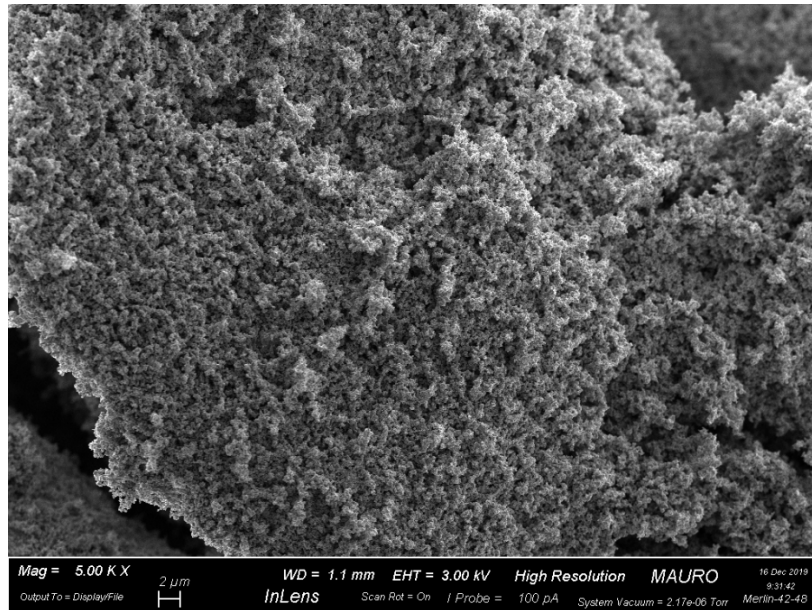


Figura 5.12: Immagine FESEM di ZnO commerciale a ingrandimento 5000 X.

Le immagini sono state anche in questo caso analizzate con ImageJ, misurando 30 ROI sia in direzione longitudinale che in direzione trasversale rispetto al lato più lungo della particella. La dimensione delle particelle in direzione longitudinale varia fra 55 e 360 nm e la dimensione media è 155 ± 66 nm. In direzione trasversale la dimensione varia fra 30 e 220 nm e la dimensione media è 80 ± 42 nm. Come già osservato dall'immagine, si nota una grande variabilità fra la dimensione delle particelle e ciò è confermato dall'elevato valore di deviazione standard. In figura 5.15 si confrontano le dimensioni medie delle particelle di ZnO di sintesi e di ZnO commerciale nelle due direzioni.

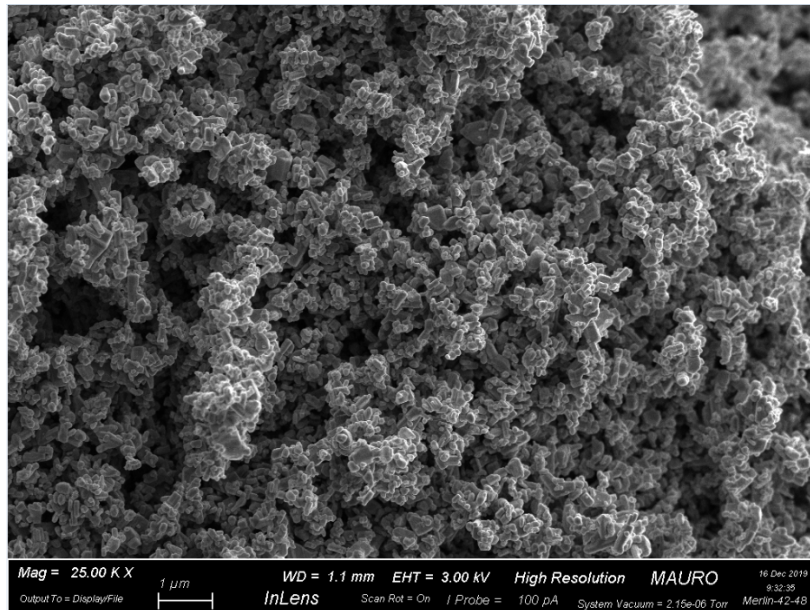


Figura 5.13: Immagine FESEM di ZnO commerciale a ingrandimento 25000 X.

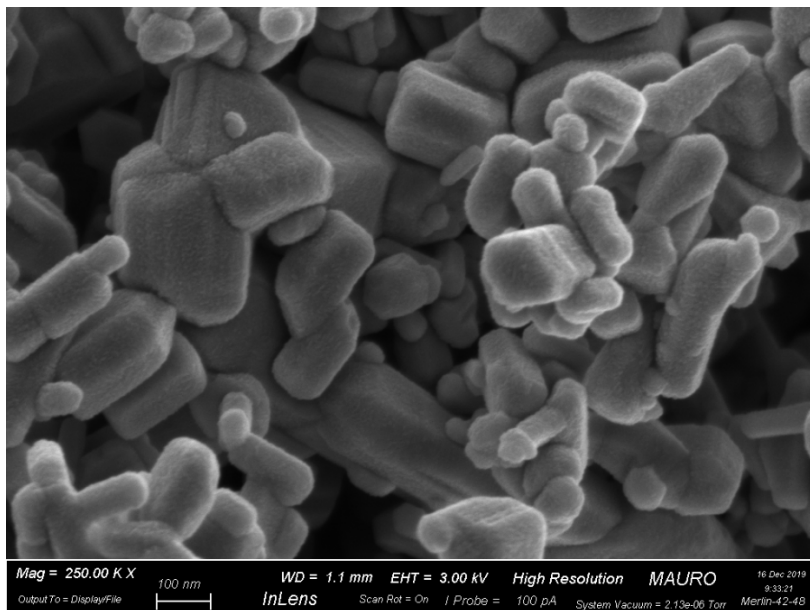


Figura 5.14: Immagine FESEM di ZnO commerciale a ingrandimento 250000 X.

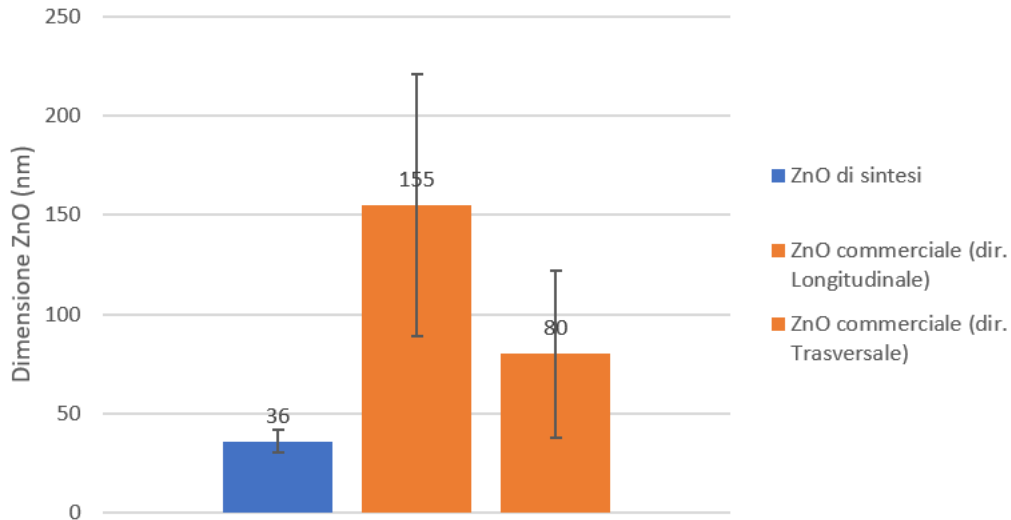


Figura 5.15: Dimensione media ZnO.

