

POLITECNICO DI TORINO

**Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica
Orientamento Bionanotecnologie**

BIOCOMPOSITI CONTENENTI OSSIDO DI ZINCO NANOSTRUTTURATO PER WOUND DRESSING



Relatori:

Prof.ssa Barbara Onida
Prof.ssa Francesca Bosco

Candidato:

Eleonora Benedetti

Marzo 2021

Sommario

1	La cute e la ferita.....	5
1.2	Le ferite croniche	7
1.1.1	Classificazione	7
1.1.2	Eziologia	10
1.1.3	Il biofilm batterico	11
1.1.4	L'infezione batterica nella ferita cronica	13
1.1.5	Tecniche per la valutazione dell'infezione batterica	15
1.1.6	Wound bed preparation.....	15
1.1.7	Prevalenza e costi	19
1.3	Il wound dressing	21
1.4	Gli agenti antibatterici	25
2.	L'ossido di zinco	33
2.1	Metodi di sintesi dello ZnO.....	34
2.2	Applicazioni	35
2.2.1	Industria della gomma	36
2.2.2	Industria tessile	36
2.2.3	Industria elettronica	37
2.2.4	Industria farmaceutica, alimentare e biomedicale	37
2.3	L'ossido di zinco come agente antibatterico e i suoi meccanismi	38
2.4	Tecniche per la valutazione dell'attività antimicrobica	42
2.4.1	Metodi di diffusione	42
2.4.2	Metodi di diluizione.....	45
2.5	Tossicità per l'organismo umano	46
3	I nanocompositi.....	47
3.1	I bionanocompositi a matrice polimerica	48
3.1.1	Le matrici.....	49
3.2	Nanocompositi di ossido di zinco	53
3.2.1	Antibattericità	53
3.2.2	Wound healing.....	60
	Discussione	63
	Conclusione.....	66
	Bibliografia	68

Acronimi

AHL	Omoserina Lattone Acilato
ALD	Atomic Layer Deposition
Alg	Alginato
AMPDs	Dendrimeri Antimicrobici Peptidici
AOT	Bis-2-etilesilsulfosuccinato di sodio anionico
APAC	Regione Asia-Pacifico
CFU	Unità Formante Colonia
CMCh	Carbossimetilcellulosa
CMNC	Nanocompositi a Matrice Ceramica
CNTs	Nanotubi di Carbonio
CS	Chitosano
DDT	Tecnologie Dirette di Debridement
DNEL	Livello Derivato Senza Effetto
ECM	Matrice Extra Cellulare
EGF	Epidermal Growth Factor
EUCAST	Commissione Europea Test Sensibilità Antimicrobica
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFs	Growth Factors
GN	Gram negativi
GP	Gram positivi
IDT	Tecnologie Indirette di Debridement
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IL-1	Interleukina-1
ISO	Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione

LAB	Batteri Acido Lattico
LPS	Lipopolisaccaridi
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MMNC	Nanocompositi a Matrice Metallica
MMPs	Metallo Proteinasi
MRI	Risonanza Magnetica
MRSA	Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
NC	Nanocompositi
NPs	Nanoparticelle
NWT	Non-Wild Type
PBS	Tampone Fosfato Salino
PDGF	Platelet Growth Factor
PLC	Policaprolattone
PMNC	Nanocompositi a Matrice
ROS	Reactive Oxygen Species
RTE	Ready To Eat
SA	Alginato di Sodio
TGF	Transforming Growth Factor
TLV	Valore Limite di Soglia
TNF- α	Tumor Necrosis Factor
WP	Whey Protein
WT	Wild Type

1 La cute e la ferita

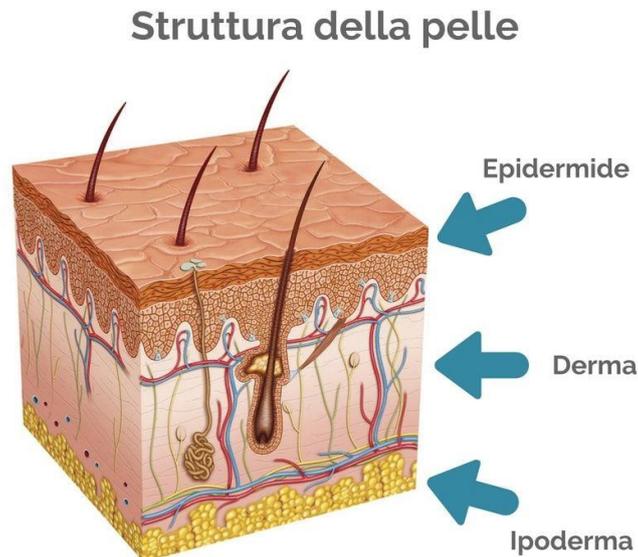


Figura 1. Anatomia della Cute[140]

La cute o pelle è l'organo di rivestimento del nostro corpo nonché il più esteso, assicura protezione all'organismo ed è il mezzo con cui ci si interfaccia al mondo esterno. A seconda dell'individuo si hanno 1.5-2 mq di estensione e circa 1.5-2 mm di spessore medi nell'adulto[1].

È composta da tre strati fondamentali[2]:

- **Epidermide:** è la parte a diretto contatto con l'esterno, ha prettamente la funzione di protezione dei tessuti sottostanti ed è costituita a sua volta da altri 4 sottostrati che vedono nell'ultimo (detto strato corneo) il completamento del processo di cheratinizzazione, nel quale le cellule, ormai a fine ciclo vitale, vengono eliminate per fare spazio alle nuove.
- **Derma:** si trova sotto l'epidermide a cui è collegato tramite le papille dermiche e a cui fornisce supporto e nutrimento. Vi sono presenti nervi, vasi sanguigni, ghiandole e follicoli piliferi. I maggiori costituenti sono l'elastina (che contribuisce all'elasticità) e il collagene (responsabile della robustezza).
- **Ipoderma:** è lo strato più profondo della pelle e quello costituito prevalentemente da tessuto adiposo. La sua funzione è quella di fungere da "cuscinetto", da riserva di calorie nei periodi di digiuno e da isolante.

Oltre alla già evidenziata funzione di protezione, la pelle svolge anche: 1) Funzione sensoriale; 2) Funzione di termoregolazione; 3) Funzione respiratoria; 4) Funzione Secretiva; 5) Funzione difensiva antimicrobica; 6) Funzione riproduttiva[3].

I compiti appena descritti vengono di norma espletati laddove la cute risulti sana ed intatta; talvolta, però, la pelle può subire danneggiamenti più o meno rilevanti che vengono indicate come lesioni o ferite cutanee.

Con il termine *ferita* si definisce un'interruzione della continuità dell'epitelio di rivestimento della cute o delle mucose, derivante da un evento violento di carattere fisico o termico. Secondo la durata

e la natura del processo di guarigione, la ferita viene comunemente classificata come *acuta* o *cronica*[3].

Una ferita acuta è una lesione della pelle che si manifesta improvvisamente a causa di un urto, abrasione o intervento chirurgico; essa guarisce in modo prevedibile e in un tempo previsto di solito entro 8-12 settimane, considerate le caratteristiche della lesione e non in presenza di stati patologici. Contrariamente, la ferita cronica non riesce a risolversi nelle normali fasi di guarigione e non subisce un processo di riparazione in modo ordinato e tempestivo[3].

Il processo di guarigione o *wound healing* di una ferita si articola in quattro diverse fasi[4][5]:

1. **Emostasi**

Avviene uno spasmo vascolare: i vasi sanguigni si contraggono. Vi è la formazione di un tappo piastrinico, attivazione del *pathway* di coagulazione, fino alla produzione di fibrina.

2. **La fase infiammatoria**

Aumenta l'irrorazione sanguigna con conseguente arrossamento e gonfiore, migrazione dei neutrofili nel sito della lesione, seguiti dai monociti che si differenziano in macrofagi.

3. **Il periodo di proliferazione**

Inizia la fase di epitelizzazione e di angiogenesi. Nuovo collagene viene sintetizzato, contemporaneamente nuova matrice extracellulare (ECM) prende forma.

4. **La fase di maturazione**

Il collagene appena creato si rimodella ed i nuovi tessuti vascolari maturano e ripristinano le proprie funzionalità

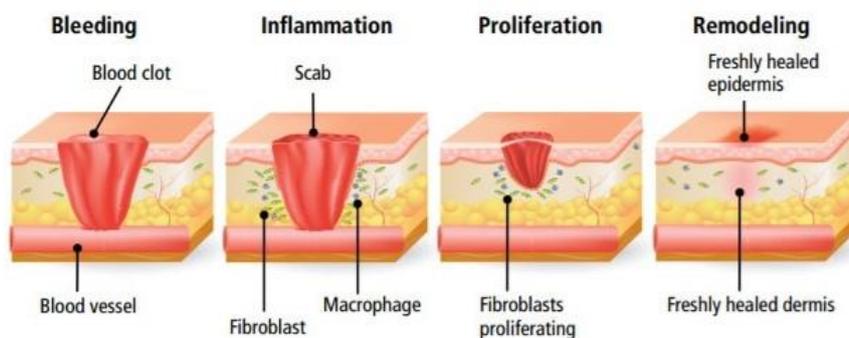


Figura 2. Processo di guarigione di una ferita[141]

Tuttavia, tale iter di riparazione può essere ritardato e/o modificato da alcuni elementi che influiscono sulla rimarginazione della ferita, tra questi si rilevano *fattori locali* come ipotermia, infezioni, radiazioni, presenza di ossigeno nei tessuti, caratteristiche intrinseche della lesione cutanea (si ricordano la forma, le dimensioni, la collocazione nel corpo) e *fattori sistemici* come lo stato di salute del paziente o la sua capacità di guarire prontamente. Eventuale malnutrizione, età e carenza di proteine, vitamine o minerali concorrono ad aggravare lo stato dell'individuo interessato[5].

In seguito agli effetti dei fattori locali e sistemici si possono riscontrare disturbi quali[6]:

- I. Sieromi¹
- II. Deiscenze
- III. Ematomi

¹ Raccolta di essudato sieroso situato nel letto delle ferite

- IV. Formazione di cicatrici ipertrofiche
- V. Necrosi delle parti molli
- VI. Cheloidi²

1.2 Le ferite croniche

È stato stimato che tra l'1% e il 2% della popolazione vivente in paesi sviluppati è stato colpito da ferite croniche almeno una volta nel corso della propria vita[7]. Le lesioni ulcerose rappresentano un grave fardello sia per i pazienti affetti che per le loro famiglie poiché causano dolore, infezioni, perdita di funzionalità della zona interessata e sostenuti costi nel settore sanitario[8]. L'incidenza di questa forma di ferite aumenta con l'aumentare dell'età della popolazione e generalmente le complicazioni relative includono eczema venoso infettivo, gangrena, emorragie ed amputazioni alle estremità degli arti inferiori[7]. Solitamente si manifestano in pazienti anziani e con comorbidità quali ictus, diabete o, più raramente, in individui giovani con danni neurologici post-traumatici[9].

Le ferite croniche conducono frequentemente alla disabilità che, a sua volta, determina un peggioramento delle condizioni cliniche della lesione stessa, alimentando un vero e proprio circolo vizioso[7][10].

1.1.1 Classificazione

Secondo la Wound Healing Society, le lesioni croniche si dividono in quattro tipologie fondamentali[7]:

- Ulcere Diabetiche
- Ulcere Venose
- Ulcere da Pressione
- Ulcere Arteriose

- Le Ulcere Diabetiche

Le ulcere da piede diabetico insorgono quali complicanze comuni dovute al diabete[8].

In questa patologia, i deficit portano ad una sudorazione carente e ad alterata regolazione del flusso sanguigno, causando un'errata ossigenazione delle estremità distali e rendendo la cute fragile e suscettibile a fessurazioni[11].

Generalmente i fenomeni coinvolti risultano da una combinazione di natura ischemica, neuropatica e traumatica. Si localizzano normalmente sulla superficie plantare ed il piede risulta indebolito, insensibile, con un aumento nel rischio di recidive ulcerose da stress meccanico, aggravato da una insufficiente perfusione[8].

I pazienti affetti da ulcere del piede diabetico sono a più alto rischio di *amputazione maggiore* degli arti e morte rispetto agli altri tipi di ulcera, questo perché l'intervento avviene al di sopra della caviglia data l'elevata probabilità di infezione in presenza di ferita aperta. Per tale patologia, le stime riportano che circa il 15% dei diabetici potrà sviluppare nella propria vita un'ulcera da piede diabetico, che necessiterà di cure mediche, e che il 50% delle amputazioni maggiori riguardano gli individui diabetici[6].

² Tessuto di granulazione che si estende oltre il margine perilesionale



Figura 3. Esempio di ulcera da piede diabetico[142]

- Le Ulcere Venose

Rappresentano più della metà di tutte le ferite croniche degli arti inferiori (50%-70%) e interessano l'1%-2% della popolazione adulta, con una maggiore prevalenza nelle donne e negli anziani[8]. Insorgono come conseguenza di ipertensione venosa e congestione sanguigna dovute a trombosi venosa o insufficienza valvolare. Avviene, in particolare, che la pressione aumenta la permeabilità dei vasi sanguigni, portando alla fuoriuscita di macromolecole e globuli rossi nello spazio perivascolare. L'edema e la fibrosi successivi ostacolano la diffusione dell'ossigeno, fattori di crescita e nutrienti nel tessuto della ferita. Le ulcere venose tendono ad essere più grandi e meno profonde, con margini tipicamente irregolari e mal definiti, la maggior parte si verificano comunemente sul malleolo mediale[8]. Possono essere lesioni singole o multiple, con frequente presenza di tessuto di granulazione rosso o tessuto fibrinoso giallo, raramente si presenta tessuto necrotico[11].



Figura 4. Esempio di ulcera venosa[12]

- Le Ulcere da pressione

Le lesioni da pressione (definite anche piaghe, ulcere o lesioni da decubito) sono sostanzialmente lesioni cutanee causate da pressione, stiramento e frizione[6]. Sono comuni nei pazienti con mobilità ridotta o impedita, quali individui paralizzati o incoscienti che non sono in grado di percepire né di rispondere alla necessità periodica di riposizionamento. Quando la compressione dei tessuti è superiore alla pressione capillare, la pressione

prolungata causa ipossia e conseguente necrosi tissutale dovuta a una ischemia. Tale tipologia d'ulcera è facilmente riscontrabile in zone corporee con ossa prominenti quali osso sacro, fianchi e malleoli[8].

Si possono individuare quattro stadi dell'ulcera da decubito[11]:

- Stadio 1: Eritema rosso, non ancora ulceroso;
- Stadio 2: Ulcera aperta poco profonda a spessore parziale con letto della ferita rosso senza slough³; può presentarsi come una vescica[6];
- Stadio 3: Perdita di pelle in tutto lo spessore. È possibile che si renda visibile l'adipe sottocutaneo ma ossa, tendini o muscoli non risultano esposti; la possibile presenza di slough non cela la profondità della perdita di tessuto[6];
- Stadio 4: Perdite di tessuto in tutto lo spessore con ossa, tendini o muscoli esposti; possibile presenza di escare o slough;



Figura 5. Esempio di ulcera da pressione[13]

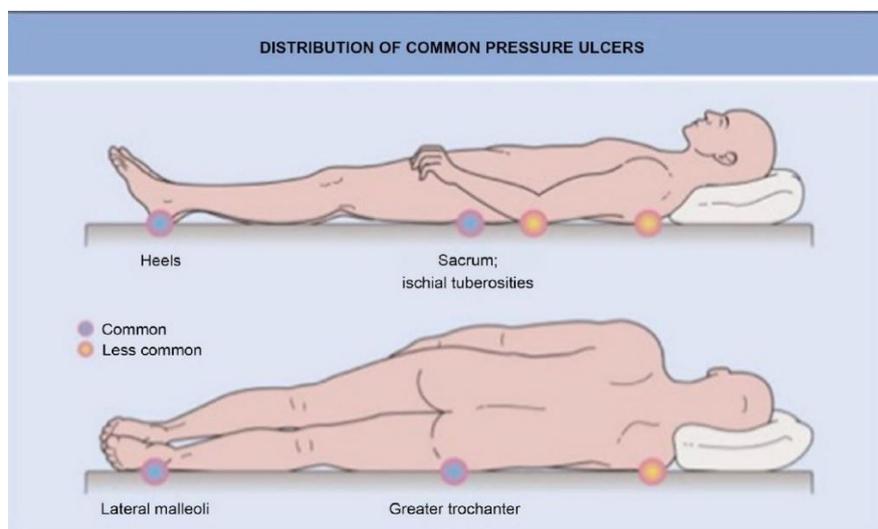


Figura 6. Distribuzione corporea delle comuni ulcere da pressione[11]

• Le Ulcere Arteriose

Queste lesioni sono meno comuni rispetto a quelle venose, rappresentano fino al 25% delle ulcere agli arti inferiori. Si verificano come conseguenza dell'insufficienza arteriosa dovuta ad aterosclerosi, trombosi o danni da radiazione ed hanno una maggiore incidenza nei soggetti

³ Tessuto devitalizzato di aspetto filamentoso e giallastro

fumatori, diabetici, con iperlipidemia ed ipertensione[11]. Il restringimento del lume del vaso riduce la perfusione determinando ischemia e ipossia a carico della zona interessata. Si verificano di norma in siti di esposti a pressioni o traumatizzati, come prominenze ossee; si mostrano rotonde con bordi nettamente delimitati e con presenza di letto necrotico. Possono essere individuate al di sotto del ginocchio, estendendosi fino al piede, con una durata pari o superiore alle 8/10 settimane[8][6]. I pazienti possono lamentare claudicazione e aumento dell'intensità del dolore quando l'arto viene elevato[11].



Figura 7. Esempio di ulcera arteriosa[12]

1.1.2 Eziologia

Come già esposto, la guarigione di una ferita risulta un processo complesso e influenzato da numerosissimi parametri, ma le lesioni ulcerose non seguono una cascata di eventi di ripristino ben definita[8]. Infatti, la sequenza ordinata dei processi riparatori già illustrati viene alterata e/o bloccata a uno stadio intermedio[14]. In più, mentre l'essudato di una lesione sana presenta enzimi e fattori di crescita (Growth Factors o GFs) che favoriscono il normale rimodellamento tissutale, per una durata massima di 48 ore; nelle ferite croniche l'essudato risulta costante e naturale conseguenza dei processi infiammatori in atto[9].

Nello specifico, gli stimoli multifattoriali delle lesioni ulcerose creano e amplificano un microambiente ostile dove l'instabile equilibrio tra citochine proinfiammatorie, chemochine, proteasi e i loro inibitori viene danneggiato. Questo fenomeno porta ad un prolungamento inevitabile della fase di guarigione che, di rimando, causa uno scompenso nella fase cicatriziale, dovuto alla costante infiammazione[8]. Il responsabile di tale stato sembra essere l'eccessiva presenza di neutrofili che determinano una sovrapproduzione di specie ossidative o ROS, portando al danneggiamento dell'ECM, della membrana cellulare e ad una prematura senescenza cellulare. Inoltre, i neutrofili rilasciano sostanze quali elastasi e collagenasi che, in combinazione, degradano fattori di crescita come il *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) o il *Transforming Growth Factor* (TGF) e inattivano componenti della ECM. Perciò, sebbene la produzione di GFs risulti spesso aumentata nella ferite croniche, la loro disponibilità in questi casi è notevolmente ridotta. Entrambi i neutrofili e macrofagi producono citochine proinfiammatorie come IL-1 β e TNF- α che non solo aumentano la produzione di metalloproteinasi o MMPs ma riducono anche gli inibitori delle stesse. Tale forte squilibrio incrementa a sua volta la degradazione della ECM da cui ne consegue un'alterazione della migrazione

cellulare, una riduzione dei fibroblasti ed una aumentata infiammazione dovuta ai propri prodotti di decomposizione extracellulare[8].

Nella tabella sottostante si riportano i principali aspetti differenti tra ferite acute e ferite croniche[11].

Ferite acute	Ferite croniche
Bassi livelli batterici	Alti livelli batterici
Ridotte citochine proinfiammatorie	Numerose citochine proinfiammatorie
Ridotte proteasi e ROS. Matrice extracellulare intatta	Numerose proteasi e ROS. Matrice extracellulare degradata
Elevata attività mitogenica	Bassa attività mitogenica con cellule senescenti

1.1.3 Il biofilm batterico

I batteri sono organismi procariotici unicellulari dotati di un solo cromosoma costituito da un filamento di DNA a doppia elica circolare. Sono divisi in due classi, Gram positivi e Gram negativi, i primi presentano esternamente alla membrana cellulare, una parete cellulare di spessore elevato, i secondi esternamente alla parete cellulare, più sottile, presentano una seconda membrana definita “esterna”[15]. La parete cellulare è composta in gran parte da uno strato di peptidoglicani, essa ha la funzione di controllo della pressione osmotica della cellula e provvede al mantenimento della cellula stessa. In certe specie, inoltre, sono presenti dei flagelli e pili, strutture deputate rispettivamente al movimento e allo scambio di materiale genetico tra batteri differenti[15].

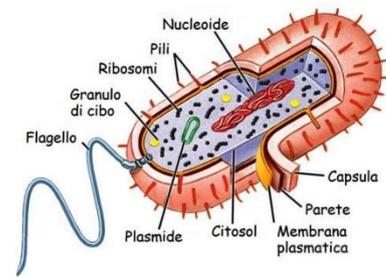


Figura 8. Struttura di batterio[143]

Come precedentemente riportato, i batteri possono essere suddivisi in base alla colorazione Gram.

I batteri Gram positivi sono così denominati poiché trattengono il colorante cristal-violetto (apparendo blu scuro) dopo fissazione con soluzione iodata e decolorazione con alcool; i batteri Gram negativi non trattengono il colorante cristal-violetto ed assumono una colorazione rossa se trattati con un colorante di contrasto (tipicamente fucsina o safranina) [15].

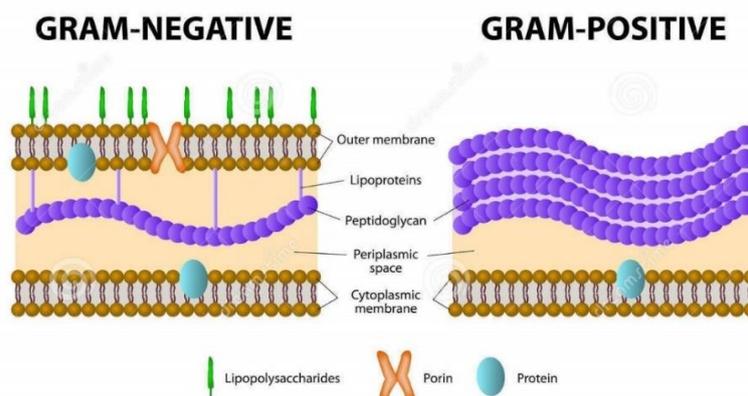


Figura 9. Struttura della membrana di batterio Gram positivo e negativo[144]

Negli articoli scientifici di interesse, sono presenti numerosi esempi di specie batteriche solitamente presenti nelle ferite come[15]:

- *Escherichia coli* (Gram negativo)
- *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativo)

- *Staphylococcus aureus* (Gram positivo)
- *Sarcina lutea* (Gram positivo)
- *Klebsiella pneumonia* (Gram negativo)
- *Pseudomonas vulgaris* (Gram negativo)
- *Bacillus subtilis* (Gram positivo)
- *Bacillus magaterium* (Gram positivo)

Per capire come si realizzi un'infezione batterica, si suppone di avere una lesione cutanea in cui i batteri, presenti nell'ambiente circostante, iniziano a depositarsi sul letto della ferita in maniera dapprima non permanente. Successivamente essi aderiscono stabilmente alla superficie, tramite produzione di una matrice extracellulare composta prevalentemente da esopolisaccaridi (EPS) detta *biofilm*[17].