5.3 Film a base di proteine del siero del latte

In questo lavoro di tesi sono stati sviluppati film a base di proteine del siero del latte. In particolare sono state utilizzate le WPC @Milei 80. Per i dettagli relativi alla composizione di questo concentrato di proteine si veda la sezione 4.3.

5.3.1 Preparazione di film a base di WPC

Per realizzare i film proteici si è adottato il metodo di evaporazione del solvente, utilizzando come riferimento il lavoro svolto da Tricoli nella sua tesi di laurea [68]. Sono stati seguiti i seguenti passaggi:

1. Preparazione della sospensione di @Milei 80 in acqua: sono stati dispersi 10,4 g di WPC in acqua in modo tale ottenere 100 mL di sospensione a concentrazione 104 g/L di proteine;
2. Neutralizzazione della sospensione: è stata preparata una soluzione di soda 1,5 M e aggiunta alla sospensione per alzare il livello del pH della sospensione da 5,8 a 7. Il controllo è stato effettuato attraverso l'utilizzo del pHmetro;
3. Denaturazione termica delle proteine: la beuta contenente la sospensione è stata immersa in un bagnetto termostatico a 90°C per 20 minuti.

Come spiegato nella sezione 2.2.1, la denaturazione termica modifica la struttura tridimensionale delle proteine e favorisce la formazione di legami disolfuro intermolecolari che sono i responsabili del processo di gelificazione.

La sospensione viene mantenuta costantemente in agitazione da un agitatore magnetico posizionato al di sotto del bagnetto termostatico;

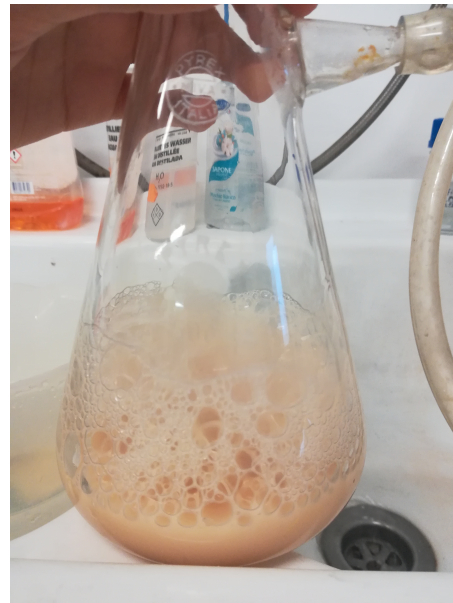
4. Raffreddamento della sospensione: la beuta viene inserita all'interno di un contenitore con acqua fredda in modo da far abbassare la temperatura della sospensione;
5. Aggiunta dell'agente plastificante: vengono aggiunti alla sospensione 6,24 g di plastificante. Questa quantità corrisponde al 60% su base secca;
6. Degasaggio: la sospensione viene sottoposta a degasaggio sottovuoto con l'ausilio di una pompa collegata alla beuta. Questo passaggio serve per eliminare i gas che potrebbero portare alla formazione di bolle all'interno del film;
7. Riempimento degli stampi: la sospensione viene colata in stampi in una quantità tale da garantire un rapporto volume/superficie pari a 0,135;
8. Essiccamento: gli stampi sono stati posizionati in stufa per 3 ore a 60 °C per permettere l'evaporazione del solvente.

5.3.2 Preparazione di film a base di WPC funzionalizzati con ZnO commerciale

Per la preparazione di film funzionalizzati con ZnO si è seguita una procedura simile a quella descritta nella sezione 5.3.1. In questo caso si è preparata una sospensione di concentrato proteico ®Milei 80 a 104 g/L e una sospensione di ZnO a concentrazione 15000 µg/mL. Inizialmente si è preparato un volume minore di sospensione proteica per poi poter raggiungere il volume di 100 mL tramite l'aggiunta della sospensione di ZnO in acqua. Prima di unire le due sospensioni, la sospensione di ZnO è stata sottoposta a sonicazione in un bagnetto a ultrasuoni per evitare la formazione di aggregati di particelle e favorire la dispersione delle stesse nell'acqua. Successivamente i passaggi da seguire sono i medesimi del caso descritto nella sezione 5.3.1.



(a) Fase di denaturazione.



(b) Fase di degasaggio

Figura 5.16: Dettagli della preparazione di film a base di WPC.

5.3.3 Preparazione di film multistrato a base di WPC

Sono stati realizzati anche dei film multistrato in delle piastre multiwell da 12 pozzetti. I film multistrato sono composti da uno strato sottostante di film a base di WPC non funzionalizzato, ricoperti da uno strato di film funzionalizzato con ZnO. La procedura descritta nella sezione 5.3.1 è stata impiegata per realizzare lo strato alla base. Lo strato superiore è stato ottenuto il giorno seguente colando sul primo una sospensione contenente ZnO preparata secondo la procedura alla sezione 5.3.2. In figura 5.17 è rappresentata in maniera schematica la struttura dei film multistrato. Sono stati preparati film multistrato di due tipi: uno in cui i due film hanno uguale spessore, un altro in cui lo spessore del film funzionalizzato con ZnO è il doppio rispetto a quello non funzionalizzato.

È stata effettuata questa prova per poter valutare quanto le particelle di ZnO riescano ad attraversare lo strato di film non funzionalizzato e raggiungere la superficie sottostante.

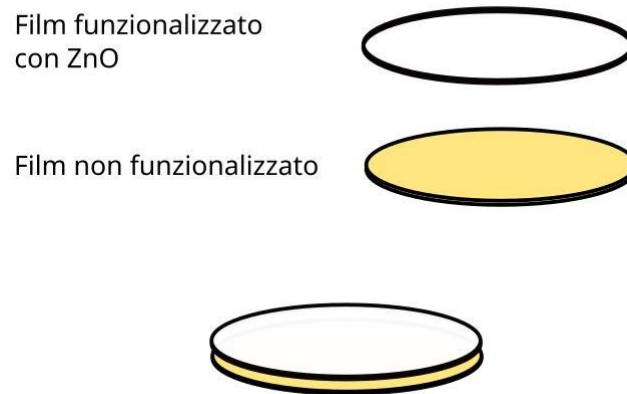


Figura 5.17: Rappresentazione schematica dei film multistrato.

5.3.4 Scelta dell'agente plastificante

I film a base di WPC sono stati preparati utilizzando come agenti plastificanti il sorbitolo e il glicerolo con concentrazione 60% su base secca. La presenza dell'agente plastificante è fondamentale per la formazione dei film perché permette di ridurre la loro fragilità e aumentare la loro flessibilità.

Il sorbitolo ha dato origine a film fragili che frequentemente si rompono durante il tentativo di staccarli dallo stampo. È stato scelto quindi il glicerolo come agente plastificante perché, in linea con i risultati riscontrati in letteratura, riesce a garantire migliore elongazione nei film [30] e di conseguenza migliore flessibilità.

5.4 Risultati della conta microbica

Per la valutazione dell'attività antimicrobica di ZnO commerciale è stato eseguito il metodo di *Broth macro-dilution* in provette Eppendorf di capacità 2 mL seguendo la procedura descritta nella sezione 4.2. Sono stati testati il batterio Gram-positivo *S.epidermidis* (LMG 10474) e il Gram-negativo *E.coli* (LMG 08063) utilizzando concentrazioni di ZnO pari 7500 $\mu\text{g/mL}$ e 15000 $\mu\text{g/mL}$. Tali concentrazioni sono state scelte prendendo come riferimento il lavoro di Leone et al. [70].

Sono stati confrontati i) un controllo biotico, privo dell'agente antimicrobico, costituito dall'inoculo standardizzato, dal terreno di coltura MHB e da PBS sterile; ii) un campione biotico contenente una sospensione di ZnO in PBS a

concentrazione 7500 $\mu\text{g/mL}$, oltre all'inoculo standardizzato e al terreno di coltura MHB; iii) un campione biotico contenente una sospensione di ZnO in PBS a concentrazione 15000 $\mu\text{g/mL}$, l'inoculo standardizzato e il terreno di coltura MHB.

In tabella 5.1 sono riportati i risultati della conta microbica per i due batteri testati, espressi come UFC/mL. In tabella è inoltre indicato il valore di diluizione cui la conta microbica si riferisce.

	Diluizione	UFC/mL Controllo biotico	UFC/mL Campione biotico (ZnO 7500 $\mu\text{g/mL}$)	UFC/mL Campione biotico (ZnO 15000 $\mu\text{g/mL}$)
<i>S.epidermidis</i>	10^{-10}	$4 \cdot 10^{13}$	$3 \cdot 10^{11}$	-
<i>E.coli</i>	10^{-11}	$5,8 \cdot 10^{14}$	$1,7 \cdot 10^{13}$	$1,3 \cdot 10^{13}$

Tabella 5.1: Risultati conta microbica del controllo biotico, del campione biotico a concentrazione di ZnO 7500 $\mu\text{g/mL}$ e del campione biotico a concentrazione di ZnO 15000 $\mu\text{g/mL}$ nel caso di *S.epidermidis* ed *E.coli*.

Analizzando i valori riportati in tabella si osserva che, nonostante non sia stato possibile, per entrambi i batteri, determinare il valore di MIC, tutte e due le sospensioni di ZnO hanno dimostrato una azione antibatterica. In particolare, dall'analisi della tabella si può rilevare un migliore effetto antimicrobico nei confronti dei batterio Gram-positivo *S.epidermidis*. I valori di UFC/mL dei campioni corrispondono a $3 \cdot 10^{11}$ e zero, per le concentrazioni di ZnO di 7500 $\mu\text{g/mL}$ e 15000 $\mu\text{g/mL}$ rispettivamente. Questi valori sono inferiori rispetto a quello ottenuto per il controllo biotico, pari a $4 \cdot 10^{13}$ UFC/mL. Nel caso dei batterio Gram-negativo *E.coli*, la differenza fra il controllo biotico e i campioni è invece meno significativa. Per i campioni i valori di UFC/mL sono simili tra loro e corrispondono a $1,7 \cdot 10^{13}$ e $1,3 \cdot 10^{13}$, per le concentrazioni di ZnO di 7500 $\mu\text{g/mL}$ e 15000 $\mu\text{g/mL}$ rispettivamente. Questi non sono sensibilmente inferiori rispetto al valore ottenuto per il controllo biotico pari a $5,8 \cdot 10^{14}$ UFC/mL. Relativamente al batterio Gram-negativo testato, contrariamente a quanto riscontrato in letteratura [55], una maggiore concentrazione di ZnO, 15000 $\mu\text{g/mL}$, non ha consentito di ottenere un miglior effetto antimicrobico. Dai risultati ottenuti, è quindi possibile

rilevare una più efficace azione antimicrobica dello ZnO commerciale nei confronti del batterio Gram-positivo testato. Questo effetto può essere spiegato dalla diversa composizione della parete batterica. In particolare, i batteri Gram-negativi, caratterizzati da un sottile strato di peptidoglicano, sono più resistenti alla perossidazione lipidica in presenza di specie reattive all'ossigeno (ROS); nel caso dei batteri Gram-positivi, invece, le particelle di ZnO tendono a rimanere intrappolate nello spesso strato di peptidoglicano con conseguenti danni alla struttura cellulare [71].

In figura 5.18 si osserva un esempio dei risultati ottenuti per una coltura batterica di *E.coli*. Si nota che la crescita microbica non sia stata inibita completamente, ma sia comunque diminuita.

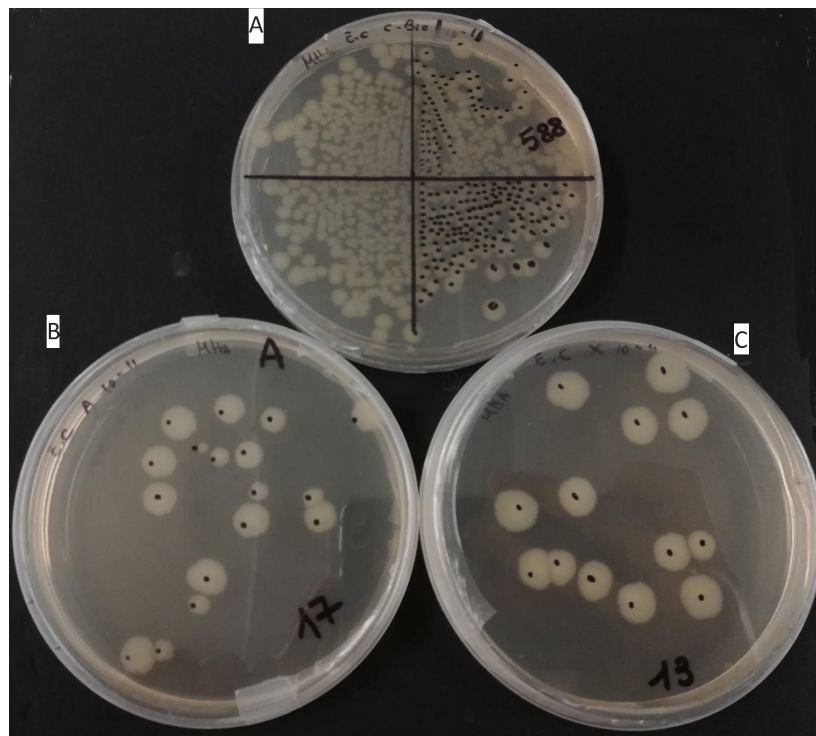


Figura 5.18: Confronto della crescita microbica con una diluizione 10^{-11} nel controllo biotico (A), nel campione biotico con concentrazione di ZnO di 7500 µg/mL (B) e nel campione biotico con concentrazione di ZnO di 15000 µg/mL (C) - *E.coli*.