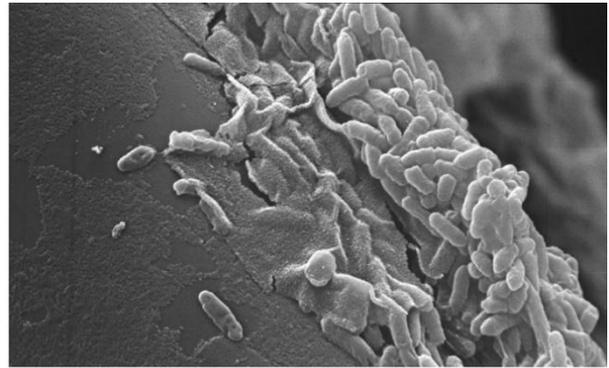


Figura 10. Esempio di biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*[16]

Al microscopio, il biofilm si presenta molto denso e fitto, all'interno del quale i batteri sono organizzati in colonie; nella struttura del biofilm il trasporto di nutrienti avviene in modo rallentato, questa situazione apparentemente svantaggiosa rende i batteri resistenti e capaci di adattarsi ad ambienti

ostili. All'interno del biofilm, i batteri presenti riescono a comunicare tra loro anche se distanti attraverso il meccanismo del *quorum sensing*: vengono cioè prodotti metaboliti solubili che diffondono nella matrice, raggiungono altri batteri, e agiscono come attivatori trascrizionali. Un esempio di questi metaboliti sono: *Omoserina lattone acilato* (AHL) per i Gram negativi o un piccolo oligopeptide (8-9 amminoacidi) per i Gram positivi [18].

Lo sviluppo del biofilm determina un incremento del suo spessore, raggiunta una certa dimensione, le zone superficiali iniziano a sfaldarsi, creando embolo infettivo[17].

È rilevante considerare che la patogenicità del biofilm dipende sostanzialmente da tre presupposti[17]:

1. I batteri liberi sono più sensibili all'azione degli antibiotici e del sistema immunitario; quando invece sono all'interno del biofilm sono protetti dai farmaci somministrati, poiché difficilmente questi riescono a penetrare all'interno della matrice esopolisaccaridica. Ciò permette loro di resistere e di continuare a proliferare.
2. I macrofagi secernono enzimi e sostanze ossidanti che danneggiano i tessuti sani ma non il biofilm, creando una risposta infiammatoria nella regione.
3. Una volta formato il biofilm è difficile da eradicare ed esso rilascia piccoli frammenti che possono essere trasportati in diverse aree del corpo, infettandole.

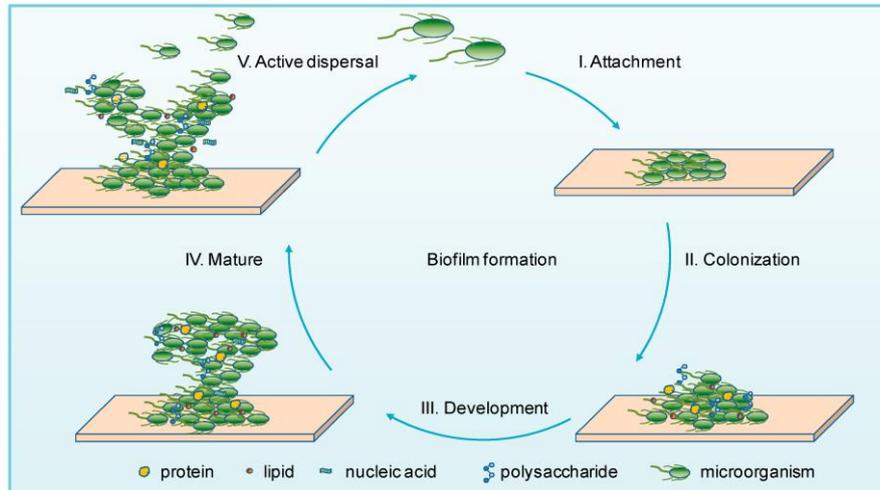


Figura 11. Sviluppo del biofilm batterico[19]

1.1.4 L'infezione batterica nella ferita cronica

Tra le diverse complicazioni in presenza di ferite croniche di considerevole interesse risulta l'infezione batterica. In contrasto con le lesioni acute infette, tutte le ferite croniche contengono un livello fisiologico di flora microbica, ma l'infezione può alterare la guarigione prolungando ulteriormente la fase infiammatoria delle stesse[14]. Essa è definibile quando si ha una carica batterica tale che la concentrazione di specie microbiche risulta superiore a 10^5 unità formanti colonie (CFU) per grammo di tessuto[20].

Avviene che microrganismi patogeni, come *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e Streptococchi emolitici, che popolano comunemente le ferite croniche, attirino i leucociti con conseguente aumento delle citochine, proteasi e ROS, iniziando così il mantenimento del fenomeno infiammatorio. In seguito, le proteasi e le ROS degradano la ECM e interrompono la migrazione cellulare, inibendo la chiusura della ferita[8]. La formazione del biofilm batterico si basa proprio sulla promozione dello stato infiammatorio e sulla produzione di alti livelli di proteasi, al fine di favorire la presenza di un essudato plasmatico ricco di sostanze nutritive[21]. I batteri che colonizzano le lesioni croniche formano spesso biofilm polimicrobici, a differenza delle ferite acute[8].

Solitamente, un singolo ceppo batterico patogeno è considerato capace di causare infezione, ma è possibile che diverse specie considerate "non patogene" possano ugualmente permettere l'instaurarsi di una condizione patologica lavorando in gruppi cooperanti per resistere allo stress ambientale. Difatti, *Wolcott et al.*[21] indica fortemente la possibilità di una teoria della equivalenza funzionale in relazione allo sviluppo di biofilm batterici nelle lesioni croniche. Un biofilm batterico composto da un solo tipo di microorganismo risulterebbe meno forte e più facile da eradicare, da parte di agenti antibatterici/antibiotici, rispetto ad un biofilm multi-specie. Difatti, la difficoltà di certe ferite ad essere trattate efficacemente con strategie di singoli trattamenti potrebbe essere spiegata proprio dalla diversa natura degli organismi coinvolti. Ma, affinché una comunità multi-specie agisca come unica entità patogena che produce una infezione persistente, essa deve possedere collettivamente proprietà omogenee che consentano lo sviluppo della patologia ovvero presentare un'equivalenza funzionale che causi un'infiammazione prolungata. Mentre singoli batteri patogeni come *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* mostrano le caratteristiche metaboliche necessarie ad avviare autonomamente la formazione di un biofilm sulla ferita, una popolazione mista, ma funzionalmente equivalente, richiede specie cooperanti per raggiungere lo stesso grado di infezione: dove, ad

esempio, un ceppo batterico può attaccare specifici siti della ECM dell'ospite, un secondo può organizzare le componenti dell'organismo ospitante in una matrice protettiva per i batteri ed un terzo può rilasciare lipopolisaccaridi utili al nutrimento della comunità e così via[21].

Le specie batteriche patogene più spesso individuate nelle lesioni croniche sono *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococco*, *Enterobacter cloacae*[14]; quando presenti nel letto della ferita, alcune specie devono essere trattate indipendentemente dalla carica infettante, specialmente quelle aggressive come Streptococchi betaemolitici, *Mycobacterium spp.*, *Herpes zoster*, *Leptospira spp.*, *Brucella spp.* In generale, nelle ferite croniche va considerato che si riscontra una flora batterica variabile nel tempo come segue in tabella[14]:

Ferita acuta in fase iniziale	Flora cutanea abituale Gram positivi (<i>S.aureus</i> , Streptococchi beta-emolitici)
Quattro settimane, ferita cronica	<i>E.coli</i> , <i>Proteus spp.</i> e <i>Klebsiella spp.</i>
Deterioramento ulteriore	Flora anaerobica
Diversi mesi	Bastoncelli aerobi Gram negativi (di provenienza esogena) di differenti specie dei generi <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> e <i>Stenotrophomonas</i>

Quando la carica batterica risulta ormai rilevante e l'infezione è conclamata i processi di riparazione tissutale appaiono bloccati, si presentano abbondante essudato sieroso e tessuto di granulazione friabile, di colorazione rossa per via dell'angiogenesi stimolata dai batteri. Si ha inoltre la presenza di un odore sgradevole, particolarmente caratteristico di zone necrotiche[14].

In ultimo, i fattori che possono aumentare la probabilità delle infezioni includono deficit immunitario (es. trapiantati d'organo), malnutrizione, ipossia (insufficienza arteriosa o venosa), presenza di un corpo estraneo e un tessuto necrotico che incentiva l'infezione[22].



Figura 12. Infezione superficiale da *Pseudomonas*[23]

1.1.5 Tecniche per la valutazione dell'infezione batterica

La diagnosi di infezione di una ferita cronica è spesso ostacolata dalla latente replicazione della comunità batterica (si pensi ai pazienti in terapia immunosoppressiva che maschera i tipici segni clinici della sepsi[14]), e dalla difficoltà nel valutare tutti i fattori che contribuiscono allo sviluppo dello stato infettivo.

Per eseguire una corretta valutazione si esegue una quantificazione dei batteri mediante tecniche di biopsia tissutale[23].

- **Biopsia quantitativa**→ Il tessuto viene sottoposto a biopsia, pesato e omogeneizzato a microrganismi liberi provenienti dalla matrice extracellulare del tessuto in esame. Il campione viene poi sottoposto a diluizioni seriali e seminato in piastre di agar. Dopo l'incubazione, le colonie vengono identificate e conteggiate.
- **Tampone semiquantitativo**→ Dopo aver irrigato la ferita con soluzione salina e aver eseguito il *debridement*, un tampone viene fatto ruotare sul letto della lesione fino a prelevare un campione di essudato dalla ferita. Esso è poi inoculato su un terreno solido, per poi essere strisciato in 4 quadranti. Una crescita +4 (valori oscillanti tra +1 e +4), o crescita nel 4° quadrante, riportante più di 30 colonie viene fatta corrispondere ad almeno 10^5 microrganismi per grammo di tessuto, misurati con la tecnica della biopsia quantitativa. Tale procedimento permette di prelevare campioni da un'ampia zona della cute ma produce anche un discreto numero di falsi positivi[23][14].
- **Tampone quantitativo**→ Il tampone viene fatto ruotare su 1 cm^2 della ferita e agitato in 1 mL di medium. È poi sottoposto a diluizioni seriali e coltivato su piastre.
- **Tecnica rapida**→ La biopsia della ferita viene pesata, diluita per dieci volte, ed omogeneizzata ai microrganismi liberi derivanti dalla matrice extracellulare del tessuto. Una quota di 0.02 ml del campione è posizionata su un vetrino fissato. Una singola specie batterica individuata sul vetrino viene fatta corrispondere a una quantità maggiore di 10^5 CFU/g di tessuto (essendo una quantità superiore a 10^5 CFU risulta da definizione un'infezione).

1.1.6 Wound bed preparation

Per Wound Bed Preparation si intende un insieme di principi che concernono la gestione globale delle ferite, i quali permettono di accelerarne la guarigione e di facilitare l'efficacia dei trattamenti successivi[14]. Per quanto riguarda le ferite croniche, si tenta di trasformare l'ambiente ostile caratteristico in quello di una ferita acuta in via di guarigione, così da favorire il fisiologico iter di riparazione già descritto[22].

Tale concetto racchiude in sé tutte le attuali tecniche di trattamento delle ulcere croniche, la correzione dello squilibrio batterico e il contenimento dei fluidi sierosi, in modo da garantire la formazione di un tessuto di granulazione che risulti in una completa cicatrizzazione della lesione.

Prima di applicare eventuali medicazioni e agenti antibatterici, è fondamentale effettuare il processo di *debridement* o "sbrigliamento"[14].

Tale termine deriva dal francese *débridement*, che significa rimuovere una costrizione. In medicina questa parola è stata coniata per la prima volta da *Henri Le Dran* (1685–1770), in occasione di un'incisione effettuata per promuovere il drenaggio e alleviare la tensione[24].

Questa tecnica ha la funzione di rimuovere il tessuto necrotico presente nell'ulcera, in tale modo si facilita l'azione dei GFs, si promuove la migrazione cellulare, si contengono l'infezione batterica e

l'infiammazione. Si favorisce, in aggiunta, l'angiogenesi del tessuto interessato[14]. Tuttavia, anche i margini e la cute presente intorno alla lesione risultano rilevanti per una guarigione efficace[24].

Tale trattamento sembra aumentare le probabilità di produrre effetti positivi sul paziente, quali il miglioramento della qualità della vita, la riduzione dell'odore talvolta presente, il contenimento degli essudati e la stimolazione dei margini epiteliali[24]. Inoltre, le ferite croniche risultano avere più bisogno di un *debridement* di mantenimento, rispetto ad un singolo trattamento, dovuto ad una maggiore propensione a formare tessuto devitalizzato a dispetto delle lesioni acute[14].

Nonostante lo sbrigliamento avvenga anche spontaneamente, quando esso è operato dall'esterno il processo di *wound healing* appare accelerato. Difatti, agli stadi iniziali della guarigione si verifica un *debridement* autolitico naturale grazie all'azione di enzimi endogeni, mentre le cellule presenti nel letto della ferita rilasciano particolari sostanze affinché il *debridement* si verifichi esclusivamente nel letto della lesione, allo scopo di non danneggiare i tessuti circostanti[14].

Sono disponibili diversi metodi di sbrigliamento, ognuno con i propri vantaggi e limiti; per scegliere la giusta tecnica è fondamentale selezionare lo sbrigliamento in base al tipo di tessuto trattato, quindi è necessaria una diagnosi che descriva il quadro complessivo della situazione e che definisca i quantitativi di essudato nel letto della ferita[24]. Spesso le tecniche più efficaci nel rimuovere tessuto necrotico possono essere quelle più dannose nei confronti di quello neoformato, poiché la scelta del metodo dipende da fattori come, ad esempio, la selettività del procedimento. Tra i processi selettivi, cioè che provvedono alla rimozione di solo tessuto devitalizzato, vi sono quello autolitico ed enzimatico[14]. I non selettivi, invece, consistono nell'eliminare parte di tessuto vitale e includono il tipo chirurgico e meccanico[23].

➤ **Debridement autolitico**

Questo processo avviene anche naturalmente in tutte le ferite.

Includono enzimi proteolitici endogeni del paziente, che liquefanno, separano il tessuto necrotico e l'escara da quello sano. Se l'autolisi non appare entro le 72 ore, è necessario intraprendere un'altra forma di sbrigliamento e laddove l'escara persistente contribuisca al ritardo dell'autolisi, la superficie dura può essere intaccata da una lama senza penetrare nel tessuto vitale sottostante, al fine di facilitare l'inizio del processo[23]. I prodotti per lo sbrigliamento di tipo autolitico provvedono, da un lato, a umidificare le ferite disidratate e, dall'altro, ad assorbire liquidi da quelle relativamente essudanti; sono indicati per vari tipi di lesioni in fase acuta o cronica, caratterizzate da tessuto necrotico o da una patina di fibrina[24]. I prodotti per l'uso di tale *debridement* prevedono un facile utilizzo, non provocano consistente dolore nel paziente ed evitano di danneggiare i tessuti sani coinvolti, favorendo così la rigenerazione del tessuto di granulazione e la epitelizzazione. La maggior parte di questi prodotti richiede poche applicazioni[24].

➤ **Debridement chirurgico e con taglienti**

Il "*debridement* con taglienti" è definito come una procedura chirurgica di minore entità operata al letto del paziente che determina l'eliminazione del tessuto necrotico con un bisturi o forbici. Il "*debridement* chirurgico" è invece una procedura eseguita in anestesia generale, utilizzando diversi strumenti chirurgici[24].

La lama adoperata contiene la contaminazione batterica e rimuove le cellule senescenti, convertendo la ferita cronica in una acuta[14]. È normalmente effettuata dove la ferita risulta ampia, con infezione avanzata, dove l'osso e il tessuto infetti devono essere rimossi o dove il paziente è a rischio di sepsi. Tale tecnica permette una rimozione più veloce ed efficace dei detriti tissutali e risulta ideale laddove le altre tecniche vengano escluse o le condizioni

dell'individuo necessitano di risultati rapidi; inoltre consente una precisa asportazione del tessuto devitalizzato, particolarmente utile se si è in presenza di necrosi, potenzialmente fatale[24]. È anche il trattamento prescelto per i pazienti affetti da ulcera da piede diabetico neurotrofico con callo ipercheratoso sul bordo della ferita. Oltre alla rapidità del processo, consente di chiudere la ferita se viene effettuata una ricostruzione in situ[24].

Tale tecnica può risultare dolorosa e portare a sanguinamento o danneggiare tendini e nervi[14]; inoltre, non è indicata in caso di ulcere non sufficientemente vascolarizzate e deve essere effettuata con estrema attenzione in pazienti immunosoppressi o sotto farmaci anticoagulanti. Deve essere processata da professionisti esperti[23].

In termini di costi il *debridement* con taglienti è relativamente poco costoso: può essere svolto da un solo membro del personale medico e i materiali necessari al trattamento come garze, guanti e tamponi non risultano dispendiosi. Contrariamente, lo sbrigliamento chirurgico ha costi elevati poiché richiede un'equipe preposta e il costo della sala operatoria con annessi strumenti chirurgici e anestesia[24].

➤ **Debridement enzimatico**

Avviene tramite l'azione di enzimi proteolitici come collagenasi, mieloperossidasi, elastasi, idrolasi acida e lisozima; in forma di gel o unguento[14]. Include l'applicazione topica di enzimi esogeni sulla superficie della ferita affinché essi lavorino sinergicamente con quelli endogeni per rimuovere tessuto non vitale. È un metodo utile per togliere l'escare da ferite ampie laddove le tecniche chirurgiche non risultano abbastanza efficaci. Talvolta, si produce un eccesso di essudato o un'irritazione della pelle circostante. È ideale per pazienti in cui altri tipi di *debridement* sono esclusi o quando vi è un rischio emorragico[24].

Durante il *debridement* gli enzimi provvedono all'idrolisi dei legami peptidici in modo da rimuovere il tessuto necrotico dalla cute. Tali enzimi si suddividono in esopeptidasi ed endopeptidasi. Queste ultime rompono i legami peptidici all'interno delle proteine[24].

Alcuni esempi di agenti utilizzati sono: 1) la fibrinolisi/DNase che rompe la fibrina, inattiva il fibrinogeno, dilata i vasi sanguigni per permettere ai macrofagi di raggiungere il sito e operare lo sbrigliamento[23] 2) la collagenasi che, rompendo la struttura del collagene in vari punti, ne determina la degradazione; tuttavia essa non attacca fibrina, cheratina, tessuto adiposo ed emoglobina[24] 3) la papaina che digerisce i tessuti devitalizzati liquefacendo i detriti derivanti dall'attività della fibrina (pH 3-12); si combina con l'urea che denatura anche le proteine, rendendole più vulnerabili all'azione enzimatica[24]. Al fine di assicurare l'efficacia, la ferita deve essere sufficientemente umida. Il vantaggio dell'avvalersi di enzimi proteolitici consiste nella manipolazione semplice e non pericolosa, grazie a un trattamento che non prevede versamento di sangue né causa particolare dolore[24].

➤ **Debridement meccanico**

Il *debridement* meccanico si avvale di prodotti quali garze asciutte, garze impregnate, garze wet-to-dry e medicazioni in fibre monofilamento per eliminare il tessuto necrotico dalla lesione[24]. In generale, questo metodo può essere fastidioso per il paziente che si vede danneggiare i tessuti neoformati[23].

Per quanto riguarda le garze wet-to-dry, sulla ferita viene applicata la garza inumidita e, man mano che il tessuto devitalizzato si disidrata, esso aderisce alla medicazione assumendo una consistenza dura; quando la garza viene rimossa il materiale organico, ormai sano, viene liberato. Sono medicazioni che possono essere impiegate per periodi ridotti nelle ferite

necrotiche infette, poiché contribuiscono ad aumentare il rischio di infezione, mentre i residui delle garze possono essere riconosciuti dall'organismo come corpi estranei[24].

Infine, le garze monofilamento agiscono facendo in modo che i detriti e lo slough rimangano vincolati nelle fibre composite, rimuovendoli. È un metodo veloce, facile da operare e causa minimo dolore, l'applicazione prevede che la medicazione venga apposta sulla superficie per circa 2-4 minuti, dopo essere stata inumidita[24].

➤ **Terapia biologica o larvale**

È un processo emergente che si avvale dell'uso di larve per il *debridement*. Già usata nella Prima Guerra Mondiale dove le ferite infestate da tali specie risultavano più pulite e meno infette rispetto a quelle non trattate. Oggi, larve sterili di mosca *Lucilia sericata* vengono applicate per produrre potenti enzimi adatti a distruggere i tessuti morti senza intaccare quello di granulazione[23]. Gli enzimi proteolitici, tra cui tripsina e collagenasi, contenuti nei succhi gastrici delle larve, sbrigliano la cute necrotica, escludendo i tessuti sani; parallelamente il loro movimento induce la produzione di essudato, idratando la lesione. L'azione delle larve applicate consiste nell'ingerire il tessuto liquefatto, rimuovendo i batteri nel loro intestino; i microrganismi ancora in vita, che non sono stati eliminati nel canale alimentare a pH acido, vengono avvolti in una struttura tubolare chiamata *membrana peritrofica* [24]. Per portare a compimento il processo è necessario ammorbidire l'escara dura e controllare l'umidità della ferita, in quanto le larve sono soggette ad annegamento in presenza di eccessivo essudato. Contrariamente, una certa quantità di umidità deve essere sempre presente poiché altrimenti le larve, disidratate, morirebbero[23].

Nello specifico, l'azione avviene tramite applicazione diretta di larve libere sulla ferita o l'uso di una Biobag (sacchetto in rete in cui sono racchiuse le larve, evitandone la migrazione). Questa viene apposta sulla ferita in base alle sue dimensioni, contiene larve sterili vive e piccole sfere di schiuma in un sacchetto in rete[24]. La dose raccomandata è di 10 larve per una durata di 3 giorni, collocate direttamente sul letto della ferita[23]. La terapia biologica, oltre a contrastare la proliferazione batterica, viene utilizzata in quanto efficace nel ridurre il dolore, l'odore sgradevole e generalmente è sufficiente un singolo trattamento[25].



Figura 13. Esempio di Biobag[26]

➤ **Soluzioni tecniche**

Altri tipi di *debridement* sono i lavaggi a getto/idrochirurgia, gli ultrasuoni e la pressione topica negativa.

I lavaggi a getto/idrochirurgia sono dette anche tecnologie dirette di *debridement*(DDT)[24] e consistono in getti di acqua ad alta e bassa pressione usati per rimuovere batteri, detriti e tessuto non vitale dalla lesione, sebbene i microbi possano essere addirittura portati più in profondità da tale tecnica. I lavaggi sono ideali per ferite in fase infiammatoria e inadatti per quelle in fase di granulazione, poiché potrebbero rimuovere le cellule endoteliali ed epiteliali presenti[14].

Gli ultrasuoni(DDT), invece, nella gamma dei megahertz modificano strutture quali materiale proteico e cellule, contribuendo alla distruzione dei tessuti interessati. Un vantaggio è che tale tecnologia può essere adoperata in presenza di tendini, tessuto connettivo lasso e perfino osso. Malgrado ciò, si può incorrere in emorragia e danneggiamento delle tessuti sani[24].