Capitolo 6

Conclusioni e sviluppi futuri

In questo lavoro sono stati analizzati a partire dalla letteratura scientifica diversi tipi di materiali utilizzati nel *wound dressing* per evidenziarne le peculiarità e capire come queste possano essere sfruttate per adattarli a diversi tipi di ferite. Si sono evidenziati i limiti delle medicazioni tradizionali e le possibilità di superarli grazie all'utilizzo di medicazioni avanzate. Fra queste troviamo film, schiume, idrocolloidi e idrogeli che possono essere ottenuti a partire da prodotti sintetici o naturali come proteine e polisaccaridi. Attualmente sul mercato sono presenti oltre 3000 tipi di *dressing* differenti, tuttavia nessuno di questi può essere considerato materiale d'elezione nel *wound healing* [22].

Un approccio che consente di ottimizzare ulteriormente il processo di guarigione della ferita è la realizzazione di materiali bionanocompositi composti da matrici di idrogeli e incorporati con nanoparticelle. Le nanoparticelle sono degli ottimi agenti antimicrobici perché agiscono con diversi meccanismi d'azione e grazie a questa caratteristica riescono a contrastare il problema dell'antibiotico resistenza. Sono stati realizzati molti tipi di *dressing* bionanocompositi, tra i quali i più frequenti sono quelli a base di chitosano incorporati con nanoparticelle metalliche o di ossidi di metalli.

L'utilizzo di materiali naturali sta suscitando un notevole interesse perché permette di realizzare medicazioni biocompatibili, biodegradabili e non tossiche. Queste proprietà sono state confermate per i film a base di proteine del siero del latte dagli studi di Gilbert et al. [32] [38], per questo le WP, che sono state ampiamente utilizzate nel *food packaging*, possono essere pensate come materiale per la realizzazione di idrogeli da utilizzare nel *wound*

dressing.

In questo lavoro di tesi sono stati realizzati materiali bionanocompositi aventi proprietà antibatteriche da poter utilizzare come materiali nel *wound dressing*. I bionanocompositi sono stati realizzati incorporando nanoparticelle di ossido di zinco in una matrice proteica realizzata a partire da un concentrato di proteine del siero del latte.

Le nanoparticelle di ossidi di metalli sono molto utilizzate come materiali antibatterici perché attraverso meccanismi diversi riescono a causare tossicità nelle cellule batteriche. In questo lavoro sono state sintetizzate nanoparticelle di ossido di zinco attraverso il metodo di sintesi per precipitazione prendendo come riferimento il lavoro di Mitra et al. [66], raddoppiando però le quantità dei reagenti. Successivamente, le ZnO NPs sono state caratterizzate attraverso tre metodi diversi: la diffrattometria a raggi X (XRD), l'analisi di fisisorbimento di azoto e la Microscopia a Scansione Elettronica a emissione di campo (FESEM). Dai risultati delle caratterizzazioni si è notato che il materiale ottenuto è ZnO con struttura wurtzitica, inoltre non sono state osservate altre fasi nel suo reticolo cristallino. L'area superficiale specifica è di circa $63 \text{ m}^2/\text{g}$ e il volume medio specifico dei pori è $0,14 \text{ cm}^3/\text{g}$. Si è osservata anche una distribuzione monomodale della dimensione dei pori, con un massimo intorno a $7,6 \text{ nm}$. Dall'analisi delle immagini ottenute con il FESEM e successivamente analizzate con il software *ImageJ* si osserva che le NPs ottenute hanno forma pressoché sferica con diametro variabile fra 20 e 45 nm .

Dai risultati delle caratterizzazioni si osserva che non ci sono state differenze sostanziali rispetto alle sintesi di lavori precedenti in cui non erano state raddoppiate le quantità dei reagenti. Da questo si può concludere che il metodo di sintesi adottato è riproducibile. Sarebbe auspicabile sperimentare un metodo di sintesi differente che utilizzi come solvente un composto diverso dal metanolo, che sia quindi non tossico e più ecosostenibile.

Sono stati utilizzati gli stessi metodi per la caratterizzazione dello ZnO commerciale (Sigma-Aldrich). Lo spettro di diffrazione ottenuto presenta anche in questo caso picchi tipici di ZnO con struttura wurtzitica, senza evidenza di altre fasi. Le altre caratterizzazioni hanno però portato a risultati differenti. Le particelle in questo caso presentano una forma allungata e dimensioni molto variabili: $55\text{-}360 \text{ nm}$ in direzione longitudinale e $30\text{-}220 \text{ nm}$ in direzione trasversale. L'area superficiale specifica è circa 9 volte minore rispetto allo ZnO di sintesi ($7,67 \text{ m}^2$) e il volume specifico dei pori ($0,03 \text{ cm}^3/\text{g}$) misura un ordine di grandezza in meno rispetto alle ZnO NPs. Anche

la distribuzione porosimetrica è molto variabile.

Per la realizzazione della matrice si è scelto di ricorrere all'utilizzo di materiali naturali (nello specifico proteine) perché, nonostante presentino peggiori proprietà meccaniche, hanno caratteristiche molto migliori di biocompatibilità e biodegradabilità, le quali sono di vitale importanza per applicazioni in biomedicina. I film sono stati realizzati a partire dal concentrato proteico di WP ®Milei 80 e sono stati ottenuti con il metodo di *solvent casting* sfruttando la denaturazione termica delle WP che avviene fra 80°C e 90°C. Si sono utilizzati acqua come solvente, una soluzione 1,5 M di NaOH come correttore di pH, sorbitolo e glicerolo (concentrazione 60% su base secca) come agenti plastificanti. I film ottenuti utilizzando sorbitolo come plasticizzante, presentavano elevata fragilità e non riuscivano a essere estratti dallo stampo senza essere spezzati. È stato quindi scelto il glicerolo come agente plastificante perché i film risultavano più flessibili. Sarebbe importante valutare come la concentrazione di plasticizzante influenzi le proprietà meccaniche dei film e scegliere di conseguenza il valore ideale per ottenere film con specifiche caratteristiche di flessibilità e resistenza meccanica. Sono stati realizzati anche film funzionalizzati con ZnO commerciale e film multistrato composti da uno strato inferiore non funzionalizzato e uno superiore funzionalizzato. Dall'analisi visiva dei film si sono notati cambiamenti nel film sottostante non funzionalizzato e questo porta a pensare che lo ZnO resti incorporato nella matrice una volta che la solidificazione è completa. In questo ultimo caso sarebbe importante valutare se le particelle riescano a oltrepassare lo strato inferiore e a raggiungere la superficie su cui vengono applicati.

In questo lavoro non sono state effettuate caratterizzazioni di alcun tipo sui film a base di WP. È necessario in futuro valutare le proprietà di *swelling*, la permeabilità all'ossigeno e al vapore, la solubilità, la morfologia dei film e la distribuzione di particelle di ZnO al loro interno. Tutte queste caratteristiche sono importanti per stabilire se questo tipo di film possa avere successo nel campo del *wound healing*. In particolare lo *swelling* è importante per valutare la quantità di essudato che potrebbe venire assorbita dal film. La permeabilità permette di capire le condizioni in cui si troverebbe la ferita durante l'utilizzo di medicazioni a base di WP e la solubilità permette di valutare il processo degradazione del film. In ricerche future sarebbe importante valutare inoltre la biocompatibilità e la non tossicità dei film nei confronti delle cellule cutanee effettuando colture *in vitro* e successivamente *in vivo* di fibroblasti e cheratinociti su questi film.

La valutazione dell'attività antimicrobica di ZnO è stata eseguita *in vitro* con il metodo di *Broth macro-dilution* sui ceppi batterici *E.coli* (LMG 08063) e *S.epidermidis* (LMG 10474). Sono state testate sospensioni di ZnO commerciale in PBS sterile (pH 7,4) alle concentrazioni di 15000 µg/mL e 7500 µg/mL. Si sono ottenuti risultati migliori su *S.epidermidis*, tuttavia, non è stata determinata in nessuno dei due casi la concentrazione minima inibitoria, è quindi opportuno testare concentrazioni maggiori di antimicrobico e utilizzare altri metodi per la valutazione dell'attività antimicrobica. Contrariamente a quanto riscontrato in letteratura, l'aumento di concentrazione di ZnO non ha portato a risultati migliori.

Non sono state effettuate prove antimicrobiche utilizzando ZnO di sintesi, che saranno necessarie per valutare l'effetto antimicrobico delle NPs sintetizzate e confrontarlo con quello di ZnO commerciale. L'attività antimicrobica è più efficace nel caso di maggiori concentrazioni di ZnO, minori dimensioni delle particelle e maggiore area superficiale. Sulla base di queste considerazioni, è prevedibile che lo ZnO nanostrutturato, sintetizzato in questo lavoro, risulti più efficace del materiale commerciale.

Altre prove necessarie sono la valutazione dell'effetto antimicrobico dei film funzionalizzati con ZnO per osservare come varia l'antimicrobicità rispetto allo ZnO non incorporato nei film. È inoltre opportuno quantificare il rilascio di ioni Zn^{2+} sia dalle NPs incorporate nei film, sia dalle NPs in sospensione, attraverso delle celle a diffusione, dato che il ruolo di Zn^{2+} è fondamentale per determinare le proprietà antimicrobiche delle ZnO NPs. Uno sviluppo di questa ricerca potrebbe basarsi sul valutare se gli ioni Zn^{2+} sono responsabili di citotossicità nei confronti di fibroblasti e cheratinociti.

In letteratura sono presenti molti studi riguardanti l'attività antibatterica e antifungina delle ZnO NPs, sarebbe interessante approfondire anche l'attività antivirale di questi materiali. Sono presenti solo pochi studi riguardanti l'attività antivirale di nanoparticelle contro alcuni tipi di virus come HIV-1, il virus dell'epatite B, il virus herpes simplex di tipo 1, il virus dell'influenza [72]. Si è visto che gli antivirali utilizzati sono ostacolati dalla loro scarsa solubilità, breve emivita e presenza di ceppi resistenti. Le nanoparticelle potrebbero essere quindi utilizzate, grazie alla loro elevata area superficiale, come *carrier* di sostanze antivirali per ottenere un rilascio controllato e una riduzione degli effetti indesiderati nelle cellule non infettate. Utilizzando NPs di argento si sono avuti buoni risultati grazie all'interazione degli ioni Ag^+ con molecole contenenti fosforo e zolfo, fra cui proteine, DNA e RNA. Questo ha influenzato varie fasi del ciclo vita del virus come la replicazione

di DNA e RNA e la sintesi delle proteine [73]. Studi sull'attività antivirale delle ZnO NPs hanno però dimostrato che la produzione di ROS e il rilascio di Zn^{2+} producono effetti citotossici. Per limitare questi effetti, in uno studio condotto da Ghaffari et. al [74] sull'attività antivirale delle ZnO NPs contro il virus influenzale H1N1, le NPs sono state ricoperte da un *coating* in glicole polietilenico (PEG). In tal modo si sono ottenuti buoni risultati solo dopo l'ingresso dei virioni nella cellula; non ne è stato invece contrastato in alcun modo l'ingresso. Dato che le nanoparticelle agiscono danneggiando il DNA, l'RNA e interferendo con la sintesi delle proteine del virus, potrebbero danneggiare allo stesso modo i componenti della cellula ospite. Si rende necessario quindi studiare gli effetti citotossici delle NPs e l'effetto di diverse tipologie di *coating*.

Un approccio ancora migliore sarebbe quello di agire sui virus prima ancora che questi si attacchino alla cellula, così da evitare i danni causati dalle nanoparticelle alle cellule ospiti. A tal fine si potrebbe utilizzare un approccio biomimetico funzionalizzando le ZnO NPs con molecole simili ai recettori cellulari con cui il virus forma il legame. In questo modo le proteine del capsido, che normalmente si legano ai recettori cellulari, si legherebbero alla superficie delle nanoparticelle invece che alla cellula evitando così l'ingresso al suo interno. Un approccio di questo tipo è stato utilizzato da Baram-Pinto et al.[75] per verificare l'attività antivirale di nanoparticelle di argento contro il virus herpes simplex di tipo I. Le glicoproteine del capsido del virus si legano all'eparan solfato presente sulla membrana cellulare. Baram-Pinto et al. hanno quindi funzionalizzato le NPs con mercaptoetansolfonato in modo che le glicoproteine del capsido si legassero a esse piuttosto che all'eparan solfato della membrana cellulare.

Ringraziamenti

Vorrei iniziare ringraziando le professoresse Barbara Onida e Francesca Bosco per la disponibilità e per avermi guidato nella stesura di questo elaborato, trovando una soluzione ai problemi causati dall'emergenza COVID-19. Un sentito grazie anche alla Dott.ssa Chiara Mollea, i suoi insegnamenti sono stati fondamentali. Grazie a Sara, per avermi dato dei consigli preziosi e grazie a Paolo, per la sua professionalità e infinita disponibilità.