Infine, vi è la pressione topica negativa che è una tecnologia di *debridement* indiretto(IDT), essa agisce sulla macrostruttura e microstruttura della lesione. Rimuove dapprima essudato e fluidi dalla ferita, con riduzione dell'edema perilesionale e, in seguito, esercita pressione inducendo contributi positivi nella morfologia e nella funzionalità cellulare. Favorisce, a tal proposito, angiogenesi, fibrogenesi e attività dei leucociti e macrofagi[24].

1.1.7 Prevalenza e costi

Vengono esaminati i dati dell'anno 2014 appartenenti ai beneficiari Medicare, una dei sistemi assicurativi sanitari più diffuso negli Stati Uniti. Medicare si occupa, infatti, di assicurare un'assistenza sanitaria a persone con più di 65 anni o con patologie disabilitanti[27].

Nello studio di *Nussbaum et al.* circa il 14.5% degli individui assicurati, attestati intorno agli 8 milioni, ha ricevuto una diagnosi di ferita cronica o infezione correlata. Tra questi, le ferite più diffuse risultavano quelle infette derivanti da interventi chirurgici (4%), seguite da ulcere del piede diabetico(3,4%) e le ferite chirurgiche non cicatrizzanti (3,0%), mentre la prevalenza per gli altri tipi di lesione variava tra 0,1% al 2,7% con una incidenza maggiore negli individui di 75 o più anni. Tutti i dati di prevalenza sono visibili nel grafico sottostante, in base al tipo di ulcera[28].

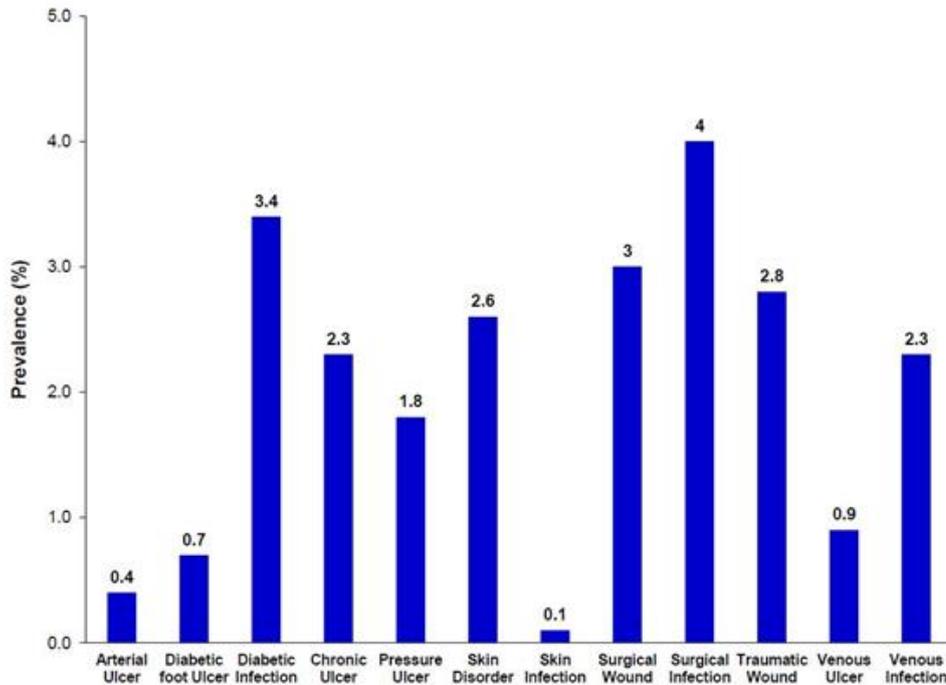


Figura 14. Stime Prevalenza delle ulcere nei beneficiari Medicare nell'anno 2014[28]

Per quanto riguarda il costo delle ferite croniche sulla spesa sanitaria, nell'indagine, i costi sostenuti da Medicare per tutti i tipi di ulcera ammontavano a 28,1 miliardi di dollari al di sotto della stima di intervallo minore, di 31,7 miliardi di dollari al di sotto della stima di fascia media e 96,8 miliardi per il limite superiore. Per ciascuna tipologia di ferita è stato calcolato il relativo costo. Le ulcere più costose risultavano quelle originatesi da interventi chirurgici (11,7, 13,1 e 38,3 miliardi di dollari) seguite da quelle per diabete (6,2, 6,9 e 18,7 miliardi di dollari), in ultimo i costi della ferita sostenuti per le ulcere venose (0,72, 0,78 e 1,5 miliardi di dollari)[28]. La media delle spese a ferita cronica risultava di 3415, 3859 e 11781 miliardi di dollari rispettivamente per i tre tipi descritti.

Su base individuale, i pazienti con più alti costi si dimostravano coloro affetti da ulcere arteriose (9105, 9418 e 13571 miliardi di dollari) seguite dalle ulcere da pressione (3969, 4436 e 21060 miliardi di dollari).

La spesa per la cura delle ferite a seconda della classe di servizio era più alto per pazienti non ospedalizzati con 9,9, 11,3 e 35,8 miliardi di dollari, mentre quelli ricoverati mostravano addirittura dei costi inferiori (4,9, 5,7 e 24,3 miliardi di dollari).

Complessivamente Medicare ha stimato per i propri beneficiari una spesa annuale pari a 28 bilioni di dollari, che, se inclusi quelli comprensivi delle ulcere in seconda diagnosi, oscillano dai 31.7 a 98.8 bilioni di dollari totali[28].

Infine, in generale si stima che il costo dei materiali influisca sul management delle ulcere per circa il 17-22%, il tempo del personale assistente per 33-41% mentre ad avere una grande influenza sia l'ospedalizzazione dei pazienti con una percentuale variabile tra 37% e 49%[29].

1.3 Il wound dressing

È importante che una ferita, che si tratti di un taglio di minore o maggior rilevanza, venga curata correttamente e parte di questo processo include il *wound dressing*. Il termine *wound dressing* indica una medicazione progettata per essere a contatto con la ferita ed accelerarne il processo di guarigione; essa differisce in maniera sostanziale da una benda che, invece, svolge il compito di tenere semplicemente in posizione la medicazione.

In base al tipo di lesione, è necessario utilizzare materiale di *dressing* opportuno. Per tale ragione, è fondamentale la scelta della tipologia che dovrebbe possedere le seguenti proprietà[5]:

- A. Fornire o mantenere l'ambiente umido
- B. Migliorare la migrazione epidermica
- C. Promuovere l'angiogenesi e la sintesi del tessuto connettivo
- D. Consentire scambio di gas tra tessuto danneggiato e ambiente
- E. Mantenere la temperatura dei tessuti appropriata per migliorare il flusso sanguigno verso il letto della ferita e migliorare la migrazione epidermica
- F. Fornire protezione contro l'infezione batterica
- G. Essere non aderente alla ferita e facile da rimuovere dopo la guarigione
- H. Fornire azione di *debridement* per migliorare la migrazione, il supporto dei leucociti e l'accumulo di enzimi
- I. Essere sterile, non tossica e non allergenica

Nel corso del tempo diversi *wound dressing* sono stati progettati ed applicati, dalle cosiddette medicazioni tradizionali alle più recenti medicazioni moderne che vedono l'uso di combinazioni di materiali innovativi e/o agenti antibatterici al loro interno:

- **TRADIZIONALI**

Rientrano in questa categoria prodotti come garze, cerotti, bende (naturali o sintetiche) e cotone idrofilo atti a proteggere la ferita da possibili contaminazioni esterne ed assorbire eventuale essudato.

Generalmente le medicazioni tradizionali sono indicate sia per trattare ferite pulite e asciutte con bassi livelli di essudato, sia come medicazioni secondarie⁴[3].

I *wound dressing* tradizionali però non riescono a fornire sufficiente ambiente umido richiesto dalla ferita e, soprattutto, per via delle fibre di viscosa e cotone impiegate, tendono a causare discreti traumi alla cute durante la loro rimozione.

Oltre alle medicazioni propriamente assorbenti, si possono annoverare anche altri tipi utilizzati in ambito chirurgico:

- Medicazioni assorbenti rilevabili tramite raggi X
- Bendaggi estensibili
- Medicazioni e bendaggi tubulari
- *Wound dressing* e bendaggi medicati

Tra tutti, particolarmente interessanti risultano quelle rilevabili ai raggi X, in quanto composte da fibre di polipropilene imbevute di Solfato di Bario (BaSO₄) e localizzabili nella ferita se accidentalmente lasciate durante il post-operatorio[5].

- **MODERNE**

⁴ Medicazione di fissaggio o che va a supportare, integrare o completare l'azione della medicazione primaria

I dressing moderni sono stati generati principalmente per ovviare alla complicata rimozione delle medicazioni tradizionali, favorire la riparazione tissutale oltre alla mera copertura da contaminazioni e, non meno importante, contribuire a mantenere la lesione ben idratata[3]. Essi includono per lo più polimeri sintetici classificati in passivi, attivi e bioattivi. I passivi possono essere di tipo non-occlusivo come garze o medicazioni in tulle utilizzate per coprire la ferita.

Le medicazioni attive, d'altra parte, si dividono in semi-occlusive e occlusive, fungendo da barriera contro la formazione del film batterico; si trovano in commercio sotto forma di film, schiume, idrogel e idrocolloidi[3].

A partire dal 1900, sempre più tipologie di *wound dressing* moderni sono stati prodotti e introdotti nel mercato:

➤ **Film semi-permeabili**

Tali medicazioni sono costituite da poliuretano trasparente e aderente che permette la trasmissione di vapore acqueo, anidride carbonica ed ossigeno dalla ferita, fornisce il *debridement* dell'escare e funge da barriera contro i batteri. Sono particolarmente elastiche e flessibili tali da poter assumere qualsiasi forma senza ulteriori ritocchi, nonostante non mostrino un'elevata capacità di assorbire essudati. Altra caratteristica è la trasparenza, che permette di ispezionare la cute senza la rimozione della medicazione. Quindi queste soluzioni vengono raccomandate per lesioni in via di epitelizzazione e lesioni superficiali con essudati bassi. Es. *Opsite, Tegaderm, Biooclusive*[3].

➤ **Schiume semi-permeabili**

Le schiume sono materiali porosi dotati di grande flessibilità e capacità di assorbimento[5].

Queste sono normalmente costituite da schiuma idrofila e idrofoba, talvolta con bordi adesivi. Lo strato esterno idrofobo protegge la lesione dalla penetrazione di liquidi e allo stesso tempo permette lo scambio di gas e vapore acqueo. Le schiume in poliuretano, per esempio, quando applicate alla ferite essudanti, assorbono i fluidi grazie all'azione capillare attraverso il tessuto, quando invece appoggiate su lesioni relativamente asciutte riescono con i layers sottostanti a ridurre la perdita di gas e a prevenire la disidratazione della cute[5].

Le medicazioni in schiuma sono adatte per ulcere agli arti inferiori e ferite da moderate a molto essudanti o per quelle con tessuto di granulazione in atto. Sono generalmente utilizzate come medicazioni primarie per l'assorbimento, ma non applicabili come medicazioni secondarie a causa della loro elevata assorbenza e permeabilità al vapore acqueo. Lo svantaggio è che si richiede un ricambio frequente, quindi non sono opportune per lesioni poco essudanti, secche e cicatrici dato che dipendono dagli essudati per l'iter di guarigione. Esempi in commercio: *Lyof foam, Allevyn e Tielle*[3].

➤ **Idrogeli**

Gli idrogeli sono networks polimerici che si rigonfiano in presenza di fluidi biologici. Sono ampiamente usati nel drug delivery e nella riparazione di tessuti e organi.

Possono essere di due tipi: (a) in foglietti o sheets (b) amorfi[5].

Tipicamente i primi sono polimeri di poliacrilamide o ossidi di polietilene parzialmente intrecciati a formare una membrana contenente sufficientemente acqua

(normalmente fino al 96%). Il loro alto contenuto acquoso aiuta i tessuti di granulazione e l'epitelio in ambiente umido, mentre le loro proprietà elastiche consentono un'applicazione e rimozioni facili dopo la guarigione. Gli idrogel in foglio hanno una struttura tridimensionale e sono ideali per il trattamento delle ferite superficiali. Dall'altro lato, gli idrogel amorfi hanno solitamente la forma di un fluido viscoso o pasta. Sono costituiti da una serie di polimeri idrosolubili, come carbossimetilcellulosa reticolata, amidi modificati, alginato, pectina, ecc. dispersi in acqua contenente circa il 15% di glicole propilenico[5]. Sebbene possano assorbire una limitata quantità di essudato, essi vengono utilizzati principalmente per assimilare acqua in modo da essiccare ferite. Quando applicati ai siti della ferita, inoltre, apportano sollievo grazie al loro effetto di raffreddamento sulla stessa. Talvolta, incorporano fattori di crescita, farmaci agenti e antimicrobici per velocizzare il processo di guarigione delle ferite.

In generale, gli idrogeli sono indicati per lesioni croniche asciutte, necrotiche, ulcere da decubito e ustioni. Nota negativa è che, oltre alla loro bassa resistenza meccanica, determinano accumulo di essudato che produce macerazione dei tessuti e cattivo odore. Es. *Polimeri Intrasite, Nu-gel, Aquaform*[3].

➤ **Idrocolloidi**

Risultano le medicazioni più usate e sono formate da granuli idrofilici dispersi in una matrice elastica e adesiva[5]. Tale tipologia è ottenuta attraverso la combinazione di agenti gelificanti come la carbossimetilcellulosa, la gelatina o la pectina con altri materiali quali elastomeri e adesivi come poliisobutilene.

Gli idrocolloidi sono permeabili al vapor acqueo ma non ai batteri e sono caratterizzati da un'ottima capacità di assorbimento degli essudati (infatti, quando entrano in contatto con questi, i granuli formano un idrogelo che fornisce un ambiente umido mentre la parte adesiva mantiene la copertura aderente alla lesione) e *debridement*.

È stato dimostrato che i dressing idrocolloidali promuovono la fibrinolisi e l'angiogenesi, inoltre incoraggiano la produzione di fattori di crescita e altre sostanze bioattive utili[5]. Di contro, queste non sono altamente deformabili e tendono a lasciare residui nel letto della ferita. Le applicazioni ideali sono le ferite come piaghe da decubito, lievi ustioni e lesioni traumatiche; non adatte ad ulcere neuropatiche o ferite altamente essudanti. Fondamentalmente usati come medicazioni secondarie. Es. *Granuflex, Comfeel, Tegisorb*[3].

➤ **Medicazioni a base di *alginato***

I dressing a base di alginato sono composti da sali di sodio e calcio con unità di acido mannuronico e glicuronico. La capacità di assorbimento è ottenuta dalla spiccata formazione di un gel idrofilo sulla ferita, che ne limita gli essudati e minimizza la contaminazione batterica. Una volta applicate le medicazioni di alginato sulla zona d'interesse, gli ioni presenti nell'alginato vengono scambiati con gli ioni sodio nei fluidi corporei a formare un film protettivo[5]. Tali medicazioni sono adatte per drenaggi da moderati a pesanti, non consigliate per ferite a secco, ustioni di terzo grado o ferite gravi con osso esposto. Anche queste soluzioni richiedono medicazioni secondarie perché potrebbero disidratare la ferita ritardando la guarigione, sebbene

non necessitano di ricambi frequenti e siano economiche. *Sorbsan, Kaltostat, Algisite* sono alcuni esempi disponibili in commercio[3].

➤ **Medicazioni composite**

Difficilmente un solo tipo di materiale riesce a soddisfare tutti i requisiti per un *wound dressing* ottimale, è proprio a questo scopo che sono state create le medicazioni composite. Difatti, esse posseggono una combinazione di vantaggi, essendo formate da più componenti[3].

Attualmente possono essere prodotte utilizzando poliuretano, foglietti idrocolloidali, seguiti da un second layer di materiale assorbente di tessuto-non-tessuto ed un terzo di membrana poliuretana. Tali prodotti racchiudono le proprietà di non aderenza degli idrocolloidi e schiume di poliuretano insieme alla elevata capacità di assorbenza dei tessuti, unendo infine la resistenza ed il potere protettivo delle membrane di PU. Tutto ciò rende tali *wound dressing* semplici da applicare e rimuovere, nonché più duraturi di qualsiasi altra medicazione usata singolarmente, malgrado siano più costosi e meno flessibili[5].

• **MEDICATE**

Le medicazioni con farmaci o agenti incorporati svolgono un ruolo importante nel processo di guarigione direttamente o, indirettamente, mediante rimozione di tessuti necrotici. I composti comunemente incorporati all'interno comprendono agenti antimicrobici, fattori di crescita ed enzimi. Le medicazioni antimicrobiche disponibili in commercio includono quelle impregnate d'argento come le fibre idrocolloidali, film di schiuma poliuretana e gel di silicone. Anche lo iodio, antisettico, agisce sulle cellule batteriche attraverso la degradazione ossidativa dei componenti cellulari interrompendo la funzione delle proteine. Un altro elemento importante in questa categoria sono i fattori di crescita: tra i più rilevanti si trovano il fattore di crescita piastrinico (PDGF), che promuove il reclutamento chemiotattico, la proliferazione delle cellule e crescente angiogenesi, il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita epidermico (EGF) e la trombina piastrinica[3].

• **TISSUE ENGINEERING**

Esistono due tipi di tessuti ingegnerizzati: uno che imita lo strato di pelle composto da cheratinociti e fibroblasti su matrice di collagene e un secondo che invece contiene solamente elementi dermici con fibroblasti su matrice cellulare. Il loro maggior compito è quello di secernere e stimolare il fattore di crescita per ottenere l'epitelizzazione della lesione e condurla a completa ristabilizzazione.

Le medicazioni bioingegnerizzate sono adatte alle ulcere del piede diabetico o ulcere venose. Esempi in commercio: *Apligraf, Alloderm, Biobrane, Laserskin*[3].

1.4 Gli agenti antibatterici

Gli agenti antibatterici hanno la capacità di interferire con la crescita e la moltiplicazione batterica che avviene di solito nel letto delle lesioni cutanee. Possono essere usati singolarmente (si veda gli antibiotici) o inseriti all'interno delle medicazioni già trattate; la loro efficacia è fortemente influenzata da parametri quali la concentrazione, la temperatura, il pH, la famiglia batterica in utilizzo, non meno importanti risultano la presenza di umidità e di ossigeno. Essi possono avere due tipologie di attività[30]:

- Battericida → causa l'uccisione della cellula batterica
- Batteriostatica → causa l'arresto della crescita batterica

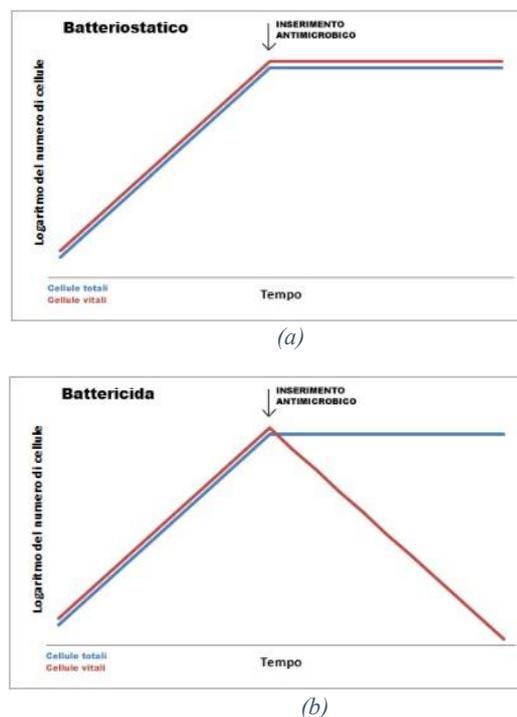


Figura 15. Schemi degli effetti antibatterici a confronto.
(a) Batteriostatico (b) Battericida[145]

Esistono due criteri specifici per determinare l'attività antimicrobica di una data sostanza: i valori di *Minimum Inhibiting Concentration* o MIC e *Minimum Bactericide Concentration* o MBC. La prima si riferisce alla più bassa concentrazione di un certo agente antimicrobico che abbatte lo sviluppo batterico; di norma, si effettuano delle colture di batteri nelle quali si inserisce l'agente in diverse concentrazioni e si testa la più efficace (dove la crescita microbica è inibita), quella più bassa risulta come MIC. La seconda, invece, intende la minima concentrazione con cui l'agente provoca la morte del microrganismo[30].

Tra gli agenti più studiati si trovano:

- Gli oli essenziali
- Il miele
- Gli antibiotici

- L'argento
- Le batteriocine
- I materiali nanostrutturati

Gli **oli essenziali** sono sostanze di origine completamente naturale, senza elementi tossici, ricavate dalla distillazione dei componenti di alcune piante. Risultano una valida alternativa agli antibiotici poiché non presentano importanti effetti collaterali e possono essere assunti per via topica. Si presentano sotto forma di liquido oleoso di densità variabile (anche solido) dal profumo intenso, e di solito assumono il nome della pianta da cui sono derivati. Possiedono un'azione contro batteri multi-resistenti come *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* *meticillino-resistente* (MRSA), e contro funghi (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*)[31][147].

Gli oli sembrano possedere un meccanismo di attività antibatterica complesso ed ancora non totalmente chiarito ma è generalmente accettato il fenomeno per cui, data la loro idrofobicità, tali sostanze riescano a penetrare tra i lipidi della membrana del batterio, determinando un'alterazione delle strutture cellulari ed aumentandone la permeabilità. L'eccessivo rilascio di ioni e molecole conducono poi alla morte del batterio[31].

Si noti che tutto ciò risulta influenzato da due principali fattori:

- 1) Dalla tipologia di attività antibatterica, che si basa sulla composizione chimica dei vari oli essenziali
- 2) Dalla specie batterica cui si interfacciano gli oli, legata alla struttura della parete cellulare

Nella letteratura, gli oli essenziali risultano essere più aggressivi verso i batteri Gram positivi rispetto ai Gram negativi[31].

La maggior parte dei preparati, anche se naturali, può causare effetti tossici quando somministrati in particolari condizioni: infatti, sono stati segnalati sintomi di irritazione e di allergia in soggetti predisposti, con reazioni dose-dipendenti. Di norma, tali risposte si verificano utilizzando oli datati, esposti ad agenti esterni, che determinano lo sviluppo di prodotti di ossidazione potenzialmente allergenici.

Tra i più importanti si citano il Tea Tree Oil, l'olio di eucalipto, di cannella e di chiodi di garofano[31].

Il **miele** ha recentemente suscitato l'interesse dei ricercatori come agente antibatterico. Ciò lo si deve al fatto che la sua attività antibatterica è data dalla presenza di un particolare enzima chiamato *glucosio ossidasi*, che ha un'azione catalitica sul glucosio in presenza di ossigeno. Tale catalisi produce perossido di idrogeno e acido gluconico i quali sono i diretti responsabili dell'eliminazione batterica. In aggiunta, il pH del miele risulta acido ed essendo un composto molto concentrato esso genera nei microrganismi un letale effetto osmotico[32].

In letteratura, si possono trovare diverse medicazioni basate sul meccanismo antibatterico del miele. Ad esempio, si può produrre un substrato nel quale inserire la glucosio ossidasi e il glucosio, lo si applica alla ferita e si attende che rilasci glucosio. Si genera così perossido di idrogeno grazie all'ossigeno già presente nella ferita[33]. Oltre a ciò, si possono utilizzare in concomitanza ioni di iodio che a contatto con il perossido determinano la formazione sia di ossigeno che di iodio, componente anch'esso antibatterico(seppur in maniera minore).

In alternativa, *Binden-Mirkemaier et al.*[34] hanno realizzato uno scaffold nanofibroso a base di policaprolattone (PCL) contenente miele di Manuka e dimostrato l'efficacia delle proprietà di wound healing, grazie alla proliferazione di fibroblasti, e dell'attività antimicrobica, in particolare contro *E.coli*.