Giunta a questo traguardo che sembrava irraggiungibile, mi guardo indietro e penso a tutti gli ostacoli incontrati, la fatica e i sacrifici compiuti. Il mio pessimismo non mi impedisce però di notare anche ciò che di positivo c'è stato: la soddisfazione, i successi, la crescita personale, il supporto e l'affetto delle persone che mi hanno circondato in questi anni. Vorrei quindi spendere qualche parola per ringraziare coloro che hanno reso questo percorso più piacevole, più leggero e che sono stati indispensabili per affrontare i momenti più bui e gli ostacoli che sembravano insormontabili.

Grazie ai miei genitori per avermi sempre dato fiducia e per aver creduto in me quando io stessa stentavo a farlo. Grazie a mia sorella Giulia per essere un grande punto di riferimento per me. Grazie al nonno Turi per essere il mio più grande sostenitore.

Vorrei ringraziare i miei colleghi, nonché amici, Federica, Umberto e Ciccio. I progetti e gli esami insieme a voi sono stati meno pesanti, persino divertenti delle volte. Grazie anche per avermi consigliato sempre, nonostante foste consapevoli che alla fine avrei fatto di testa mia.

Grazie ai miei compagni di viaggio Gianluigi, Camilla, Silvia, Federica, Letizia, Eugenio, Giulio, Lorena, Alessia e Roberta per avermi regalato la leggerezza di cui avevo bisogno. Siete stati una boccata d'aria fresca.

Grazie a tutte le persone che in questi anni hanno animato il primo piano (e non solo) del Collegio Einaudi. Descrivere in poche parole tutto quello che abbiamo vissuto insieme e quanto mi avete arricchito sarebbe riduttivo.

Grazie per aver sopportato le mie infinite lamentele e i miei dubbi continui. Siete l'unico aspetto su cui non ne ho mai avuti, risceglierei sempre e comunque di vivere in Collegio con voi. Grazie in particolare a Luigi per il suo cuore grande e a Carmine per essere sempre presente.

Grazie a due persone incontrate in Collegio che tuttora considero fondamentali per me; a Eva, per avermi consigliato e aiutato in ogni occasione e ad Antonio perché, nonostante la distanza e nonostante il fatto che siamo due persone molto fredde, sento di poter sempre contare su di te.

Grazie a Salvatore per aver condiviso alti e bassi di questo percorso e per aver accettato gli aspetti più brutti di me, soprattutto nell'ultimo periodo.

Grazie di cuore.

Bibliografia

- [1] S. Standring, *Anatomia del GRAY Le basi anatomiche per la pratica clinica*, 40^a edizione
- [2] A. K. Dąbrowska, G.M. Rotaru, S. Derler, F. Spano, M. Camenzind, S. Annaheim, R. Stampfli, M. Schmid and R. M. Rossi, *Materials used to simulate physical properties of human skin*, 2016
- [3] *Layers of the Skin*, URL:<https://medium.com/@cindymeza/layers-of-the-skin-fa974368418>
- [4] Niehues H, Bouwstra JA, El Ghalbzouri A, Brandner JM, Zeeuwen PLJM, van den Bogaard EH. *3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function*, Exp Dermatol. 2018;27(5):501-511. doi:10.1111/exd.13531
- [5] M. Egert, F. Simmering, *The Microbiota of the Human Skin.*, Adv Exp Med Biol. 2016;902:61-81. doi:10.1007/978-3-319-31248-4_5
- [6] Wong, Victor W. M.D.; Martindale, Robert G. M.D., Ph.D.; Longaker, Michael T. M.D., M.B.A.; Gurtner, Geoffrey C. M.D., *From Germ Theory to Germ Therapy, Plastic and Reconstructive Surgery*, November 2013 - Volume 132 - Issue 5 - p 854e-861e doi: 10.1097/PRS.0b013e3182a3c11e
- [7] Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, Galiano RD., *Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model.*, Wound Repair Regen. 2009;17(3):354-359. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00489.x
- [8] Johnson TR, Gómez BI, McIntyre MK, et al., *The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing.*, Int J Mol Sci. 2018;19(9):2699. 2018 Sep 11. doi:10.3390/ijms19092699
- [9] Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. *Wound healing - A literature review.* An Bras Dermatol. 2016 Sep-Oct;91(5):614-620. doi: 10.1590/abd1806-4841.20164741.
- [10] Guo, S, and L A Dipietro., *Factors affecting wound healing.*, Journal of dental research vol. 89,3 2010: 219-29. doi:10.1177/0022034509359125

-
- [11] Morton LM, Phillips TJ., *Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds.*, J Am Acad Dermatol. 2016;74(4):589-606. doi:10.1016/j.jaad.2015.08.068
- [12] Suarato G, Bertorelli R, Athanassiou A., *Borrowing From Nature: Biopolymers and Biocomposites as Smart Wound Care Materials.*, Front Bioeng Biotechnol. 2018 Oct 2;6:137. doi: 10.3389/fbioe.2018.00137.
- [13] Hayes, T.R. and Su, B., *Wound dressings*, Electrospinning for Tissue Regeneration 317-339, 2011, doi:10.1533/9780857092915.2.317
- [14] Kawasumi, Aiko Sagawa, Natsume Hayashi, Shinichi Yokoyama, Hitoshi Tamura, Koji, *Wound Healing in Mammals and Amphibians: Toward Limb Regeneration in Mammals.*, Current topics in microbiology and immunology. 367. 2012, doi:10.1007/82_2012_305.
- [15] Broussard, Karen Powers, Jennifer., *Wound Dressings: Selecting the Most Appropriate Type. American journal of clinical dermatology.*, 2013, doi:10.1007/s40257-013-0046-4.
- [16] Bueno, Juan Demirci, Fatih Baser, K. Husnu Can, *Antimicrobial strategies in novel drug delivery systems, applications in the treatment of skin and soft tissue infections.*, 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-811079-9.00016-1.
- [17] Shi C, Wang C, Liu H, Li Q, Li R, Zhang Y, Liu Y, Shao Y, Wang J., *Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds.*, Front Bioeng Biotechnol. 2020 Mar 19;8:182. doi: 10.3389/fbioe.2020.00182.
- [18] Jones V, Grey JE, Harding KG. *Wound dressings.*, BMJ. 2006 Apr 1;332(7544):777-80. doi: 10.1136/bmj.332.7544.777.
- [19] Gupta, Abhishek Kowalczyk, Marek Heaselgrave, Wayne Britland, Stephen Martin, Claire Radecka, Iza., *The production and application of hydrogels for Wound Management: A Review.*, European Polymer Journal. 111., 2018 10.1016/j.eurpolymj.2018.12.019.
- [20] Boateng J, Catanzano O., *Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review.*, J Pharm Sci. 2015;104(11):3653-3680. doi:10.1002/jps.24610.
- [21] *Primary vs secondary dressings*, URL: <https://www.shopwoundcare.com/ar-primary-dressings-versus-secondary-dressings.html>
- [22] Dhivya S, Padma VV, Santhini E., *Wound dressings - a review.*, Biomedicine (Taipei) 2015, 5(4):22, doi:10.7603/s40681-015-0022-9.
- [23] Aljghami ME, Saboor S, Amini-Nik S., *Emerging Innovative Wound Dressings.*, Ann Biomed Eng. 2019, 47(3):659-675, doi:10.1007/s10439-018-02186-w