Gli **antibiotici** sono sostanze ottenute da organismi viventi o sintetizzate in laboratorio, capaci di impedire la crescita dei microrganismi e di provocarne la morte.

Essi vengono adoperati esclusivamente per curare o prevenire infezioni batteriche, non sono infatti indicati nel caso di funghi o virus. Generalmente sono prescritti quando è difficile che l'infezione possa guarire spontaneamente oppure quando i tempi di guarigione risulterebbero troppo lunghi[35] Possono avere un'azione batteriostatica o battericida (si veda sotto "Agenti antibatterici").

Normalmente suddivisi in due classi:

- *Ampio spettro*, efficaci contro batteri Gram positivi e negativi
- *Spettro ristretto*, efficaci solo contro un ceppo batterico specifico

Si avvalgono di quattro meccanismi principali di azione all'interno delle cellule antagoniste[36]:

- Inibizione della sintesi della parete cellulare batterica
- Blocco dei pathways metabolici
- Interferenza nella sintesi proteica
- Inibizione della sintesi degli acidi nucleici

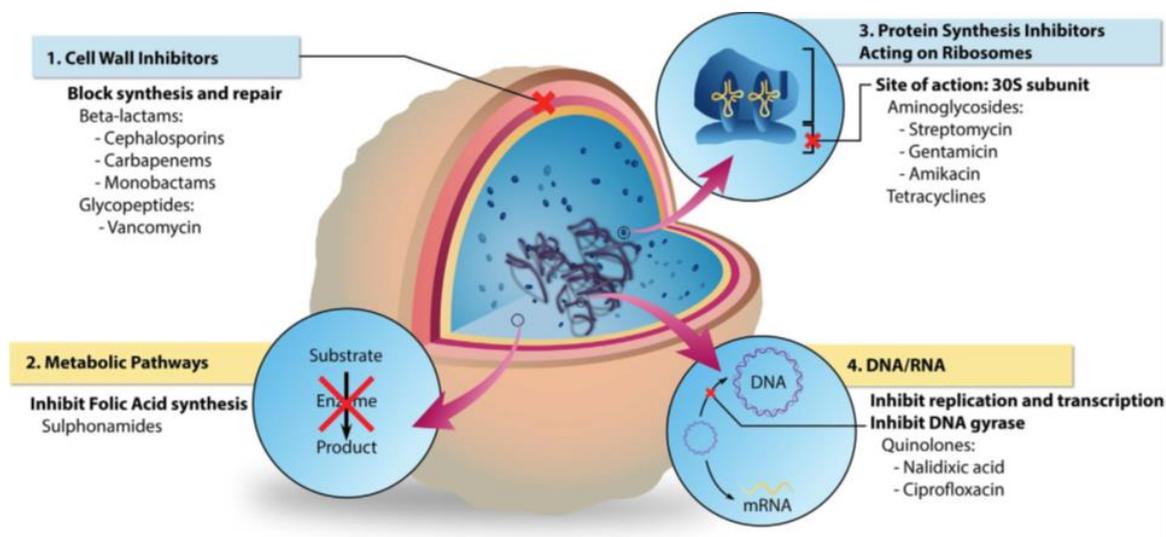


Figura 16. Rappresentazione dei differenti meccanismi antibiotici[36]

Nella tabella di seguito è possibile osservare le classi di antibiotico più usate e diffuse[35]:

Classe	Caratteristiche
Aminoglicosidi	Agiscono in modo ottimale contro i Gram negativi, anche sui gram positivi ad eccezione degli stafilococchi
Carbapenemi	Classe di beta-lattami, sono ad ampio spettro. Bloccano la formazione della parete cellulare batterica
Cefalosporine	Fanno parte dei beta-lattami. Bloccano la formazione della parete cellulare batterica
Fluorochinoloni	Agiscono sul DNA del batterio causandone la morte
Glicopeptidi	Utilizzati contro i Gram positivi. Bloccano la formazione della parete cellulare.
Macrolidi	Ostacolano la sintesi delle proteine coinvolte nella riproduzione nei batteri

Ossazolidinoni	Ostacolano la sintesi delle proteine coinvolte nella riproduzione dei batteri
Penicilline	Fanno parte dei beta-lattami. Sono utili contro Gram positivi e alcuni Gram negativi
Polipeptidici	Bloccano la formazione della parete cellulare batterica
Rifamicine	Bloccano la formazione della parete cellulare batterica. Usati nello specifico contro infezioni superficiali da <i>Staphylococcus aureus</i>
Sulfamidici	Impediscono la riproduzione del materiale genetico batterico, causandone la morte
Tetracicline	Ostacolano la produzione di acido folico nel batterio, che non può più riprodursi
Clindamicina	Fa parte della famiglia dei lincomisidi. Impedisce ai batteri la sintesi delle proteine coinvolte nella riproduzione
Daptomicina	Interferisce con la replicazione del materiale genetico

È interessante ricordare alcuni nomi commerciali di largo utilizzo quali Augmentin, Clavulin, Cefixoral, Gentalyn e Ciproxin[37].

L'**argento** è un metallo nobile che, in funzione della concentrazione con cui viene utilizzato, mostra la capacità di inibire sensibilmente la replicazione batterica, virale e micotica.

L'attività di tale metallo include un meccanismo di azione multiplo che comprende[38]:

- Danneggiamento della membrana cellulare → Gli ioni Ag^+ determinano nel batterio uno stato di "vitale ma non coltivabile" (VBNC) mentre le relative nanoparticelle si ancorano ai differenti siti della cellula provocando vere e proprie falle nella membrana. Questo fenomeno produce lisi della cellula e accumulo di NPs nella membrana stessa
- Produzione di ROS → I risultati indicano che l'inibizione della crescita microbica potrebbe essere determinata dalla formazione delle specie ossidative dalla superficie delle NPs, che inducono poi ad un danno membranale da radicale
- Danneggiamento di RNA e DNA → Le nanoparticelle in argento interagiscono con l'azoto esociclico presente in adenina, guanina, citosina. Ciò causa un danno genetico letale
- Alterazione di proteine e processi enzimatici → Il rilascio degli ioni argento può nuocere alle proteine contenenti tioli nella parete cellulare e danneggiarne le funzioni
- Alterazione della respirazione cellulare → Le NPs interrompono la sintesi di energia per tutte le reazioni ATP dipendenti. Questo pregiudica il corretto metabolismo della cellula batterica portandola alla morte.

Sempre a riguardo, attualmente studi scientifici di *Ivask et al.* hanno evidenziato che l'attività antimicrobica dell'argento testata contro *E.coli* è maggiormente svolta da nanoparticelle con diametri entro i 10 nm rispetto agli ioni, questo perché le prime presentano più facilità di penetrare nella membrana a dispetto dei secondi. Parallelamente, al di sopra del suddetto valore è predominante l'efficacia degli ioni Ag^+ [39][40].

Può essere utilizzato sottoforma di metallo puro, Sali (Nitrato di Argento) o nanoparticelle.

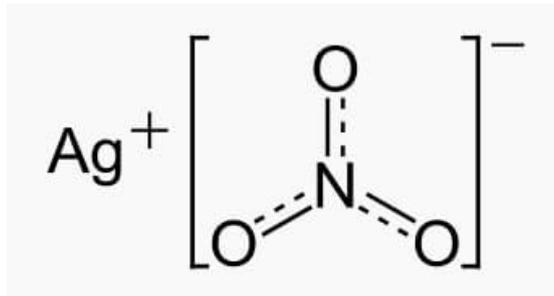


Figura 17. Formula del nitrato di argento[146]

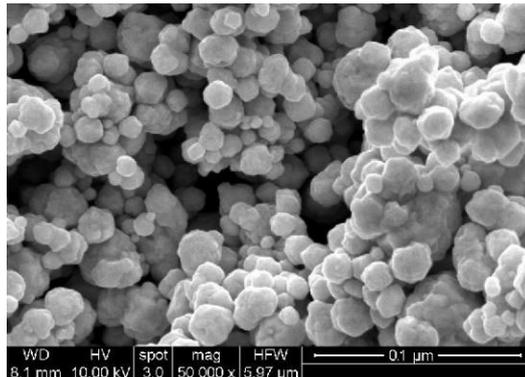


Figura 18. Nanoparticelle di Ag al SEM[41]

Le **batteriocine** si riferiscono a peptidi o proteine che hanno la funzione di contrastare la replicazione batterica, anche in concentrazioni ridotte. Sono sintetizzate dai ribosomi di un ampio range di batteri quali lactobacilli, enterococchi e bifidobatteri. Vengono divise in due gruppi principali a seconda della loro struttura[43]:

- Classe I: sono i peptidi che subiscono modificazioni post-traduzionale
- Classe II: sono i peptidi che rimangono invariati

Molte batteriocine hanno, di norma, un'azione a spettro limitato e altamente specifica, per esempio quelle prodotte dai batteri lattici (LAB) mostrano un'attività rivolta contro i Gram positivi[42].

Nello specifico, lo spettro delle batteriocine derivate dai batteri Gram Positivi è efficace verso gli stessi Gram positivi e, talvolta, anche verso i Gram negativi; l'efficacia, invece, delle stesse prodotte da Gram negativi dipende dalla specie del batterio antagonista.

L'informazione per la sintesi delle batteriocine è contenuta sia a livello plasmidico che cromosomico e probabilmente avviene spontaneamente o come conseguenza di sollecitazioni fisiche, chimiche e ambientali[43]. Riguardo alla loro sintesi si possono fare due distinzioni a seconda del tipo di batteri che le produce:

- Gram positivi → Non presentano adsorbimento specifico
- Gram negativi → Legano le cellule target attraverso specifici recettori siti sulla membrana esterna delle stesse

Tra le batteriocine più note si citano la *pediocina* derivante dal *Pediococcus*, la *lactocina* dal *Lactococcus* e la *colicina* dall'*Escherichia coli*[43].

Per **materiali nanostrutturati** si intende un insieme di materiali con almeno una dimensione dell'ordine di grandezza di alcuni milionesimi di millimetro (10^{-9} m), utilizzati in numerose applicazioni per via delle molteplici proprietà. Tra queste si riscontra anche una rilevante attività inibitrice del biofilm batterico. A tale scopo, frequentemente, si utilizzano, sottoforma di Nanoparticelle (NPs), ossidi metallici quali Biossido di Titanio (TiO_2), Ossido di Zinco (ZnO), Ossido di Calcio (CaO) e Ossido di Magnesio (MgO) ma anche metalli puri come l'Argento (Ag) e l'Oro (Au).

I meccanismi antibatterici di cui si avvalgono tali NPs sono: (a) Stress Ossidativo (b) Rilascio di ioni (c) Interazione membrana batterica-nanoparticella[44].

Alla scala nanometrica si possono avere considerevoli differenze in termini di vantaggi rispetto al materiale usato in bulk come, ad esempio, la capacità di penetrare attraverso la membrana cellulare o l'essere economiche da sintetizzare. Nondimeno, fondamentale e caratteristico delle NPs risulta il rapporto area superficiale su volume, *Padmathy e et al.* [45] hanno difatti riscontrato una maggiore produzione di specie ossidative, e quindi di antibattericità, incrementando l'area specifica.

La classificazione dei nanomateriali può avvenire sotto diverse categorie, *Hett et Al.* [47] propone una suddivisione secondo il numero di dimensioni nanometriche, qui di seguito riportate[46]:

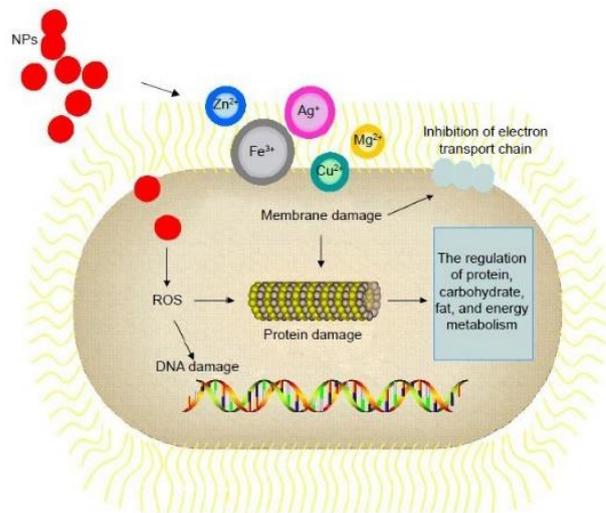


Figura 19. Meccanismi antimicrobici delle NPs[44]

➤ Una dimensione

Sistema ad un'unica dimensione avente forma di film nanometrico (1-100 nm) o di superficie, prevalentemente usato nell'industria chimica, elettronica e nei vari campi dell'ingegneria. Nello studio di *Park et al.* [48], viene indagata la proprietà antibatterica di un nanofilm di ossido di zinco depositato su vetro con applicazione nella disinfezione dell'acqua. Il film di ZnO viene applicato attraverso la Atomic Layer Deposition (ALD) e mostra nelle prove antibatteriche una tossicità verso la specie *S. aureus*, dovuta alla generazione di ROS mediante attivazione con raggi UV.

➤ Due dimensioni

- **Nanotubi di carbonio(CNTs):** Sistemi con un network esagonale di atomi di carbonio, diametro tra 1 nm e 100 nm in lunghezza, volto a formare un layer di grafite avvolto in modo cilindrico. Possono essere a uno strato o a due strati. Hanno caratteristiche metalliche e da semiconduttore, la loro resistenza meccanica può superare sei volte quella dell'acciaio. Sono chimicamente stabili e hanno una grande capacità di assorbimento molecolare. Nella letteratura esistono molti esempi di studi su tali nanodispositivi come agenti batterici: *Akhavan et al.*[49], *Renea Arias et al.*[50], *Bai et al.*[51] e *Rodrigues et al.*[52] hanno dimostrato efficacia verso ceppi batterici quali *S.mutans* ed *E.coli* sia con nanotubi a singola parete (*single-walled nanotubes* o SWNTs) che multi-parete (*multi-walled nanotubes* o MWNTs)[46].

➤ Tre dimensioni

- **Fullereni (Carbon 60):** Sono dispositivi sferici contenenti da 28 a 100 atomi di carbonio C_{60} . La struttura del fullerene è quella di un icosaedro a cui sono stati troncati i vertici e sostituiti da pentagoni[53]. La loro peculiarità risiede

in una proprietà fisica piuttosto unica: possono essere soggetti a pressioni estreme per poi riacquistare la medesima forma d'origine. Inoltre, i fullereni non sono soggetti ad aggregazione, privilegiandoli nell'uso come lubrificanti; nondimeno, essendo cavi e di dimensioni paragonabili alle molecole biologiche, possono essere riempiti con differenti farmaci per trovare applicazione nella medicina.

- **Dendrimeri:** I dendrimeri, utilizzati solitamente per il trasporto di farmaci ed imaging, hanno diametri solitamente compresi tra i 10 e 100 nm con diversi gruppi funzionali superficiali. Al loro interno si trovano un core e zone geometricamente ordinate con ramificazioni[54]. Questi possono essere funzionalizzati incapsulando molecole specifiche (es. agenti terapeutici o diagnostici) nel loro core, sono inoltre compatibili con strutture organiche come il DNA. Le applicazioni farmaceutiche includono formulazioni antiinfiammatorie, antimicrobiche, antivirali, anticancerogene e di screening. Lo svantaggio risiede nella loro tossicità, giacché posseggono la capacità di distruggere le membrane cellulari come conseguenza di una carica superficiale positiva.

Nello studio di *Abdel-Sayed, P. et al.*[55], si può notare come dendrimeri antimicrobici peptidici (AMPDs), usati in combinazione con bendaggi composti da cellule epiteliali progenitrici e matrici di collagene, in concentrazioni da 50 e 100 µg/mL mostrino efficacia contro il batterio multiresistente *P.Aaeruginosa* inibendone non solo la crescita bensì determinando anche angiogenesi e favorendo la loro applicazione nel wound healing.

- **Quantum dots:** Sono nanocristalli di semiconduttore con dimensioni oscillanti tra 2 e 10 nm. La struttura generale prevede un core ed uno shell, entrambi realizzati in semiconduttore, con funzionalizzazione superficiale. Essa è necessaria in quanto rende il quantum dot biocompatibile: da un lato, lo protegge dall'ambiente circostante, dall'altro ripara le componenti organiche dal core. Possiedono, in aggiunta, la proprietà di *fluorescenza*: se eccitati ad una determinata lunghezza d'onda, ne riemettono una corrispondente che dipende dalle loro dimensioni (particolarmente utile in diagnostica). Possono essere sintetizzati a partire dai diversi tipi di composti in base al metodo (colloidale o elettrochimico). I materiali più comunemente usati sono il Seleniuro di Cadmio (CdSe), Telluriuro di Cadmio (CdTe), Fosfato di Indio (InP) o Arseniuro di Indio (InAs). Utilizzabili nei devices optoelettronici, nei test del DNA (opportunamente codificati da colori), nel drug delivery e nel tissue engineering[46].

In ultimo, *Zhang et al.*[56] ha dimostrato che Quantum dots esagonali di ZnO posseggono un'attività antimicrobica determinata sia dalle piccole dimensioni, quindi da una maggior area specifica (risultante in un'aumentata superficie a contatto col batterio), sia dalla loro morfologia a faccia esagonale. A riguardo, per via degli ossigeni con legami non saturi e della carica positiva, la faccia (001) è capace di assorbire molecole di ossigeno e ioni idrossido, causando un alto livello di produzione di radicali liberi e perciò aumentando l'antibattericità[57].

La scelta di un appropriato metodo per la sintesi di nanoparticelle dipende sia dal materiale di cui sono costituite che dalla sostanza/farmaco che verrà incorporato nel nanodispositivo. Generalmente si suddividono i metodi in: 1) Top-down: si parte dal materiale in bulk per ottenere le NPs facendo uso di radiazioni ad alta energia (ioni, raggi X, elettroni)[58] 2) Bottom-up: si parte dal polimero sottoforma di particolato per poi ottenere NPs mediante opportuni trattamenti di aggregazione [58].



Figura 20. Tecniche di Sintesi di Nanoparticelle[46]

Materiali nanostrutturati come le nanoparticelle sono dispositivi altamente versatili e per questo fortemente influenzati da alcuni parametri (modulabili in fase di sintesi). Conseguentemente, le proprietà antibatteriche trovano efficacia o meno a seconda dei seguenti fattori, riportati dalla letteratura scientifica:

- I. **Morfologia:** La forma è un fattore importante, in quanto è risultato un potere antibatterico maggiore nelle NPs di Ag con forma cubica rispetto a quello delle stesse con morfologia sferica[59].
- II. **Dimensione:** Si è visto che nanoparticelle di TiO₂ e ZnO aumentano la loro efficacia antibatterica quanto più le dimensioni sono ridotte. In *Raghupathi et al.*[78], l'attività antibatterica delle NPs di ossido di zinco delle dimensioni di 12 nm risulta non solo inibente contro *S.aureus* ma anche battericida, a differenza di nanoparticelle con diametro maggiore di 100 nm che mostrano un'azione di inibizione incompleta[57].
- III. **Concentrazione:** Di norma si presenta una attività deleteria per i batteri quanto più aumenta la concentrazione delle NPs nel medium. Nello studio di *Liu et al.* [60], si osserva che impiegando nanoparticelle di ZnO, di dimensioni di 70 nm per contrastare *E.coli*, l'efficacia antimicrobica aumenta all'aumentare delle concentrazioni usate: in questo caso si ha un'inibizione totale per quella massima testata, con valore di 12 mmol l⁻¹.
- IV. **Modificazioni superficiali:** Le modificazioni delle nanoparticelle influisce particolarmente sulla loro interazione con i microrganismi. Si è notato che particelle di ZnO rivestite di Oro o Fluorina migliorano le loro proprietà fotocatalitiche e la produzione di specie ossidative rispetto alle stesse NPs prive di doping[59].
- V. **Carica superficiale:** Un potenziale zeta positivo influisce sull'attecchimento delle NPs ai batteri (generalmente a carica superficiale negativa), infatti l'accumulo di particelle cationiche inibisce la crescita batterica. Ne è un esempio Mg(OH)₂, il cui meccanismo di tossicità, dato dal proprio potenziale zeta positivo, viene investigato nello studio di *Pan X et al.*[61].
- VI. **pH del medium:** il pH è un fattore che contribuisce alla antibattericità giacché si è notato che lo ZnO aumenta la propria dissoluzione ad un pH ridotto e quindi la propria attività contro i batteri. Parimenti, si ha anche una maggiore adesione delle

nanoparticelle alla superficie batterica poiché la relativa carica esterna diventa positiva[59].

- VII. **Rugosità superficiale:** Generalmente, più la rugosità superficiale delle nanoparticelle aumenta più il rapporto area superficiale/massa aumenta; ciò induce, da una parte, un maggior rilascio di ioni se in presenza di una soluzione, dall'altra la ritenzione dei microrganismi sulla superficie dei nanomateriali, impedendo la formazione del biofilm[Linlin Wang].
- VIII. **Temperatura:** Quando le NPs di ossido di zinco sono sottoposte ad un aumento di temperatura, tendono a produrre più ROS, determinando una migliore efficacia antimicrobica[59].
- IX. **Irraggiamento con UV:** Le nanoparticelle di ZnO e TiO₂ sono tanto suscettibili ai raggi UV che aumentano la produzione di ROS e di conseguenza si incrementa la relativa antibattericità[59].

2. L'ossido di zinco

Nei recenti anni, materiali ibridi organici-inorganici, composti basati su polimeri e nanoparticelle di ossido di metalli hanno avuto sempre più considerazione tra i ricercatori: uno dei componenti più usati nel settore del *wound healing* è l'ossido di zinco.

La scelta di tale materiale per l'impiego nei tanti campi, compreso il *wound dressing*, deriva dalla sue molteplici proprietà [62]:

- Bassa tossicità
- Attività antimicrobica
- Caratteristiche da semiconduttore
- Fotostabilità
- Ampio range di assorbanza
- Biodegradabilità
- Piezoelettricità

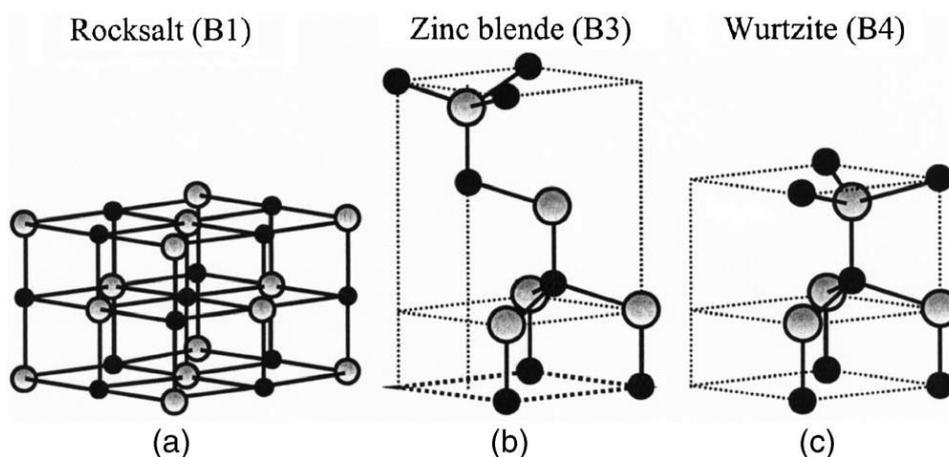


Figura 21. La tre strutture dello ZnO[63]

Lo ZnO può assumere tre tipi di strutture cristalline, come mostrato in figura 22: tipo Wurtzite (B4), tipo Blenda di Zinco (B3) e tipo Sale Roccioso (B1). In condizioni ambientali, la fase termodinamicamente stabile è quella tipo Wurtzite, mentre quella tipo Zinco-Blenda può essere stabilizzata solo mediante crescita su substrati cubici, la struttura Rock-Salt, invece, si ottiene per valori relativamente elevati di pressione[64].

La fase tipo Wurtzite presenta una cella esagonale i cui parametri di cella sono $a=0.325$ nm $c=0.521$ nm e tre direzioni di crescita $\{1010\}, \{1120\}, \{0001\}$. La struttura può essere descritta come un insieme di piani alternati composti da O^{2-} e Zn^{2+} impilati sull'asse, come visibile dalle figure 21 e 22. Ciò produce una disposizione non simmetrica che ne determina le caratteristiche piezoelettriche dell'ossido. Altro aspetto importante è la polarità delle superfici: la superficie polare più comune è il piano basale, infatti gli ioni caricati in modo opposto producono superfici Zn-(0001) caricate positivamente e O-(000-1) caricate negativamente[64].

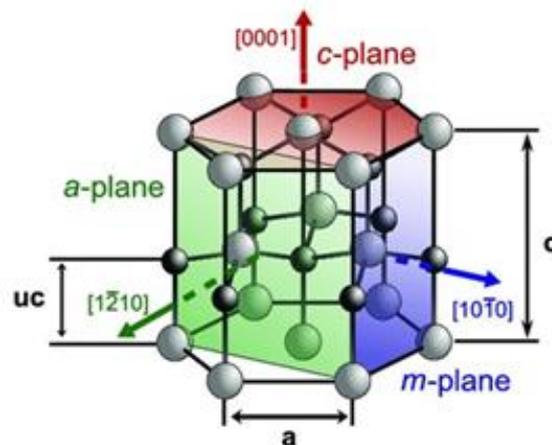


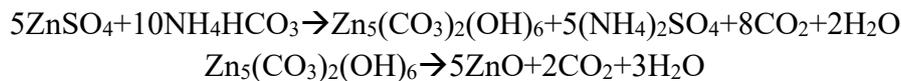
Figura 22. Struttura dello ZnO di tipo wurtzite[65]

2.1 Metodi di sintesi dell'ossido di zinco

Ci sono diverse tecniche di sintesi dell'ossido di zinco classificabili in fisica, chimica e biologica, così come la fase di sintesi può essere solida, liquida o gas/vapore, la scelta si fonda sul tipo di struttura del prodotto che si vuole ottenere.

Riguardo alla sintesi chimica, degno di nota è il metodo per *precipitazione in fase liquida* che consente di avere rilevanti vantaggi come l'essere un processo economico, facile da realizzare, ecologico e facilmente modificabile al fine di ottenere specifici risultati di forma e dimensione del preparato[66]. Esso consiste nell'utilizzare reagenti come i sali di zinco, quali $Zn(NO_3)_2$, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e soluzioni basiche contenenti LiOH, NH_4OH e NaOH[62]. Il metodo consiste in una veloce e spontanea riduzione di una soluzione di sale di zinco utilizzando un agente riducente, per limitare la crescita delle particelle con specifiche dimensioni, segue poi una precipitazione del precursore di ZnO dalla soluzione[62].

Si riporta un esempio dallo studio di *Wang et Al.*[67] nel quale l'ossido di zinco in forma nanometrica è ottenuto tramite precipitazione dalla soluzione acquosa di NH_4HCO_3 e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



Esempio di reazioni di precipitazione[67]

Un metodo alternativo risulta essere il *sol-gel* che prevede la preparazione di una soluzione colloidale o sol che viene convertita a gel e materiali solidi. Il processo comprende reazioni di idrolisi, condensazione e di polimerizzazione. I precursori tipicamente utilizzati sono alcossidi metallici o relativi cloruri in un mezzo acquoso o organico (es. alcool).

La *microemulsione*, invece, consiste nella dispersione di due liquidi immiscibili stabilizzata dalla presenza di molecole di surfattante. Come metodo di sintesi dello ZnO si usa generalmente acqua dispersa in olio (W/O) con diversi tipi di precursori, surfattanti e reagenti (esempi di surfattanti: TritonX-100 $[(\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n)]$ o bis-2-etilesilsulfosuccinato di sodio anionico o AOT)[68]. Oltre a ciò, si aggiungono additivi come Polietilen-glicole (PEG) per controllarne la dimensione, la forma, e le proprietà dei nanomateriali. Si incorpora, quindi, il sale di zinco nel core delle micelle e si fa una precipitazione per ottenere particelle di ossido di zinco[66].

Esiste, poi, la *sintesi fisica* dell'ossido di zinco *per mezzo di ablazione laser del materiale in bulk* in soluzione oppure per evaporazione termale, nella quale il materiale in polvere o condensato viene vaporizzato ad elevate temperature e poi fatto condensare sotto specifiche condizioni (temperatura, pressione, atmosfera)[66].

Infine, si hanno i *metodi biologici* che includono l'uso di piante, lieviti, batteri ed estratti a base di vegetali dipendenti dai meccanismi metabolici del microrganismo utilizzato per la sintesi. Sono le tecniche più ecologiche e consentono ai ricercatori di sintetizzare il materiale senza l'uso di solventi organici tossici o particolarmente costosi[66]. Infatti, l'uso di sostanze chimiche utilizzate durante la sintesi, nocive per la salute umana e per l'ambiente, potrebbero aumentare la reattività delle nanoparticelle e così indurre effetti di citotossicità nell'organismo[69].

2.2 Applicazioni

Grazie alle sue numerose proprietà, l'ossido di zinco è utilizzato in moltissime applicazioni che spaziano dalla cosmetica e settore biomedicale al campo della meccanica e dell'industria tessile. Nel grafico sottostante è possibile osservare le percentuali di consumo mondiale di ZnO per regione: l'estremo oriente o regione Asia-Pacifico (APAC) risulta il consumatore mondiale dominante. Questo è maggiormente dovuto alla presenza della Cina che si attesta come principale paese produttore oltre che consumatore ed esportatore al mondo[70].

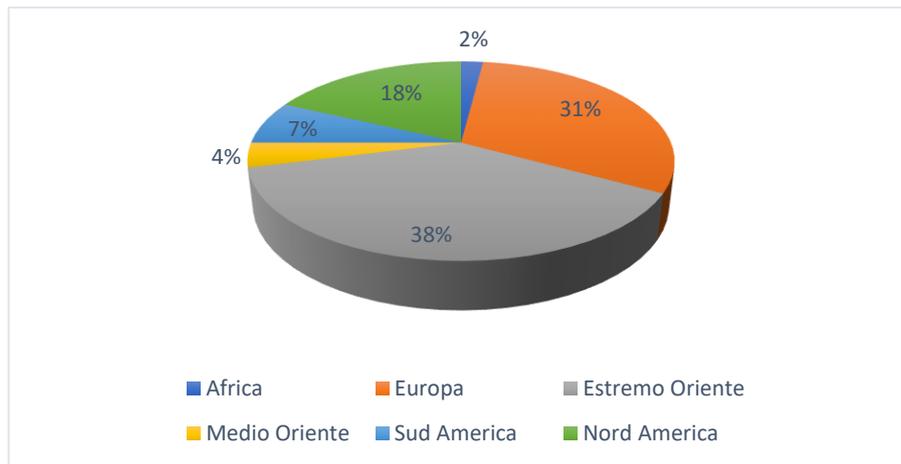


Figura 23. Consumo mondiale di ossido di zinco per aree geografiche[62]

2.2.1 Industria della gomma

Globalmente vengono prodotte circa 105 tonnellate di ZnO all'anno secondo *Das et al.*[71], di cui un'importante parte utilizzata dall'industria della gomma per la fabbricazione dei prodotti reticolati. Questo perché la conducibilità termica della stessa risulta troppo bassa e deve quindi essere aumentata aggiungendo alcuni riempitivi cioè polveri metalliche, ossidi metallici e particelle inorganiche. Tra le polveri di riempimento si colloca lo ZnO che concorre a migliorare le proprietà di conducibilità senza intaccare la resistenza elettrica della gomma siliconica; con un basso contenuto di resina è possibile oltretutto ottenere un'alta resa[62].

L'ossido di zinco, inoltre, viene usato per produrre elastomeri carbossilati ovvero vulcanizzati ad elevata resistenza alla trazione, allo strappo e durezza. Questo lo si deve al fatto che tali composti hanno alte capacità di rilassamento alle sollecitazioni. Nondimeno gli elastomeri ionici, migliorati dallo ZnO, possono essere lavorati allo stato fuso come i polimeri termoplastici[62].

2.2.2 Industria tessile

L'ossido di zinco vede applicazione anche nel settore tessile in quanto componente ideale per i tessuti idrorepellenti e autopulenti, abbigliamento militare e per capi che sono quotidianamente sottoposti a condizioni estreme, quali temperature molto basse o irraggiamento solare. Difatti risulta particolarmente utile a combattere odori, umidità e la formazione di biofilm batterici tra le fibre tessili. Ciò perché lo ZnO gode di un'elevata biocompatibilità a contatto con la cute umana e allo stesso tempo, ridotto in rivestimenti nanostrutturati, è permeabile all'aria e bloccante ai raggi UV a dispetto di altri ossidi o composti[62].

I rivestimenti possono essere incorporati in forma di nanoparticelle, nanorods o nanowires.

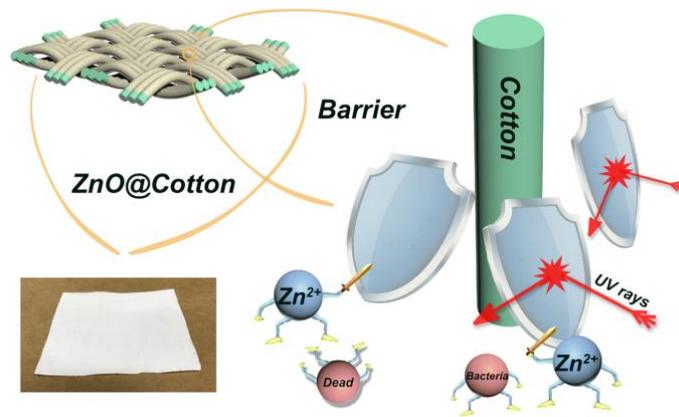


Figura 24. Applicazione di ZnO nel settore tessile [100]

2.2.3 Industria elettronica

L'ossido di zinco è un semiconduttore che viene spesso adoperato come componente dell'industria elettronica grazie alla sua ampia banda di energia di 3.37 eV ed alta energia di legame con 60meV a temperatura ambiente.

Grazie a ciò, è impiegato nella costruzione, in particolare, di apparecchiature fotoelettroniche ed elettroniche, in dispositivi che emettono un'onda acustica superficiale, negli emettitori di campo, nei sensori, nei laser UV e nelle celle solari.

Infine, l'ossido di zinco viene altresì usato nei sensori di gas, più comunemente per rilevare CO e CO₂ o di altri gas più specifici (H₂, SF₆, C₄H₁₀, C₂H₅OH). La sensibilità di tali dispositivi dipende dalla porosità e dalla granulometria del materiale dato che essa aumenta al diminuire delle dimensioni delle particelle di ossido di zinco [62].

2.2.4 Industria farmaceutica, alimentare e biomedicale

L'ossido di zinco è dotato di una notevole proprietà antibatterica che lo rende un materiale privilegiato nei settori farmaceutico, cosmetico, alimentare e soprattutto biomedicale.

Questo materiale è presente in odontoiatria, principalmente come componente di paste dentali e per otturazioni provvisorie; a riguardo, sono state applicate NPs di ZnO come coating per evitare la formazione della placca batterica negli apparecchi ortodontici, inibendo la crescita del batterio *S. Mutans* [72]. Sempre come coating contro la colonizzazione batterica sono utilizzate in dispositivi medici ovvero nelle valvole cardiache e nei dispositivi minori quali cateteri, cateteri intravenosi o chirurgici [44].

Un altro impiego è quello del drug delivery, facilitato dalle dimensioni delle nanoparticelle di ZnO adatte ad accumularsi nelle cellule target e poi per la degradabilità dei materiali con cui esse vengono sintetizzate, lo rende ottimo per il rilascio di farmaco in situ per più giorni o settimane. Un esempio ne è lo studio di *Vaishnav et al.* [73] che utilizza nanoparticelle di ossido di zinco caricate di metronidazolo⁵ benzoato per studiarne il rilascio attraverso la membrana dell'uovo: la presenza di tali nanodispositivi determina un incremento della permeabilità della stessa.

⁵ Antibiotico della famiglia degli nitroimidazoli

L'ossido di zinco risulta utile anche nel campo del bioimaging poiché i nanomateriali possiedono un'emissione vicina agli UV con luminescenza verde associata alle vacanze dell'ossigeno, la quale è stata appunto utilizzata da *Sudhagar et al.*[74] per imaging delle cellule tumorali grazie alla coniugazione con transferrina. Un altro esempio sono i Quantum Dots di ZnO drogati con gadolinio (Gd) che sono risultati ottimali sia per la risonanza magnetica (MRI) che per imaging ottico[75].

Altro settore è quello del Gene Delivery dove, nello studio di *Nie et al.*[76], l'ossido di zinco è stato applicato, sottoforma di strutture tetrapode tridimensionali, come vettore genico per fornire il gene pEGFPN1 (comprendente il gene della proteina verde fluorescente) alle cellule di linea A375 di melanoma umano. Tramite attrazione elettrostatica il pDNA (o DNA plasmidico) è stato attaccato alle nanostrutture di ossido; per la consegna del gene nelle cellule si è notato che i nanodispositivi venivano internalizzati senza riportare alcun effetto nocivo in fatto di citotossicità.

Recentemente, grazie alla sua capacità di assorbire le radiazioni UVA e UVB, lo ZnO ha iniziato ad essere utilizzato anche nelle creme solari poiché in grado di assorbire i raggi UV, senza irritare la pelle ed essendo facilmente assorbibile[62]; inoltre tale materiale si riscontra anche in vari tipi di prodotti nutrizionali e integratori dietetici, dove serve a fornire zinco dietetico essenziale[62].

È, altresì, utilizzato nel food packaging per produrre film adatti a mantenere bassa la carica batterica dei cibi e proteggerli dal deterioramento. L'uso di cibi pronti o ready-to-eat (RTE) è infatti in aumento grazie alla loro convenienza per il consumatore, ma si riscontra una contaminazione frequente da *Salmonella*, *S. aureus* ed *E.coli* soprattutto nei paesi asiatici. Per evitare ciò si incorpora ossido di zinco al fine di aumentare la sicurezza alimentare e l'estensione in durata della conservazione del prodotto[77].

In ultimo, soprattutto per la sua capacità di favorire la guarigione delle ferite, esso rappresenta un importante componente nel settore del *wound dressing* poiché applicato localmente, solitamente sotto forma di unguenti e creme, in numerose medicazioni per ferite acute/croniche e sostanze dermatologiche contro infezioni, infiammazioni e pruriti. Risulta, perciò, rilevante approfondire i suoi meccanismi di antibattericità e il suo uso nel campo del *wound healing*.

2.3 L'ossido di zinco come agente antibatterico e i suoi meccanismi

In merito alla proprietà antibatterica dell'Ossido di Zinco molteplici autori quali *Padmavathy et al.*[45], *Raghupathi et al.*[78], *Brayner et al.*[80] e *Pasquet et al.*[79], hanno individuato che essa è determinata da una combinazione di differenti meccanismi, dimostratisi efficaci sia contro batteri Gram negativi e Positivi, sia contro funghi[59].

Ovviamente l'intensità della suddetta attività dipende da tanti fattori (alcuni già menzionati nella sezione "Nanomateriali") come le caratteristiche morfologiche delle NPs di ZnO, la concentrazione, il medium utilizzato, ma anche la sensibilità all'agente dello specifico microrganismo testato. Di seguito, verranno descritti i meccanismi riconosciuti[83]:

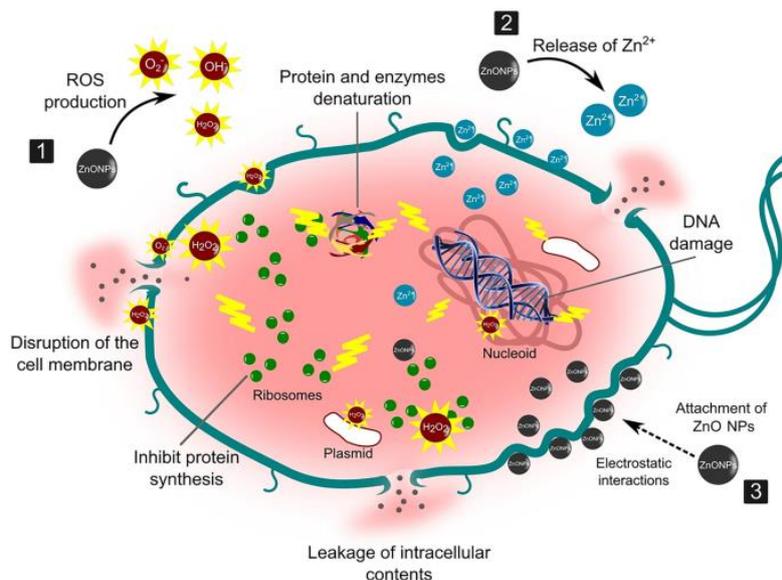


Figura 25. Illustrazione dei meccanismi antibatterici dell'ossido di zinco[81]

- **Generazione di specie reattive dell'ossigeno o ROS**

Questo è il fenomeno più comunemente studiato e ampiamente accettato per l'attività antimicrobica dell'ossido di zinco. I ROS sono specie ioniche altamente reattive come anione superossido O_2^- , idrossido OH^- e perossido di idrogeno H_2O_2 che, nello specifico, danneggiano lipidi, DNA e proteine come risultato della loro penetrazione nella membrana[59]. Nei sistemi biologici, i ROS sono generati attraverso percorsi aerobici nelle catene di trasporto dell'elettrone durante reazioni bio-redox. Parallelamente, esistono dei composti antagonisti a tali elementi, gli antiossidanti, che ne contrastano l'attività deleteria. Lo squilibrio tra le specie ossidative generate e i loro antagonisti (quali, ad esempio, superossido dismutasi o glutatione) viene definito *stress ossidativo*. Questa situazione, derivante dal ROS generato, risulta particolarmente critica poiché responsabile di una varietà di disturbi patogeni quali cancro, infiammazioni, miocardioaterosclerosi, diabete e malattie neurodegenerative[83]. È quindi fondamentale regolare l'equilibrio tra i ROS prodotti e il sistema di eliminazione del relativo eccesso avvalendosi di biomolecole, enzimi e vitamine. In merito al meccanismo antibatterico, la situazione che si crea con l'incontro tra ZnO ed il batterio è la seguente. Essendo l'ossido di zinco un semiconduttore, esso è dotato di una banda di valenza e una di conduzione. Ogni qual volta un elettrone viene promosso alla banda di conduzione per effetto dell'assorbimento di energia, si forma una coppia lacuna-elettrone. Queste coppie elettroniche danno il via a una serie di reazioni. Le lacune, infatti, dissociano le molecole d'acqua in OH^- e H^+ . Le molecole di ossigeno disciolto reagiscono con gli elettroni e si trasformano in anioni radicali superossido O_2^- , questi a loro volta si legano a H^+ generando HO_2 . Tale composto forma, per effetto degli elettroni, la specie HO_2^- , la quale reagisce ulteriormente con ossigeno a formare H_2O_2 . È proprio il perossido di idrogeno che riesce a penetrare nel batterio, uccidendolo. I radicali superossido e idrossido, infatti, non possono entrare nel microrganismo a causa della loro carica negativa, quindi rimangono sulla superficie esterna[57].

È importante menzionare che la concentrazione di questi ROS aumenta con quella relativa di ZnO[Kumar]. Infine, l'esposizione ai raggi UV a tempo limitato sembra aumentare la formazione dei ROS e di conseguenza l'efficacia del meccanismo antibatterico. Ciò perché ZnO è un materiale semiconduttore di tipo *n* e può subire un numero di trasformazioni molecolari fotoindotte in presenza di luce UV visibile. Infatti, quando nanomateriali come

ZnO vengono esposti alla luce visibile avvengono dei processi di eccitazione elettronica che generano coppie elettrone-lacuna con elettroni liberi, nella banda di conduzione, e lacune, nella banda di valenza[83]. Tramite il processo già descritto le lacune nella banda di valenza ionizzano e ossidano l'acqua producendo le specie ossidative responsabili dell'attività antimicrobica[83].

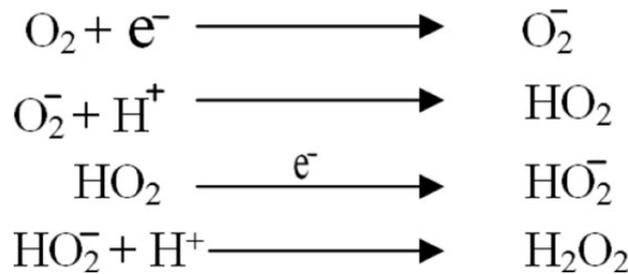


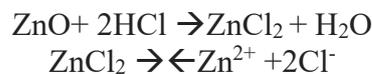
Figura 26. Equazioni della formazione di specie ossidative[84]

- **Rilascio di ioni**

Altra azione responsabile della tossicità dell'ossido di zinco è il suo rilascio di ioni Zn^{2+} . Quando le NPs di ZnO sono in soluzione, una loro parziale dissoluzione nel medium determina un rilascio dei relativi ioni che possiedono attività antimicrobica[57]. Essa agisce attraverso la perturbazione del sistema enzimatico e metabolico all'interno dei batteri, dato che le componenti ioniche si legano a biomolecole come proteine e carboidrati nel batterio, determinando un'azione batteriostatica. Dalla letteratura, si evince che il rilascio è influenzato da tre parametri principali[83][57]:

1. Le proprietà fisico-chimiche delle NPs: porosità, dimensioni e morfologia
2. La chimica del medium: pH,
3. Presenza di illuminazione UV e tempo di esposizione

Per quanto riguarda la concentrazione delle NPs nel medium, una concentrazione molto bassa (intorno a 0.01-1 mM) delle nanoparticelle di ZnO favorisce la crescita batterica, mentre dosi di concentrazione relativamente più elevate (a partire da 3.4 mM e 1 mM per *S.aureus* ed *E.coli* rispettivamente, come studiato in Reddy *et al.*[87]) mostrano effetti di inibizione. Inoltre, la concentrazione di ioni Zn^{2+} nella soluzione può essere aumentata mantenendo un pH inferiore a 6, soluzioni acide infatti promuovono la dissoluzione dell'ossido in ioni[82].



Reazioni di rilascio di ioni zinco in ambiente acido per HCl[84]

- **Distruzione della membrana plasmatica**

La superficie cellulare batterica è caricata negativamente a causa della dissociazione dei gruppi carbossilici e di altri gruppi funzionali, mentre il valore di potenziale zeta riportato sullo ZnO è tipicamente positivo e ammonta indicativamente a +24 mV[83]. Queste cariche opposte tra cellule batteriche e nanoparticelle di ZnO sono responsabili delle forti attrazioni elettrostatiche. Sulla base di questo fenomeno fisico si hanno importanti effetti antibatterici dei nanomateriali di ZnO, in particolar modo contro *E.coli* e *S. aureus*, ceppi batterici per lo più testati nella letteratura d'interesse[85]. Difatti, l'attrazione tra cariche guida le nanoparticelle aventi dimensioni superiori a 10 nm ad accumularsi sulla superficie esterna delle membrane plasmatiche, in seguito esse neutralizzano il potenziale superficiale della membrana batterica con conseguente aumento della tensione superficiale e depolarizzazione della stessa[83].