-
- [24] Deutsch CJ, Edwards DM, Myers S., *Wound dressings.*, Br J Hosp Med (Lond). 2017;78(7):C103-C109, doi:10.12968/hmed.2017.78.7.C103.
 - [25] Gunasekaran S, Ko S, Xiao L., *Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications.*, Journal of food engineering. 2007 Nov, 83(1) 31-40, doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.11.001.
 - [26] Panahi R., Baghban-Salehi M., *Protein-Based Hydrogels.*, Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels. Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series. 1561-1600, Springer, 2019, doi: 10.1007/978-3-319-77830-3_52
 - [27] Zhu, Tianxue Mao, Jiajun Cheng, Yan Liu, Haoran Lv, Lu Ge, Mingzheng Shuhui, Li Huang, Jianying Chen, Zhong Li, Huaqiong Yang, Lei Lai, Yuekun., *Recent Progress of Polysaccharide-Based Hydrogel Interfaces for Wound Healing and Tissue Engineering.* Advanced Materials Interfaces. 6. 1900761., 2019, doi:10.1002/admi.201900761.
 - [28] Said, Nurul Sarbon, Norizah, *Protein-Based Active Film as Antimicrobial Food Packaging: A Review*, 2019, doi:10.5772/intechopen.80774.
 - [29] Gunasekaran, S. Xiao, L. Eleya, M., *Whey protein concentrate hydrogels as bioactive carriers.*, Journal of Applied Polymer Science, 2006 99. 2470 - 2476, doi:10.1002/app.22838
 - [30] Ramos OL, Fernandes JC, Silva SI, Pintado ME, Malcata FX., *Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties.*, Crit Rev Food Sci Nutr. 2012;52(6):533-552, doi:10.1080/10408398.2010.50052.
 - [31] Mollea, Chiara Marmo, L. Bosco, Francesca, *Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry.*, 2013, doi:10.5772/53159.
 - [32] Rouabhia M, Gilbert V, Wang H, Subirade M., *In vivo evaluation of whey protein-based biofilms as scaffolds for cutaneous cell cultures and biomedical applications.*, Biomed Mater. 2007;2(1):S38-S44, doi:10.1088/1748-6041/2/1/S06.
 - [33] E.Allen Foegeding, Jack P Davis, Dany Doucet, Matthew K McGuffey, *Advances in modifying and understanding whey protein functionality*, Trends in Food Science Technology, Volume 13, Issue 5, 2002, 151-159, doi:10.1016/S0924-2244(02)00111-5.
 - [34] Hilton Deeth, Nidhi Bansal, *Chapter 1 - Whey Proteins: An Overview*, Whey Proteins, Academic Press, 2019, Pages 1-50, doi:10.1016/B978-0-12-812124-5.00001-1.
 - [35] Stanciuc N, Rapeanu G, *An overview of bovine α -lactalbumin structure and functionality.* Annals of the University Dunarea de Jos of Galati., 2010, Fascicle VI : Food Technology. 34.

-
- [36] Hammann, Felicia Schmid, Markus., *Determination and Quantification of Molecular Interactions in Protein Films: A Review.*, Materials. 7, 2014, 7975-7996. doi:10.3390/ma7127975.
- [37] Chimento S, Billero V, Cavallin L, Romanelli M, Nadji M, Romanelli P., *Evaluation of osteopontin expression in chronic wounds: a potential prognostic and therapeutic biomarker.* J Wound Care. 2017;26(Sup9):S4-S8. doi:10.12968/jowc.2017.26.Sup9.S4.
- [38] Gilbert V, Rouabhia M, Wang H, Arnould AL, Remondetto G, Subirade M., *Characterization and evaluation of whey protein-based biofilms as substrates for in vitro cell cultures.* Biomaterials. 2005;26(35):7471-7480,doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.085.
- [39] Das B., Patra S., *Chapter 1 - Antimicrobials: Meeting the Challenges of Antibiotic Resistance Through Nanotechnology*, Micro and Nano Technologies, Nanostructures for Antimicrobial Therapy, Elsevier, 2017, Pages 1-22, doi:10.1016/B978-0-323-46152-8.00001-9.
- [40] *Antimicrobico*, URL: <https://it.wikipedia.org/wiki/Antimicrobico>
- [41] Y. Qin, *7 - Antimicrobial textile dressings in managing wound infection.*, Woodhead Publishing Series in Textiles, Advanced Textiles for Wound Care, Woodhead Publishing, 2009, Pages 179-197, doi:10.1533/9781845696306.1.179.
- [42] *New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis* URL: www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis
- [43] O'Rourke A, Beyhan S, Choi Y, et al., *Mechanism-of-Action Classification of Antibiotics by Global Transcriptome Profiling.* Antimicrob Agents Chemother. 2020;64(3):e01207-19. Published 2020 Feb 21, doi:10.1128/AAC.01207-19.
- [44] Punjataewakupt A, Napavichayanun S, Aramwit P., *The downside of antimicrobial agents for wound healing.*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38(1):39-54, doi:10.1007/s10096-018-3393-5.
- [45] Cooper, Rose., *A review of the evidence of the use of topical antimicrobial agents in wound care.*, 2005 World Wound. 11.
- [46] Wang L, Hu C, Shao L., *The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future.*, Int J Nanomedicine. 2017;12:1227-1249, doi:10.2147/IJN.S121956.
- [47] Jampílek J., Král'ová K., *Chapter 2 - Nanoantimicrobials: Activity, Benefits, and Weaknesses*, Micro and Nano Technologies, Nanostructures for Antimicrobial Therapy, Elsevier, 2017, Pages 23-54, doi:10.1016/B978-0-323-46152-8.00002-0.