Si originano, così, diversi cambiamenti irreversibili nelle strutture interne: rottura e deformazione a carico della parete, aumento della permeabilità, generazione di specie ossidative, perdite di fluido e componenti intracellulari; tutti aspetti che conducono alla morte della cellula batterica. Infine, è risultato dagli studi di *Emami-Karvani et al.* e *Reddy et al.* che, per via della conformazione più sottile della membrana, i Gram positivi sono più vulnerabili a questo meccanismo rispetto ai Gram negativi[86][87].

- **Assorbimento di nanoparticelle di ZnO**

Un ulteriore fenomeno proposto è quello che consiste nell'attraversamento della membrana citoplasmatica da parte delle nanoparticelle con dimensioni inferiori ai 10 nm. Infatti, esse sembrano accumularsi all'interno della cellula dove ne danneggiano le componenti vitali, inclusi gli acidi nucleici. Nello specifico, *Brayner et al.* ha osservato che l'interazione tra *E.coli* e le NPs porta ad una disorganizzazione della parete cellulare e conseguente entrata delle nanoparticelle nel batterio (visibile in Figura 27) con cambiamento morfologico e perdita letale del contenuto intracellulare[83][80].

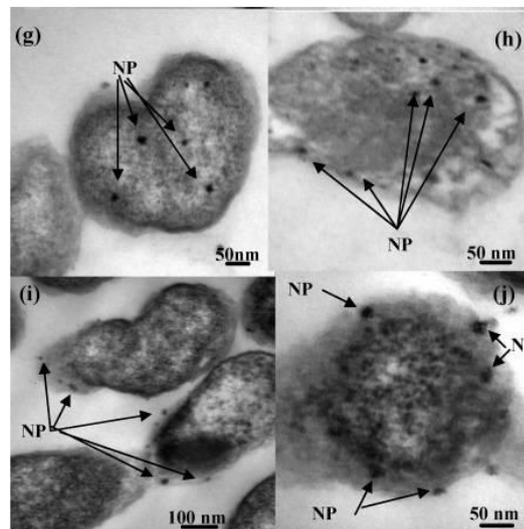


Figura 27. Assorbimento di NPs di ZnO in *E.coli* al TEM[80]

- **Danno alla capsula batterica**

Le nanoparticelle di ZnO con struttura superficiale, bordi ed angoli irregolari possiedono un'efficace abrasività sulla capsula batterica a dispetto di quelle comuni o bulk. Questa caratteristica contribuisce all'attività antimicrobica contro *E.coli*, in particolare *Padmavathy et al.* [45] ha notato un danno meccanico alla morfologia del batterio per un diametro di NPs medio di 12 nm

Stesso risultato è stato dimostrato da *Wang et al.*[88] in relazione all'orientamento di nanofili, infatti un'orientazione casuale degli stessi pare provocare un danno fisico al microrganismo. Tale fenomeno è tanto più spiccato quanto più aumenta il rapporto tra area superficiale e volume della nanoparticella coinvolta[83].

2.4 Tecniche per la valutazione dell'attività antimicrobica

Per misurare l'efficacia antimicrobica dell'ossido di zinco, e di qualsiasi altro agente antibatterico, ci si avvale di tecniche specifiche. Di seguito si illustreranno principalmente i metodi *Gold-standard*. Essi si concentrano sulla determinazione di minima concentrazione inibente MIC o la curva di crescita mediante determinazione spettrofotometrica della densità ottica (DO) a 600 nm. I metodi descritti sono standardizzati da diverse organizzazioni come la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), l'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) e l'AATCC Test method 147-2011 e dal Comitato Europeo in materia di Test di Sensibilità Antimicrobica (EUCAST)[89].

In merito a quest'ultimo, si tratta di un comitato scientifico europeo che guida l'interpretazione dei test antibatterici. Utilizzando dei valori soglia, definiti da EUCAST, vengono descritte tre categorie di suscettibilità ai test antibatterici[Eucast.org]:

S - Suscettibile, dose standard: un microrganismo è classificato come tale quando l'efficacia della terapia è dovuta ad una dose standard di agente antibatterico

I - Suscettibile, esposizione aumentata: un microrganismo è classificato come tale quando l'efficacia della terapia è dovuta ad una aumentata esposizione all'agente antibatterico, aggiustando la dose standard o la sua concentrazione sul sito dell'infezione

R- Resistente: un microrganismo è classificato come tale quando la terapia antibatterica risulta inefficace, perfino con un'aumentata esposizione all'agente

Si sottolinea che l'esposizione è correlata alla dose, al tipo di somministrazione, al tempo di infusione dell'agente antimicrobico utilizzato nel test. I valori *breakpoint* sono aggiornati annualmente in base alle specie microbiche. Oltre a questi, EUCAST mette a disposizione anche dei valori di *cut-off* epidemiologici che suddividono le specie batteriche testate in: a) WT- *wild type* ovvero che non mostrano alcuna resistenza all'agente testato b) NWT- *non-wild type* ovvero che mostrano resistenza all'agente testato[90].

È utile sottolineare che, benché tutti test di suscettibilità siano affidabili, richiedono alcune ore per permettere la crescita microbica e i risultati non sono solitamente ottenuti nello stesso giorno, né forniscono informazioni aggiuntive sui meccanismi di inibizione dell'antibatterico testato[90].

2.4.1 Metodi di diffusione

A. Diffusione in agar

Anche conosciuto come metodo Kirby-Bauer, è ufficialmente utilizzato nei laboratori di microbiologia clinica per i test antimicrobici. In questa procedura, standardizzata dalla metodica EUCAST disk diffusion, la soluzione contenente il batterio viene disseminata sulla superficie delle piastre di agar attraverso inoculazione[92], poi dei dischi di carta da filtro (di circa 6 mm di diametro), che contengono l'agente antibatterico di interesse alla concentrazione desiderata, sono collocati sulla superficie in agar e le piastre quindi incubate a 35° per 16-24 ore. Di norma, l'agente antimicrobico si diffonde nell'agar e inibisce la crescita batterica, quindi viene misurato il diametro della zona corrispondente a quella di inibizione. In ogni caso, con tale metodo non è possibile distinguere l'azione batteriostatica da quella battericida e, in aggiunta, non è si riesce a determinare esattamente la MIC(poiché impossibile da stimare la quantità di agente presente sul dischetto) se non con un

confronto tra la zona interessata e opportuni algoritmi[91]. In compenso, risulta un processo semplice (perché non richiede particolare strumentazione), con risultati facili da interpretare, ed a basso costo, circa 2,50-5\$[91].

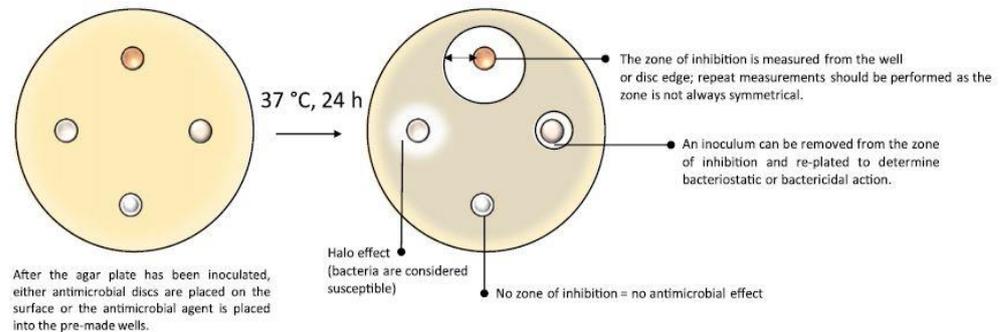


Figura 28. Metodo della diffusione in Agar o Kirby-Bauer[95]

B. Metodo del gradiente antimicrobico

Questo combina i principi dei metodi di diluizione con quelli di diffusione per determinare il valore di MIC. È basato sulla possibilità di creare un gradiente di concentrazione dell'agente testato nel medium agarizzato. In particolare, una striscia impregnata con un gradiente di concentrazione crescente dell'agente antimicrobico è depositata sulla piastra di agar da una estremità all'altra, precedentemente inoculata con il microorganismo testato[91]. Il valore MIC viene individuato grazie all'intersezione della striscia e l'ellisse della zona di inibizione della crescita. Tale tecnica è facile e poco costosa da implementare, si può testare anche l'interazione antibatterica tra due farmaci. Etest è un esempio di test in commercio. Le strisce Etest costano circa 2-3\$ ognuna e possono rappresentare un costo alto se si testano molti farmaci. Infatti, questo metodo è adatto quando si richiede il valore di MIC per uno o due agenti antibatterici[92].



Figura 29. *Staphylococcus aureus* testato tramite metodo del gradiente antimicrobico. La MIC di ogni agente antibatterico è individuata mediante intersezione della zona di crescita del batterio con la striscia su cui è inscritta una scala di misurazione[92]

C. Metodo agar “well diffusion”

Solitamente usato per valutare l'efficacia antimicrobica di piante od estratti. Consiste nell'usare una piastra di agar su cui viene inoculato il volume di batteri testati. Poi, viene effettuato un foro di diametro dai 6 agli 8 mm con un puntale sterile ed una quantità di agente viene messo nei pozzetti già creati. Le piastre di agar sono incubate

in condizioni opportune dipendenti dal tipo di batterio. L'agente interessato diffonde nel medium di agar inibendo la crescita delle cellule antagoniste[91].

D. Metodo agar "plug diffusion"

Prevede la creazione di una coltura in agar del ceppo batterico in interesse e l'inoculazione dell'agente sul terreno di coltura tramite piccole strisce. Durante la crescita batterica le cellule secernono molecole che diffondono nell'agar. Dopo l'incubazione un campione di agar viene prelevato con un aspiratore sterile e depositato sulla superficie di agar di un'altra piastra precedentemente inoculata con il batterio. Le sostanze diffondono dal campione al medium. L'attività antimicrobica è rilevata osservando la zona d'inibizione attorno alla plug di agar[91].

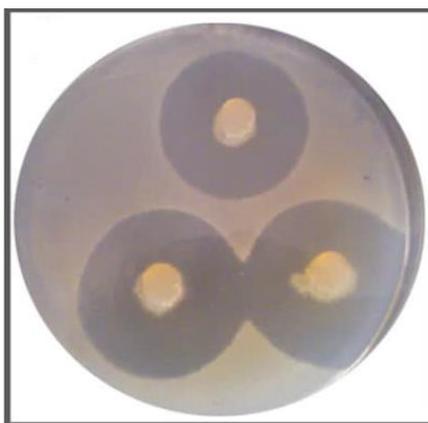


Figura 30. Agar plug-diffusion[91]

E. Metodo cross-streak

Viene usato per testare microrganismi antagonisti. Delle piastre di agar vengono preparate ed inoculate con la prima specie batterica in esame mediante una singola striscia posizionata nel centro del disco. Dopo due giorni di incubazione a 37°C le piastre sono seminate con il secondo batterio da testare tramite un'altra striscia posta perpendicolarmente alla prima, già nel sito[91].

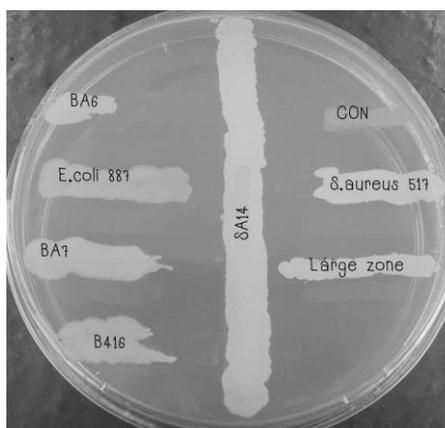


Figura 31. Esempio di applicazione di metodo Cross-Streak con: *Brevibacillus laterosporus* SA14; BA6, *Bacillus megaterium* BA6; BA7, *Brevibacillus* non reattivo; BA16, *Geobacillus thermoglucosidarius*; *S.aureus* 517, *Staphylococcus aureus* TISTR 517; *E.coli* 887, *Escherichia coli* TISTR 887; CON, ceppo sensibile; zona ampia, ceppo resistente[93].

2.4.2 Metodi di diluizione

A. Metodo del brodo di diluizione

È uno dei test microbici più semplice ed è standardizzato dal metodo CLSI M07-A9. Si preparano delle diluizioni seriali dell'agente antibatterico in un brodo di coltura diffuso in pozzetti collocati in una piastra multi-well da 96 pozzetti o in provette con un volume minimo di 2ml. In ogni pozzetto/provetta, contenente una diversa concentrazione di agente antibatterico, è presente il volume di inoculo standardizzato del batterio [91]. I pozzetti sono incubati a 37°C per 24 ore[92]. Viene in ultimo rilevata la concentrazione di antibatterico che ad occhio ha inibito la crescita del ceppo, tale concentrazione risulta come MIC. I principali svantaggi sono la ripetitività del processo, i probabili errori nella preparazione delle soluzioni antibiotiche e l'elevato numero di reagenti e spazio richiesti per l'attuazione del test[92].

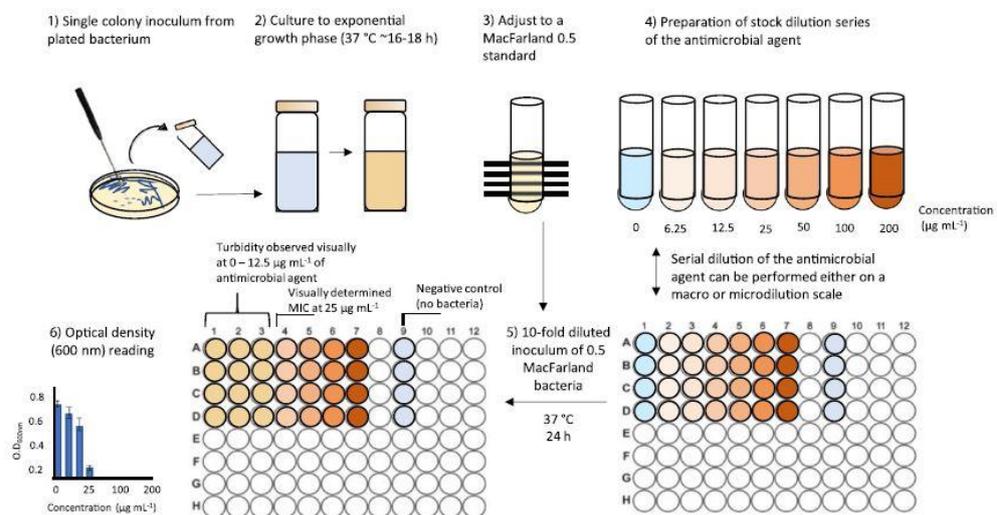


Figura 32. Metodo del brodo di diluizione[95]

B. Metodo di diluizione in Agar

Prevede l'incorporazione di varie concentrazioni dell'agente antimicrobico desiderato in un medium di agar, utilizzando una diluizione seriale 1:2 in acqua. Ciascuna diluizione è effettuata come liquido che, una volta solidificato, produce piastre contenenti differenti concentrazioni dell'agente antibatterico. Su di queste avviene poi l'inoculazione di un volume di 10⁴ CFU/mL del batterio, il tutto è incubato a 35° C per 16-18 ore. Il valore di MIC risultante è registrato alla minima concentrazione che inibisce la crescita del batterio alle condizioni di incubazione. Questo metodo è adatto sia per test antibatterici che antifungini. Ci sono diversi vantaggi del metodo che includono la capacità di testare più ceppi batterici, materiali opachi e la facilità di rilevazione di eventuali contaminazioni[94]. È una tecnica che prevede molto tempo nella preparazione del materiale necessario ma che gode di bassi costi in rapporto al gran numero di ceppi batterica che possono essere testati[95].

2.5 Tossicità per l'organismo umano

Dato il gran numero di applicazioni dell'ossido di zinco, i ricercatori si sono posti il problema della relativa tossicità nei confronti dell'organismo umano. Difatti, è stato riportato da *Iavicoli et al.*[96] che la via principale di esposizione umana a ZnO è l'inalazione, seguita dal contatto cutaneo e dall'ingestione.

L'inalazione risulta essere la via privilegiata di penetrazione delle nanoparticelle poiché, spesso, essa si verifica nell'ambito professionale: si pensi ai lavoratori esposti allo ZnO in industrie di vernici, cosmetici o protesi dentali. La possibilità di ingestione, d'altra parte, è assai poco probabile ma comunque possibile laddove si abbia a che fare con acque e cibo contaminati da NPs disperse nell'ambiente precedentemente[97].

Una volta avvenuta l'esposizione, il materiale entra nel sistema circolatorio dell'organismo spandendosi verso i numerosi distretti; a tal proposito, *Li et al.*[138] ha riscontrato un'elevata concentrazione di ZnO in organi specifici quali fegato, polmoni, reni, ossa, cervello e milza.

Lo ZnO può generare due tipi di assorbimento: (1) Assorbimento di ioni Zn^{2+} (2) Assorbimento di nanoparticelle. La prima via è quella che prevede che gli ioni zinco, rilasciati dalle NPs, penetrino per diffusione passiva nella membrana plasmatica della cellula. Questo fenomeno è influenzato da due parametri: le proprietà intrinseche degli ioni (concentrazione, dimensioni) e la chimica del medium mediante cui diffondono (pH, presenza di UV e specifici composti) [98].

Parallelamente, una via alternativa è quella rappresentata dalla endocitosi. Pertanto, le nanoparticelle sono assorbite grazie al pathway endolisosomiale: è un processo di trasporto dinamico che include vari pathways al suo interno. Talvolta le particelle sono interiorizzate da endocitosi mediata da recettori presenti sulla membrana; a volte invece il fenomeno accade mediante via clatrina⁶-dipendente, caveole-dipendenti o clatrina e caveole-indipendenti; queste ultime vie risultano in una formazione di "sacche" per il trasporto delle nanoparticelle, basato sulle dimensioni del particolato. Nello specifico, il materiale in questione sembra avere effetto sul sistema nervoso focale, molto sensibile ai danni da xenobiotici. A tal proposito, alcune particelle possono penetrare nel cervello attraverso la barriera emato-encefalica (BBB) o giungervi percorrendo la via del nervo olfattivo per poi causare danni da pressione ossidativa, reazioni infiammatorie e citotossicità[99][98].

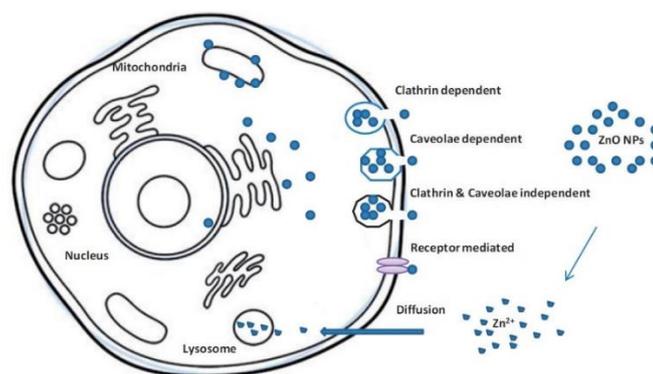


Figura 33. Meccanismi di assorbimento delle NPs di ZnO in seguito ad esposizione[98]

È possibile individuare valori limite di esposizione per non incorrere in disturbi provocati da ZnO. Da un lato si hanno le soglie *Threshold Values Limits* o TLV definibili come "concentrazioni di

⁶ proteina esamerica coinvolta nell'endocitosi

sostanze chimiche al di sotto delle quali la maggior parte dei lavoratori (97,5%) può essere esposta ripetutamente giorno dopo giorno senza alcun effetto negativo per la salute”; dall’altro, ci sono i valori *Derived No Effect Level* o DNEL che intendono il livello di esposizione al di sopra del quale l’uomo non dovrebbe essere esposto[101].

Valori TLV[102]

- Polvere totale inalabile: TLV-TWA 10 mg/m³
- Polvere respirabile: TLV-STEL 2 mg/m³

Valori DNEL[102]

Orale

- Valore DNEL Zn solubile per via orale = 50 mg Zn/giorno (0.83 mg Zn/kg body weight/day)
- Valore DNEL Zn insolubile per via orale = 50 mg Zn/giorno (0.83 mg Zn/kg body weight/day)

Cutanea

- Valore DNEL Zn solubile per via cutanea = 500 mg Zn/giorno (8.3 mg Zn/kg body weight/day)
- Valore DNEL Zn insolubile per via cutanea = 5000 mg Zn/giorno (83 mg Zn/kg body weight/day)

Lavoratore - inalazione

- Valore DNEL Zn inalabile (lavoratore) = 1 mg Zn/m³
- Valore DNEL Zn non inalabile (lavoratore) = 5 mg Zn/m³

Consumatore – inalazione

- Valore DNEL Zn inalabile (consumatore) = 1.3 mg Zn/m³
- Valore DNEL Zn non inalabile (consumatore) = 2.5 mg Zn/m³

Qualora non vengano rispettate le direttive di prevenzione l’individuo, interessato dalla inalazione, contatto cutaneo o ingestione, incorre in una serie di possibili sintomi qui di seguito riportati[103].

Inalazione	Tosse, mal di gola, febbre da fumi metallici, mal di testa, debolezza, dolore Muscolare
Contatto cutaneo	Sintomatologia acuta non riscontrata
Ingestione	Dolori addominali, diarrea, nausea, vomito

3 I bionanocompositi

Un nanocomposito si definisce come un materiale composito (quindi composto da due o più materiali) in cui almeno una fase mostra una dimensione dell’unità del nanometro ed è di norma formato da una matrice e un nanomateriale disperso al suo interno. Le particelle o gli altri “nano-oggetti” dispersi, infatti, conferiscono particolari proprietà quali, ad esempio, un’aumentata resistenza meccanica o processabilità.

I nanocompositi possono essere classificati in tre modi in base al tipo di matrice presente[104]:

- Nanocompositi a matrice polimerica (PMNC)
- Nanocompositi a matrice metallica (MMNC)
- Nanocompositi a matrice ceramica (CMNC)

Grazie alla combinazione di matrice e nanoparticelle, essi mostrano alcune proprietà migliorate se confrontate ai macro o microcompositi, come le proprietà antibatteriche, che sono dovute ad un maggior rapporto area superficiale/volume delle NPs. In alcuni casi, possono risultare più flessibili o economici come la cellulosa.

Nel corso di tale trattazione ci si concentrerà sui bionanocompositi di ossido di zinco a matrice polimerica, descrivendone i materiali che li compongono, proprietà e applicazioni.

3.1 I bionanocompositi a matrice polimerica

Sono una classe di nanocompositi nella quale le matrici sono formate da biopolimeri, si differenziano tra i NC tradizionali per preparazione, proprietà, biocompatibilità, biodegradabilità e applicazioni[104]. I riempitivi nanometrici così come le matrici utilizzati nei bionanocompositi sono molteplici e concorrono ad influenzare le caratteristiche meccaniche, termiche e di barriera ai gas del prodotto desiderato.

Sono suddivisi per tipologia di matrice in base al composto utilizzato, origine, forma e dimensioni dei riempitivi in uso; per quanto riguarda la forma delle particelle rinforzanti si può distinguere tra[104]:

- **Bionanocompositi particulati**
Contengono particelle di dimensioni omogenee principalmente come rinforzo, anche se l'effetto è moderato a causa del basso rapporto superficie/volume. Aumentano la resistenza all'infiammabilità, riducono la permeabilità e i costi[104].
- **Bionanocompositi a particelle allungate**
Contengono particelle di forma allungata (come nanotubi di carbonio e nanofibrille di cellulosa). Hanno un ottimo comportamento meccanico[104].
- **Bionanocompositi rinforzati da particelle lamellari**
Sono detti anche bionanocompositi polimerici stratificati, contengono particelle suddivise in più layers. A loro volta sono classificati in base alla dispersione del materiale interno: (i) Nanocompositi flocculati/ a separazione di fase (microcompositi), quando non vi è separazione tra gli strati delle NP; (ii) Nanocompositi intercalati, quando le catene polimeriche sono inserite tra i layers delle nanoparticelle; (iii) Nanocompositi esfoliati, prodotti in presenza di dispersione degli strati[104].

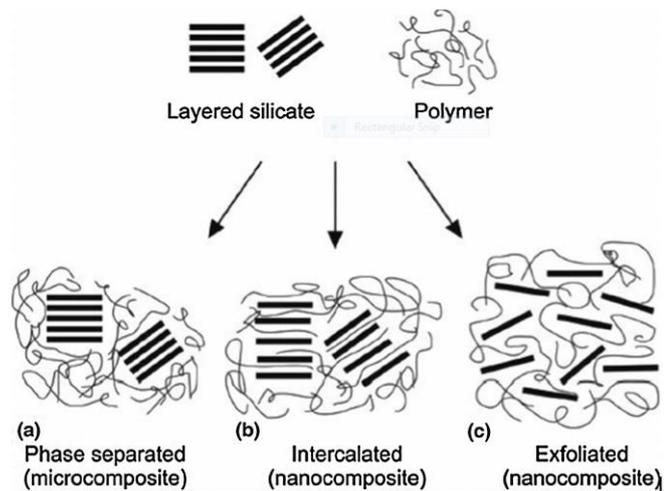


Figura 34. Tipi di strutture contenute nei bionanocompositi rinforzati con NPs lamellari[104]

La caratteristica fondamentale dei biocompositi è l'ottima biocompatibilità, che consente a tali materiali di essere posti senza problemi a contatto con l'organismo e perciò impiegati in applicazioni biomedicali come il drug delivery, il *wound dressing* e l'ingegneria dei tessuti[105].

Nella tabella di seguito vengono riportati alcuni dei vantaggi e svantaggi legati all'uso dei biopolimeri[106].

Vantaggi	Svantaggi
Consumano meno energia durante il ciclo di produzione	Seguono delle rigide disposizioni legali
Non rilasciano prodotti tossici durante la degradazione	Costi più alti rispetto ai polimeri sintetizzati da idrocarburi
Possono essere miscelati con i prodotti tradizionali	Scarsa durabilità in applicazioni a lungo termine
Riducono la quantità di rifiuti emessi	Possono produrre metano nelle discariche
Processi non chimici, sicuri per gli operatori. Costi, attitudini richieste all'operatore e assistenza da basso a moderato	I nanomateriali possono contenere metalli pesanti

3.1.1 Le matrici

I polimeri biodegradabili impiegati per la sintesi delle matrici possono essere *naturali* e *sintetici*. I primi si trovano in natura e da fonti rinnovabili, comprendono cellulosa, chitosano, pullulano, alginato, gelatina, proteine del siero del latte, amido, lignina e poliidrossialcaonoati. Essi presentano notevoli proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità uniti spesso a scarse caratteristiche meccaniche, se paragonate ai prodotti di sintesi. I secondi vengono generati in laboratorio e includono acido poliglicolico, acido polilattico, polibutilene succinato, polivinil-alcool e i poliuretani; questi risultano avere caratteristiche meccaniche elevate e alta riproducibilità pur essendo meno biocompatibili e biodegradabili.

➤ Polimeri Naturali

Chitosano

È il secondo polisaccaride più abbondante in natura dopo la cellulosa. Proviene dalla deacetilazione della chitina, un componente estratto dall'esoscheletro di crostacei, insetti e funghi. È solubile a pH acidi, se trattato in soluzioni acquose pH 7.4 forma un gel. Ha discrete proprietà antibatteriche, è mucoadesivo (utile quindi per il nasal drug delivery) ed è molto utilizzato nel campo della rigenerazione nervosa[106].

Cellulosa

È un componente strutturale del cotone e del legno, formato da unità di glucosio. È un polisaccaride che mostra biodegradabilità, stabilità chimica, alta resistenza meccanica e numerosi derivati chimici[105].

Ad esempio, la carbossimetilcellulosa (CMC), sottoforma di nanocristalli, risulta insolubile nella maggior parte dei solventi, ma solubile in acqua dove da sola forma gel solidi e flessibili[106]. Essa è inoltre trasparente, facile da processare, non allergenica, non tossica ed economica[104].

Gelatina

Proteina derivata dal collagene (generalmente estratto dalla pelle suina o bovina) e denaturata tramite trattamento acido o basico. È non tossica, biodegradabile, non immunogenica e a basso costo, ha buona capacità di formare film[106]. Un esempio di matrice in gelatina si segnala nel lavoro di *Chen et al.* [108], nel quale gli autori indagano le proprietà di wound healing aggiungendo al materiale nanoparticelle di ZnO.

Alginato

È un sale derivato dall'acido alginico, un polisaccaride che viene estratto dalle pareti cellulari delle alghe brune. In presenza di ioni calcio, forma fibre o gel di alginato di calcio e si degrada lentamente[107].

Amido

L'amido è uno dei biopolimeri più usati, data la sua grande disponibilità, il basso costo, la biodegradabilità e la non tossicità. È formato da 20% di amilosio e circa da 80% di amilopectina e presenta una conformazione a doppia elica. I film a base di amido, solitamente, mostrano elevate proprietà di barriera all'ossigeno, che risultano però, basse a contatto con gli essudati[106]. Un esempio di applicazione di tale materiale come matrice per *wound dressing* si può trovare in *Baghaie et al.*, in associazione a chitosano e PVA[110].

Proteine del siero del latte

Le proteine del siero del latte o *Whey Protein (WP)* sono una miscela di proteine derivate dal siero di latte, il quale risulta come sottoprodotto dopo la coagulazione del latte dalla produzione del formaggio. Il siero è composto da acqua per il 93%, mentre il 7% comprende le seguenti componenti ovvero: 5-12% di proteine del siero, 75-80% di lattosio, 8% di sali minerali, 3% di acido lattico e circa lo 0,5% di grasso[111].

Le proteine del siero hanno la seguente composizione[112]:

- **β-lattoglobuline (56-60%)** sono fonte di aminoacidi ramificati e possono legarsi alle vitamine liposolubili A ed E, agli acidi grassi e minerali quali calcio e zinco[111].

- **α -lattoalbumine (18-24%)** sono ricche di triptofano, che contribuisce alla sintesi del lattosio nelle ghiandole mammarie. Le percentuali contenute sono il 6% per il triptofano, il 5% per la cisteina e lo 0.9% per la metionina [113]. Possiedono caratteristiche antitumorali, antibatteriche e sono incluse nelle preparazioni per neonati. Aumentano la secrezione di serotonina nel cervello[111].
- **Siero-albumine (6-12%)** hanno la funzione di inibizione della crescita tumorale, è noto come trasportatore di proteine per gli acidi grassi insolubili nel sistema circolatorio[111]. Possiedono 582 residui aminoacidici con un peso di 69 Kd[112].
- **Immunoglobuline (6-12%)** Si riferisce ad una famiglia eterogenea di glicoproteine con pesi da 15 a 1000 Kd che forniscono l'immunità passiva ai neonati. Sono suddivise in quattro classi IgGj, IgG2,IgA, IgM, and IgE. IgM ha la capacità di legarsi ai batteri[112].
- **Lattoferrina (0,5%) e Lattoperossidasi (0,2%)** sono proteine presenti in concentrazione ridotte nel siero del latte. La lattoferrina è coinvolta nel metabolismo del ferro ed ha un'azione antibatterica e antinfiammatoria. La lattoperossidasi è un enzima che presenta, anch'esso, attività antimicrobica[111].

Le WP, inoltre, possono essere divise in *Proteine del siero concentrate* o WPC e *Proteine del siero isolate* o WPI. Le WPC contengono tra il 30-85% di proteine, hanno un contenuto ridotto di colesterolo e grassi e sono ottenute tramite processo di ultrafiltrazione; le WPI sono composte dal 90-98% di proteine, che si ottengono tramite microfiltrazione a flusso incrociato o lo scambio ionico. Oltre a queste, si trovano poi le *proteine del siero idrolizzate* o WPH che vengono sottoposte ad un trattamento di digestione enzimatica e sono idrolizzate per facilitarne i tempi di assimilazione[111].

Lignina

La lignina è derivata dalle piante, in particolare si trova nei tessuti di sostegno e nei sistemi conduttori di piante cormofite; è una sostanza amorfa che diventa plastica in presenza di acqua. Essa mostra caratteristiche adesive, stabilizzanti, tende a formare sospensioni ed ha una natura altamente reattiva. È quindi un buon additivo per sviluppare materiali compositi biodegradabili o agenti stabilizzanti per ceramici[105].

Pullulano

È un polisaccaride disponibile come polvere bianca, solubile in acqua, inodore, insapore e insolubile nei solventi organici. È prodotto da particolari batteri del fungo polimorfo *Aureobasidium pullulans* e risulta un materiale flessibile, impermeabile all'ossigeno e tendente a formare fibre che assomigliano perfino a quelle dei polimeri sintetici[105].

Poliidrossialcanoato (PHA)

È un biopolimero lineare sintetizzato dai batteri Gram positivi e Gram negativi, in condizioni di crescita sbilanciate. Possiede caratteristiche di biodegradabilità e biocompatibilità. In base agli arrangiamenti molecolari del PHA, viene suddiviso in due classi: a catena corta (SCL-PHA) e a catena media (MCL-PHA). Il loro uso è limitato dall'alto costo di produzione[105].

➤ I Polimeri Sintetici

Acido Poliglicolico (PGA)

L'acido poliglicolico può essere ottenuto da diversi materiali di partenza quali, ad esempio, il lattone e l'acido glicolico. È idrofilico e altamente degradabile ma insolubile nella maggior parte dei solventi organici. Mostra eccellenti proprietà meccaniche con ottima rigidità. Il PGA produce, durante la degradazione, prodotti acidi che possono incrementare le concentrazioni acide locali e particelle, responsabili di infiammazioni locali[114].

Acido Polilattico (PLA)

È un dimero ciclico dell'acido lattico esistente in due stereo-isomeri D e L: l'isomero L è naturale, il D,L è una miscela sintetica. PLA può essere elastico o rigido, è trasparente, con bassa resistenza alla trazione e scarsamente idrofilo[106]. A seconda dell'isomero, il PLA presenta proprietà fisiche diverse: ad esempio L-PLA presenta una natura semicristallina con il 37% di cristallinità, mentre DL-PLA è un polimero amorfo; il tipo di degradazione dipende dalla natura cristallina[105].

Acido Poli(lattide-co-glicolide) (PLGA)

Per la sintesi del copolimero PLGA vengono utilizzati i monomeri di acido glicolico e acido lattico. Tutti i PLGA sono amorfi e solubili in numerosi solventi, possiedono una relazione non lineare tra la composizione e le proprietà meccaniche/cinetiche di degradazione[115]. Nella letteratura è possibile citare *Wu et al.* come esempio di sintesi e caratterizzazione antibatterica del composito PLGA/TiO₂[116].

Polibutilene Succinato (PBS)

È un polimero termoplastico chimicamente sintetizzato attraverso condensazione dell'acido succinico o acido adipico con glicole di etilene o 1,4 butan-diolo. Ha ottime proprietà meccaniche, di contro mostra basse caratteristiche di viscosità e resistenza alla fusione[105].

Alcool Polivinilico (PVA)

È un polimero semi-cristallino, derivato idrolizzato del polivinilacetato.

Offre un'ampia gamma di vantaggi perché possiede la capacità di formare film, di essere completamente solubile in acqua e di resistere alle sostanze chimiche. Possiede, in aggiunta buone proprietà meccaniche[105].

Poliuretani (PUs)

I poliuretani, materiali prodotti dalla reazione di un disocianato e un poliolo, contengono il gruppo uretanico, il quale può appartenere ad una grande varietà di strutture polimeriche e possono perciò mostrare proprietà molto differenti tra loro. In funzione della struttura il prodotto può risultare rigido, elastico, adesivo, schiumoso ecc.

Generalmente costituiti da una fase rigida (detta *hard*) e una meno (detta *soft*), hanno una degradazione lenta che è influenzata dai blocchi che lo compongono. Nelle applicazioni biomediche sono privilegiati i poliuretani con caratteristiche da elastomero[105].

3.2 Bionanocompositi di ossido di zinco

In questa sezione si porrà l'attenzione sui biocompositi che utilizzano, in particolare, ossido di zinco in diverse matrici polimeriche, con lo scopo di individuare delle potenziali soluzioni alle ulcere precedentemente discusse.

I materiali in esame e i risultati vengono analizzati per evidenziarne le proprietà antibatteriche e la guarigione delle ferite attraverso la promozione di angiogenesi e fibrogenesi.

Di seguito, verranno quindi trattati alcuni case studies significativi in merito all'uso di tali nanocompositi per future applicazioni nel campo del wound healing.

3.2.1 Antibattericità

Il primo articolo di interesse è di *Ahmed et al.*[117], che analizza un bionanocomposito costituito da una matrice di Chitosano (CS) e alcool polivinilico (PVA) prodotta per elettrospinning, nella quale sono incorporate nanoparticelle di ossido di zinco. L'applicazione di tale nanocomposito è quella di facilitare la guarigione delle ferite croniche nei pazienti con diabete di tipo 2.

Successivamente alla sintesi della matrice, vengono aggiunte le nanoparticelle di ossido di zinco di diametro di circa 40 nm e poi il nanocomposito viene ottenuto per elettrospinning al fine di realizzare membrane nanofibrose di CS/PVA e CS/PVA/ZnO, che vengono messe a confronto durante i test antibatterici.

Si riporta, tra i risultati dell'attività antimicrobica, che le membrane di CS/PVA con NPs di ZnO mostrano un'aumentata azione tossica contro i batteri rispetto alle sole fibre di CS/PVA (controllo). Gli autori, infatti, evidenziano che la zona di inibizione del nanocomposito di interesse risulta di 20.2 ± 1.0 , 21.8 ± 1.5 , 15.5 ± 0.8 e 21.5 ± 0.5 mm rispettivamente contro i ceppi di *E.coli*, *P.aeruginosa*, *B.subtilis* e *S.aureus* dimostrando che il chitosano/PVA/ZnO possiede un significativo potenziale antibatterico rispetto al controllo, la cui zona di inibizione si attesta a 14.1 ± 0.8 , 15.8 ± 1.0 , 13.0 ± 0.7 e 5.4 ± 0.5 mm. Anche la riduzione percentuale ottenuta dall'analisi colony count method mostra come il tasso di riduzione batterica sia più elevato nelle membrane di interesse: la riduzione della conta è di $99.7 \pm 3.1\%$ e $99.2 \pm 1.9\%$ rispetto al controllo di $83.6 \pm 3.0\%$ e $75.5 \pm 4.1\%$.

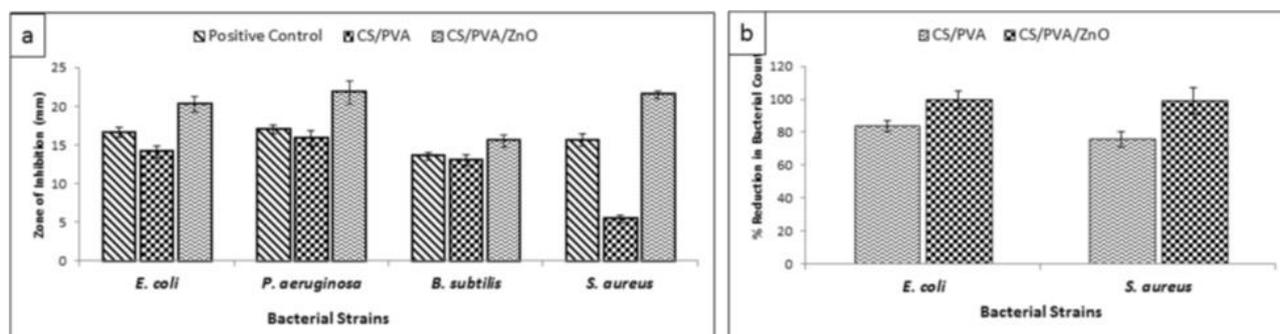


Figura 35. a) Zona di inibizione in mm dimostrata dalle nanofibre di CS/PVA confrontata con la rispettiva delle nanofibre di CS/PVA/ZnO b) Riduzione percentuale nella conta batterica contro i ceppi specificati in Ahmed et al.[117]

Parallelamente, nell'articolo di *Hezma et al.*[118], dopo aver prodotto le NPs di ossido di zinco mediante metodo sol-gel, esse vengono aggiunte ad un composito di chitosano e PVA in

concentrazioni da 5%, 10%, 15% e 20% in peso. Dopodiché si confronta la relativa antibattericità con il controllo della sola membrana di CS/PVA. I risultati dell'attività antimicrobica suggeriscono che la matrice polimerica non risulta efficace contro i ceppi batterici *S.aureus* ed *E.coli*, mentre i nanocompositi prodotti presentano un'ottima azione. In particolare, tra le quattro varianti quella con concentrazione di ZnO al 15% risulta la più antibatterica grazie ad una zona di inibizione di 20 mm e 33 mm, a scendere si trovano quelle di 5%, con 14 e 17 mm, e 10%, con 14 e 18 mm. Un caso a parte è rappresentato dal composito al 20% il quale possiede un'attività battericida minore, pur avendo il massimo valore di ZnO incorporato, con una zona di inibizione di 18 e 32 mm.

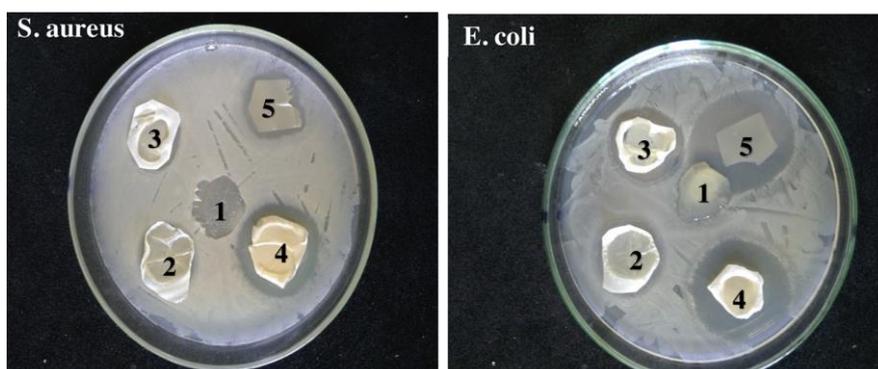


Figura 36. Zone di inibizione di CS/PVA/ZnO a diverse concentrazioni di ZnO: 1)CS/PVA 2)5% ZnO/CS/PVA 3)10% ZnO/CS/PVA 4)15% ZnO/CS/PVA 5)20% ZnO/CS/PVA in Hezma et al.[118]

È inoltre visibile dai valori come l'azione si presenti più rilevante nei confronti del batterio *E.coli* rispetto a *S.aureus*. Una maggiore inibizione di *E.coli* si verifica anche nell'articolo di *Soubhagya et al.*[119], dove al chitosano e allo ZnO viene aggiunta anche la pectina. I risultati, in base ai campioni prodotti, mostrano le seguenti zone di inibizione.

Campione	Contenuto di Zn (wt%)
CS	0
CPZnO-1	9.38
CPZnO-2	16.28
CPZnO-3	24.59

Campione	Dimensioni della zona di inibizione <i>E.coli</i> (mm)	Dimensioni della zona di inibizione di <i>S.aureus</i> (mm)
CP	0	0
CPZnO-2	22±1.9	19±1.4

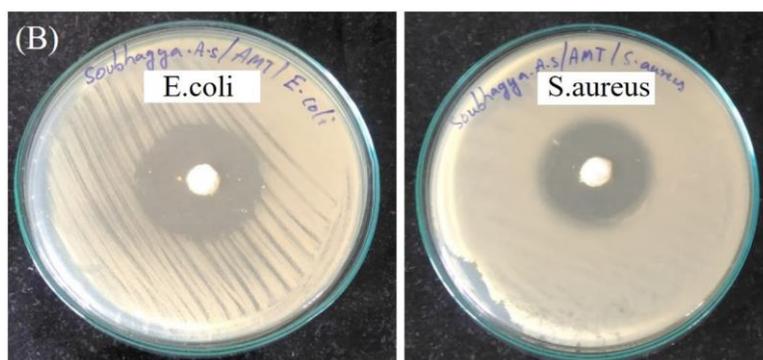


Figura 37. Attività antimicrobica di CPZnO-2 contro *E.coli* (sx) e *S.aureus* (dx) in Soubhagya et al.[119]

Un altro case study dove vengono testati i ceppi *S.aureus* ed *E.coli* è riportato in Wahid et al.[120], nel quale gli autori descrivono la caratterizzazione di un idrogelo di carbossimetil-chitosano (CMCh) e contenente nanorods di ossido di zinco, di dimensioni tra i 190 nm e 600 nm. Riguardo ai risultati antibatterici, vengono confrontati sei biocompositi ottenuti immergendo gli idrogeli in una soluzione con concentrazioni crescenti di nitrato di zinco $Zn(NO_3)_2$:

- Z0 con 0.000 M di $Zn(NO_3)_2$
- Z1 con 0.005 M di $Zn(NO_3)_2$
- Z2 con 0.010 M di $Zn(NO_3)_2$
- Z3 con 0.020 M di $Zn(NO_3)_2$
- Z4 con 0.030 M di $Zn(NO_3)_2$
- Z5 con 0.050 M di $Zn(NO_3)_2$

Si evidenzia che l'idrogelo di solo chitosano (Z0), privo di ossido di zinco, non presenta alcuna attività antimicrobica, mentre i compositi presentano una azione antibatterica che aumenta all'aumentare del contenuto di nanorods incorporati. In particolare, viene riscontrata una notevole efficacia nel materiale Z3, il quale sembra aver ridotto del 99% la popolazione batterica, mentre per il Z4 e Z5 si attesta addirittura intorno al 100%. Inoltre, gli autori specificano come in tal caso sia *S.aureus* ad essere più vulnerabile rispetto ad *E.coli*.

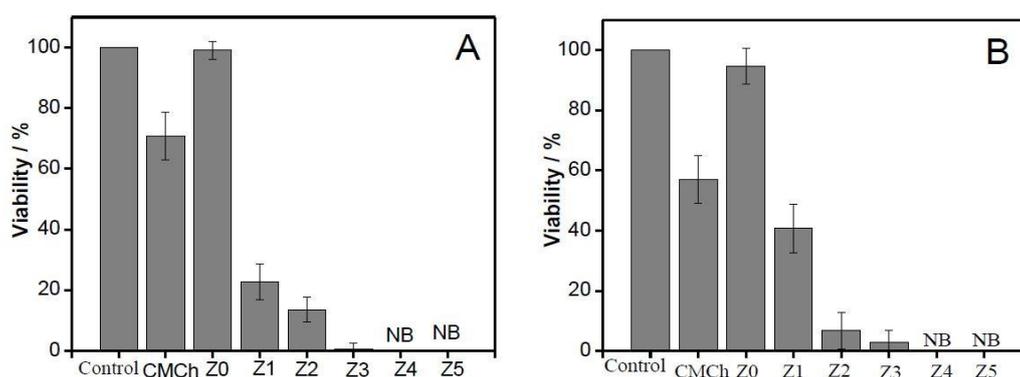


Figura 38. Confronto dell'attività antibatterica tra CMCh e CMCh/ZnO con differenti concentrazioni di ossido di zinco contro A)*S.aureus*. B)*E.coli* in Wahid et al.[120]

Contestualmente si può considerare lo studio di Li et al.[121], che indaga l'azione antibatterica sinergica delle nanoparticelle di ossido di zinco e di argento, in condizioni di irraggiamento UV e non. Tra i numerosi campioni prodotti con percentuali variabili dei due metalli, dalle tabelle di seguito è chiaro come non solo l'attività battericida aumenti all'aumentare del doping della matrice ma sia

massima laddove si hanno concentrazioni rilevanti sia di ZnO che di Ag, rispetto ai singoli compositi CS/ZnO e CS/Ag.