-
- [48] Alavi, Mehran Nokhodchi, Ali., *An overview on antimicrobial and wound healing properties of ZnO nanobiofilms, hydrogels, and bio-nanocomposites based on cellulose, chitosan, and alginate polymers.* Carbohydrate Polymers., 2019, doi:10.1016/j.carbpol.2019.115349.
- [49] Al-Jumaili A., Alancherry S., Bazaka K., Jacob MV., *Review on the Antimicrobial Properties of Carbon Nanostructures.* Materials (Basel), 2017, doi: 10.3390/ma10091066.
- [50] Happy Agarwal, Soumya Menon, S. Venkat Kumar, S. Rajeshkumar, *Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route,* Chemico-Biological Interactions, Volume 286, 2018, 60-70, doi:10.1016/j.cbi.2018.03.008.
- [51] Haq, Ayesha Nadhman, Akhtar Ullah, Ikram Mustafa, Ghulam Yasinzai, Masoom Khan, Imran, *Synthesis Approaches of Zinc Oxide Nanoparticles: The Dilemma of Ecotoxicity.*, Journal of Nanomaterials, 2017, 1-14, doi:10.1155/2017/8510342.
- [52] Sirelkhatim A, Mahmud S, Seenii A, et al., *Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism.*, Nanomicro Lett. 2015, 219-242, doi:10.1007/s40820-015-0040-x.
- [53] Samadi, M., Zirak, M., Naseri, A. et al., *Design and tailoring of one-dimensional ZnO nanomaterials for photocatalytic degradation of organic dyes: a review.*, Res Chem Intermed 45, 2197–2254, 2019, doi:10.1007/s11164-018-03729-5.
- [54] Kołodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T., *Zinc Oxide-From Synthesis to Application: A Review.*, Materials (Basel). 2014;2833-2881, 2014, doi:10.3390/ma7042833.
- [55] Król A., Pomastowski P., Rafińska K., Railean-Plugaru V., Buszewski B., *Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism,* Advances in Colloid and Interface Science, Volume 249, 2017, 37-52, doi:10.1016/j.cis.2017.07.033.
- [56] Rizwan Wahab, I.H. Hwang, Young-Soon Kim, Hyung-Shik Shin, *Photocatalytic activity of zinc oxide micro-flowers synthesized via solution method,* Chemical Engineering Journal, Volume 168, Issue 1, 2011, 359-366, doi:10.1016/j.cej.2011.01.038.
- [57] Lallo da Silva B, Abuçafy MP, Berbel Manaia E, et al., *Relationship Between Structure And Antimicrobial Activity Of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview.*, Int J Nanomedicine, 2019, 9395-9410, doi:10.2147/IJN.S216204
- [58] Emmanuel O. Ogunsona, Rajendran Muthuraj, Ewomazino Ojogbo,

-
- Oscar Valerio, Tizazu H. Mekonnen, *Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review*, Applied Materials Today, Volume 18, 2020, doi:/10.1016/j.apmt.2019.100473.
- [59] Wang B, Zhang Y, Mao Z, Yu D, Gao C., *Toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages due to cell uptake and intracellular release of zinc ions*. J Nanosci Nanotechnol. 2014, 14(8), 5688-5696. doi:10.1166/jnn.2014.8876.
- [60] Sanjiv Singh, *Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity*, Toxicology Mechanisms and Methods, 2019, 300-311, doi: 10.1080/15376516.2018.1553221.
- [61] Kaushik M., Niranjana R. , Ramar Thangam, Balaraman Madhan, Pandiyarasan V., Ramachandran C., Deog-Hwan Oh, Devanand Venkatasubbu G., *Investigations on the antimicrobial activity and wound healing potential of ZnO nanoparticles*, Applied Surface Science, Volume 479, 2019, Pages 1169-1177, doi:10.1016/j.apsusc.2019.02.189.
- [62] Pawan K. Mishra, Harshita Mishra, Adam Ekielski, Sushama Talegaonkar, Bhuvaneshwar Vaidya, *Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications*, Drug Discovery Today, Volume 22, Issue 12, 2017, Pages 1825-1834, doi:10.1016/j.drudis.2017.08.006.
- [63] Raguvaran R., Balvinder K. Manuja, Meenu Chopra, Rajesh Thakur, Taruna Anand, Anu Kalia, Anju Manuja, *Sodium alginate and gum acacia hydrogels of ZnO nanoparticles show wound healing effect on fibroblast cells*, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 96, 2017, Pages 185-191, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12.009.
- [64] Mohandas, A., Kumar P T, S., Raja, B., Lakshmanan, V. K., Jayakumar, R., *Exploration of alginate hydrogel/nano zinc oxide composite bandages for infected wounds.*, International journal of nanomedicine, 2015, 53–66, doi:10.2147/IJN.S79981.
- [65] Donohue, Marc Aranovich, G.L., *Classification of Gibbs adsorption isotherms*. Advances in Colloid and Interface Science, 1998, 76. 137-152. doi:10.1016/S0001-8686(98)00044-X.
- [66] Mitra, Shouvik Bano, Subia Patra, Prasun Chandra, Sourov Debnath, Nitai Das, Sumistha Banerjee, Rahul Kundu, Subhas Pramanik, Panchanan Goswami, Arunava, *Porous ZnO nanorod for targeted delivery of doxorubicin: In vitro and in vivo response for therapeutic applications.*, J. Mater. Chem., 22, 24145-24154, doi:10.1039/C2JM35013K.
- [67] Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA., *Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species.*, Int J Nanomedicine., 2012, 7:845-857, doi:10.2147/IJN.S29129.

-
- [68] Tricoli F., Tesi di laurea magistrale: *Valutazione dell'impiego di proteine del siero di latte*, 2012
- [69] Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda SK., *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review.*, J Pharm Anal. 2016, 71-79, doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [70] Leone F., Cataldo R., Mohamed SSY., Manna L., Banchemo M., Ronchetti S., Mandras N., Tullio V., Cavalli R., Onida B., (2019). *Nanostructured ZnO as Multifunctional Carrier for a Green Antibacterial Drug Delivery System—A Feasibility Study*. Nanomaterials., 2019, 9. 407. doi:10.3390/nano9030407.
- [71] R. Kumar, A. Umar, G. Kumar, and H. S. Nalwa, *Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review*, Ceram. Int., vol. 43, no. 5, pp. 3940–3961, 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2016.12.062.
- [72] NLM Galdiero S., Falanga A., Vitiello M., Cantisani M., Marra V., Galdiero M., *Silver nanoparticles as potential antiviral agents*. Molecules. 2011, 16(10), 8894-918, doi: 10.3390/molecules16108894.
- [73] Milovanovic M., Arsenijevic A., Milovanovic J., Kanjevac T., Arsenijevic N., *Chapter 14 - Nanoparticles in Antiviral Therapy*, Antimicrobial Nanoarchitectonics, Elsevier, 2017, 383-410, doi:10.1016/B978-0-323-52733-0.00014-8.
- [74] Ghaffari, H., Tavakoli, A., Moradi, A. et al, *Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine.*, J Biomed Sci 26, 70, 2019, doi:10.1186/s12929-019-0563-4.
- [75] Baram-Pinto D., Shukla S., Perkash N., Gedanken A., Sarid R., *Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate.*, Bioconjug Chem. 2009;20(8):1497-1502. doi:10.1021/bc900215b.