Sample	Added ZnO amount (g)	Added AgNO ₃ amount (mg)	Mass ratio of ZnO to CS (wt.%)	Mass ratio of Ag to CS (wt.%)
CS-1	0.01	1.6	1	0.1
CS-2	0.03	1.6	3	0.1
CS-3	0.05	1.6	5	0.1
CS-4	0.1	1.6	10	0.1
CS-5	0.01	7.9	1	0.5
CS-6	0.03	7.9	3	0.5
CS-7	0.05	7.9	5	0.5
CS-8	0.1	7.9	10	0.5
CS-9	0	1.6	0	0.1
CS-10	0.1	0	10	0

Figura 39. Campioni e relativi contenuti di ZnO e Ag in Li et al.[121]

Sample	D (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Positive control	18.5 ± 0.2	16.8 ± 0.2
CS	3.6 ± 0.1	12.0 ± 0.2
CS-1	2.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1
CS-2	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1
CS-3	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1
CS-4	0	0
CS-5	0	0
CS-6	0	0
CS-7	0	0
CS-8	0	0
CS-9	6.1 ± 0.2	14.0 ± 0.3
CS-10	4.2 ± 0.2	6.3 ± 0.1

Figura 40. Diametri delle colonie batteriche per campione in Li et al. Positive control: Nessun composito applicato[121]

Degni di nota sono anche i risultati dell'esperimento in condizione di buio: l'attività antimicrobica è notevolmente ridotta, questo per le proprietà fotocatalitiche dello ZnO già accennate.

Sample	D (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Positive control	17.8 ± 0.23	16.1 ± 0.2
CS	3.4 ± 0.2	11.7 ± 0.1
CS-4	2.0 ± 0.2	8.5 ± 0.1
CS-9	9.5 ± 0.3	15.8 ± 0.2
CS-10	13.2 ± 0.2	15.0 ± 0.2

Figura 41. Diametri delle colonie batteriche al buio in Li et al.[121]

Similmente, nella letteratura si possono trovare anche indagini su compositi a base di ZnO e cellulosa. A tal proposito, nell'articolo di *Abdalkarim et al.*[122] si realizzano membrane nanofibrose di nanocristalli di cellulosa e ossido di zinco (CNC), rinforzato da 3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato (PHBV), per applicazioni nel *wound dressing*. Vengono infatti prodotti cinque tipi di compositi con quantità variabili di ZnO:

- Solo PHBV (controllo)
- 3% CNC-ZnO
- 5% CNC-ZnO
- 10% CNC-ZnO
- 15% CNC-ZnO.

L'antibattericità viene poi di nuovo testata contro *S.aureus* ed *E.coli*: l'azione del controllo di solo PHBV non mostra alcuna inibizione, tuttavia le nanofibre composite mostrano zone di 2.0, 3.6, 2.6 e 2.5 mm per il primo batterio contro i 2.0, 2.9, 1.9 e 1.8 mm per il secondo in esame. La migliore antimicrobicita si attesta per il composito con il 5% di CNC-ZnO, mentre si verifica una leggera riduzione in quelli con il 10% e 15%.

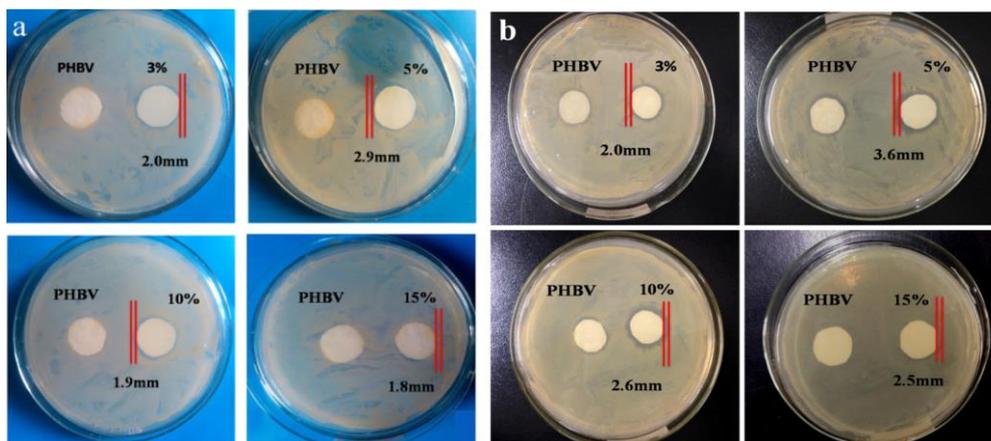


Figura 42. Attività antibatterica del controllo PHBV e dei compositi a varie concentrazioni di CNC-ZnO contro *E.coli*(a) e *S.aureus*(b) in Abdalkarim et al.[122]

La stessa matrice è altrettanto utilizzata nel case study di *Yadollahi et al.*[123], nel cui esperimento viene prodotto un idrogel nanocomposito di soli carbossimetil-cellulosa e nanoparticelle di ZnO con dimensioni di 10-20 nm ciascuna. Difatti, gli idrogeli vengono immersi in soluzioni con quantità crescenti di nitrato di zinco a formare i biocompositi desiderati. In particolare:

Z0 con 0.000 M di $Zn(NO_3)_2$

Z1 con 0.005 M di $Zn(NO_3)_2$

Z2 con 0.010 M di $Zn(NO_3)_2$

Z3 con 0.020 M di $Zn(NO_3)_2$

Z4 con 0.030 M di $Zn(NO_3)_2$

Dai test effettuati si rileva sempre una maggiore attività antimicrobica nei compositi con ZnO disperso rispetto alla sola matrice, con netta rilevanza per *S.aureus*. Le dimensioni delle zone di inibizione dei batteri sono visibili nella tabella sottostante.

Campioni	Diametro della zona di inibizione per <i>E.coli</i> (mm)	Diametro della zona di inibizione per <i>S.aureus</i> (mm)
Z0	0	0
Z1	12±2	15±3
Z2	14±2	18±2
Z3	17±1	22±1
Z4	20±2	28±2

L'alginato e i suoi derivati sono altresì molto utilizzati in studi di tal genere. Nell'articolo di *Shalumon et al.*[124], difatti, si descrive il comportamento antibatterico delle NPs di ossido di zinco disperse in nanofibre di alginato di sodio (SA) e PVA. Infatti, alle fibre preparate mediante elettrospinning vengono addizionate percentuali di ZnO variabili in peso tra 0.5%, 1%, 2% e 5%. Come nei precedenti studi, i relativi risultati mostrano una più elevata antimicrobicità per i compositi SA/PVA/ZnO rispetto al mero controllo di SA/PVA. In particolare, la zona di inibizione si attesta tanto ampia quanto più è la concentrazione di nanoparticelle di ossido presente nel materiale di interesse. Nella tabella sottostante si leggono i valori corrispondenti alle zone di inibizione per *S.aureus* ed *E.coli* rispettivamente.

Campioni	Diametro della zona di inibizione per <i>S.aureus</i> (mm)	Diametro della zona di inibizione per <i>E.coli</i> (mm)
SA/PVA (controllo)	0	0
SA/PVA/ZnO/0.5%	15	14
SA/PVA/ZnO/1%	15.2	14.2
SA/PVA/ZnO/2%	16	15
SA/PVA/ZnO/5%	16	15

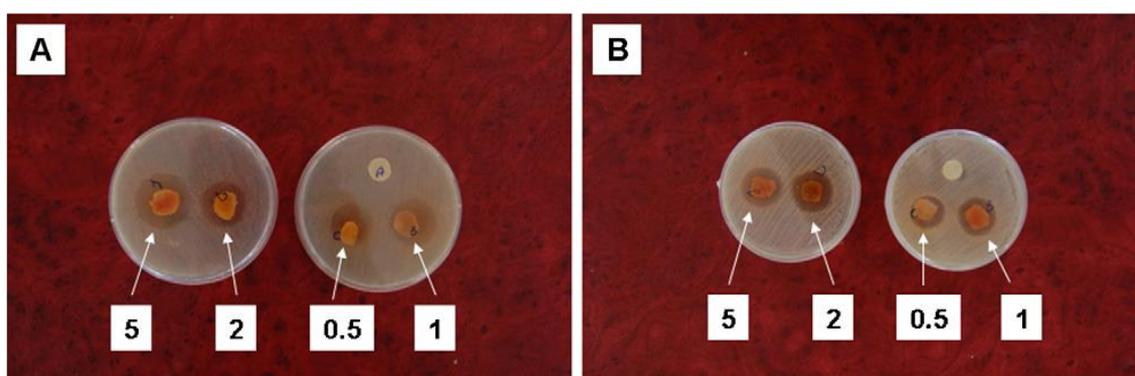


Figura 43. Attività antibatterica delle fibre SA/PVA/ZnO contro A) *S.aureus* B) *E.coli* in Shalumon et al.[124]

Partendo dal medesimo nanocomposito, simili risultati sono raggiunti anche da Paduraru et al.[125], con zone di inibizione che variano come in Figura 44. Tuttavia, gli autori hanno indagato il comportamento antibatterico dello ZnO in base non solo ai ceppi microbici bensì anche al tipo di sintesi operata per produrre le NPs: metodo idrotermale assistito da microonde e metodo dei polioli. Dai grafici è possibile segnalare come la seconda tecnica adottata (P1-P2) produca valori più maggiori della zona di inibizione rispetto alla prima (H1-H3). Il controllo M si mantiene pressoché inferiore o uguale alle dimensioni delle aree dei composti.

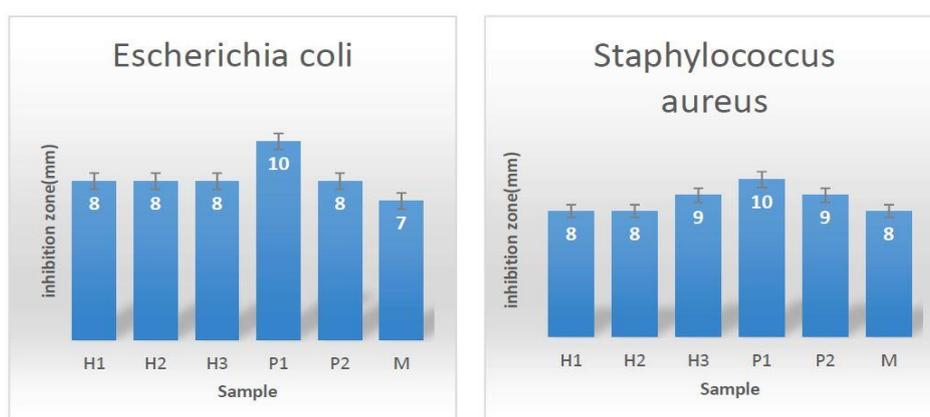


Figura 44. Diametri delle zone di inibizione per *E.coli* e *S.aureus*. H1-H3: composti con metodo idrotermale-microonde assistito; P1-P2: composti con metodo dei polioli; M: fibre in assenza di ZnO in Paduraru et al.[125]

Come si è potuto notare, il PVA è spesso utilizzato nei nanocompositi per wound healing, oltre ai precedenti esempi è interessante descrivere l'articolo di Raafat et al.[126], dove appunto

nanoparticelle di ZnO vengono disperse in una matrice di PVA e Xantano (Xan)⁷. Gli studiosi hanno quindi prodotto diversi idrogeli Xan-PVA con percentuali in peso di 0.5%, 1%, 2% e 5% di ossido di zinco e misurato il potere antimicrobico: contro *S.aureus* esso è più elevato e le zone di inibizione crescono al crescere della concentrazione di ossido.

Contenuto di ZnO (wt%)	Dimensioni della zona di inibizione di <i>S.aureus</i> (mm)	Dimensioni della zona di inibizione di <i>E.coli</i> (mm)
0	0	0
0.5	25	15
1	30	20
2	30	25
5	40	20

Così si verifica anche nello studio *Mohandas et al.*[127] nel quale vi è l'utilizzo di un idrogelo di solo alginato. Dai risultati si può altrettanto concludere come, alle corrispondenti percentuali di ossido di zinco aggiunto, i valori delle zone di inibizione siano coerenti con i precedenti esiti descritti.

Campioni	Dimensioni della zona di inibizione di <i>S.aureus</i> (mm)	Dimensioni di inibizione della zona di inibizione di <i>E.coli</i> (mm)
Solo Alginato (controllo)	0	0
Alginato+5%ZnO (w/w)	15±2	14±1
Alginato+7.5%ZnO (w/w)	16±1	18±2

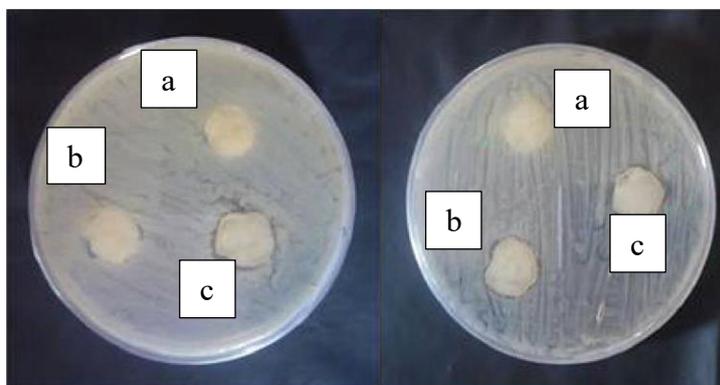


Figura 45. Zone di inibizione contro *S.aureus* (sx) ed *E.coli* (dx). (a) Solo alginato (b) Alginato+5%ZnO (c) Alginato+7.5%ZnO in *Mohandas et al.*[127]

In ultimo, oltre a compositi in film e nanofibre è possibile trovare nella letteratura scientifica articoli come quelli di *Bužarovska et al.*[128], dove si propone l'adozione di una schiuma poliuretana in cui sono immerse le nanoparticelle di ossido, come possibile medicazione per lesioni cutanee. Parimenti ai suddetti studi, gli autori ottengono compositi di poliuretano termoplastico (TPU) /ZnO con diverse percentuali in peso di ossido di zinco(1,2,5 e 10%) e li confrontano con il controllo di solo TPU.

I risultati evidenziano che l'azione antimicrobica dei batteri testati è più rilevante nei confronti di *S.aureus/E.fecalis* a dispetto di *P.aeruginosa/E.coli* e che le schiume composite sono materiali

⁷ Polisaccaride ottenuto per fermentazione dal batterio *Xanthomonas campestris*

altrettanto ideali ad essere impiegati nel campo del wound healing, in virtù della sostanziale riduzione delle colonie batteriche dai medesimi.

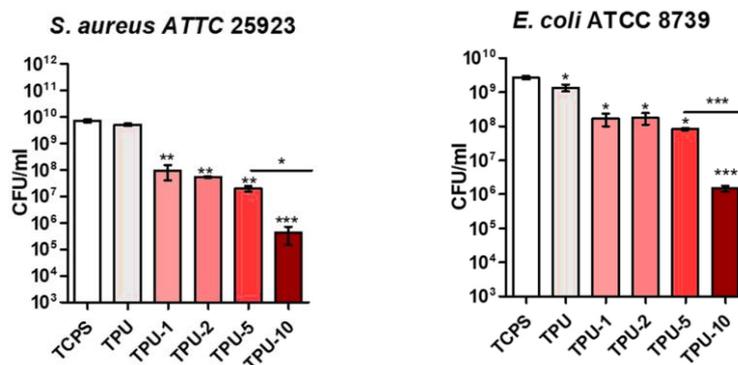


Figura 46. Valutazione dell'attività contro *S.aureus* (sx) e *E.coli* (dx)
TCPS) Controllo cultura tissutale bidimensionale TPU)Controllo solo TPU in Bužarovska et al.[128]

3.2.2 Wound healing

Sempre in *Ahmed et al.*[117] le membrane di chitosano vengono impiegate nell'esperimento ex vivo, al fine di indagare il processo di guarigione in conigli con diabete indotto, si registra al giorno 4 una contrazione della ferita del $44.8 \pm 4.9\%$ nel caso di CS/PVA/ZnO-0.5M rispetto ai $22.5 \pm 3.0\%$ nel composito CS/PVA mentre al giorno 12 il nanocomposito dopato mostra una percentuale del $90.5 \pm 1.7\%$ contro i $52.3 \pm 2.8\%$ del secondo interessato. Ugualmente, le fibre composite con ZnO presentano una maggior stimolazione della produzione di collagene nel tessuto dell'animale rispetto ai controlli.

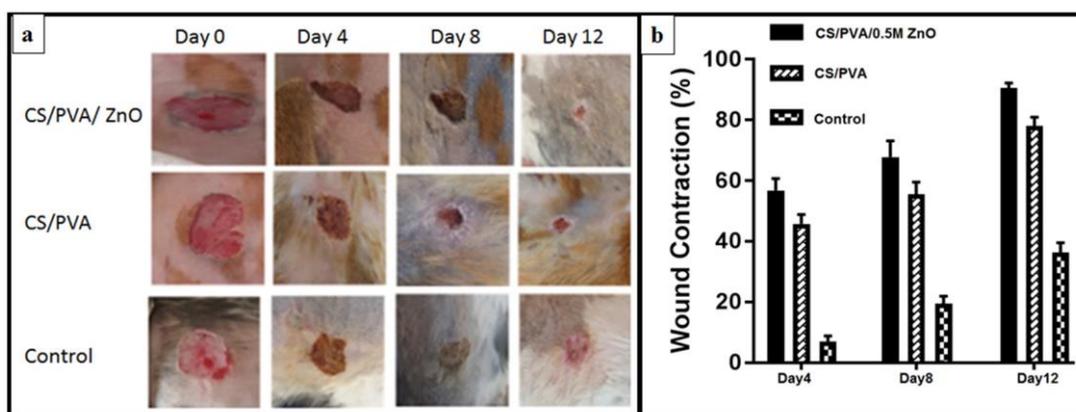


Figura 47. (a) Tempo di chiusura della ferita nel corso di 12 giorni trattati con controllo, membrane in nanofibre CS/PVA e CS/PVA/ZnO (b) Contrazione della ferita% su un periodo di 12 giorni in Ahmed et al. [117]

Nello studio di *Gong et al.*[129] viene descritto, invece, un nanocomposito di Chitosano/Alginato/ZnO in cui la capacità di guarigione viene esaminata per poter trattare la deiscenza di ferite addominali complesse. Si evidenzia che il contatto lesione-nanocomposito determina la formazione di uno stato infiammatorio cronico dal 7° giorno, a partire invece dal 21° giorno viene segnalata la formazione di tessuto adiposo e connettivo sull'impianto. Viene altresì rilevata in situ, come illustrato in Figura 48, la deposizione di collagene di tipo I e II, indicate dal

colore blu. Al giorno 48, la spiccata colorazione blu, tra conferma la formazione di matrice extracellulare sui tessuti neoformati.

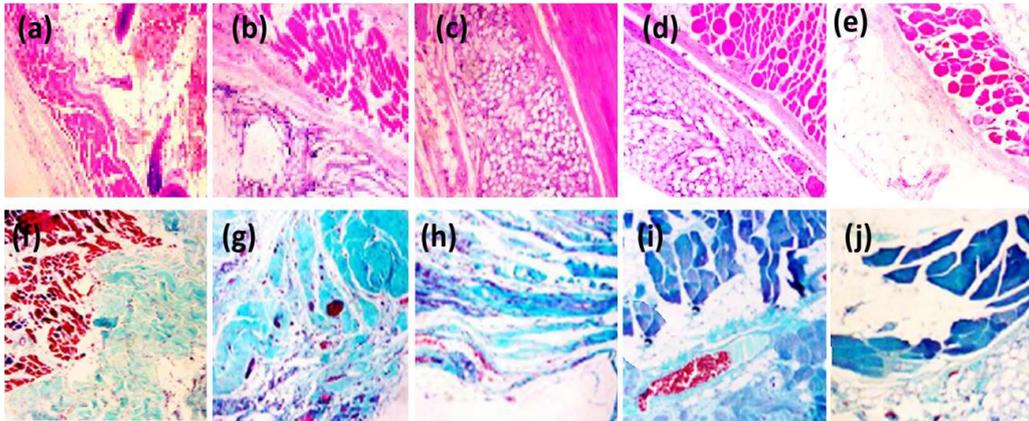


Figura 48. Indagine istologica sui compositi impiegati (a,f) 3 giorni (b,g) 7 giorni (c,h) 14 giorni (d,i) 21 giorni (e,j) 48 giorni in Gong et al.[129]

Un altro caso degno di nota è quello documentato da Wang et al.[130] dove l'analisi in vivo, condotta su ratti di Sprague-Dawley, viene effettuata selezionando quattro differenti campioni: SA, SAZn1, SAZn2 e SAZn3, rispettivamente costituiti da alginato di sodio puro e da alginato di sodio con lo 0.01% (w/v), 0.02% (w/v) e 0.04% (w/v).

In ordine di guarigione i campioni hanno dimostrato la seguente attività: SA < SAZn1 < SAZn2 < SAZn3. Nello specifico, SAZn3 mostra un'azione di rigenerazione pari al 99%, mentre l'alginato di sodio per il 90%. Trascorsi 14 giorni, non risulta più visibile la lesione sull'animale.

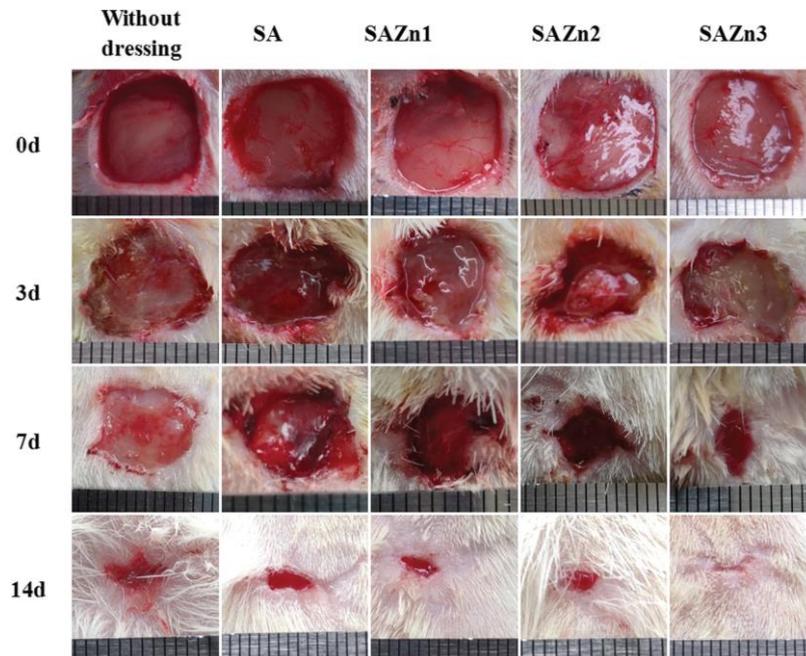


Figura 49. Osservazione visiva del processo di guarigione in Wang et al.[130]

Al quattordicesimo giorno un gran numero di fibroblasti e follicoli piliferi vengono a formarsi in tutte le ferite trattate con i compositi con ZnO, in particolare si evidenzia la presenza di collagene in quello

con più alta concentrazione di ossido, SAZn3, mentre risulta ancora assente in SAZn2 seppur in stato di rigenerazione avanzata.

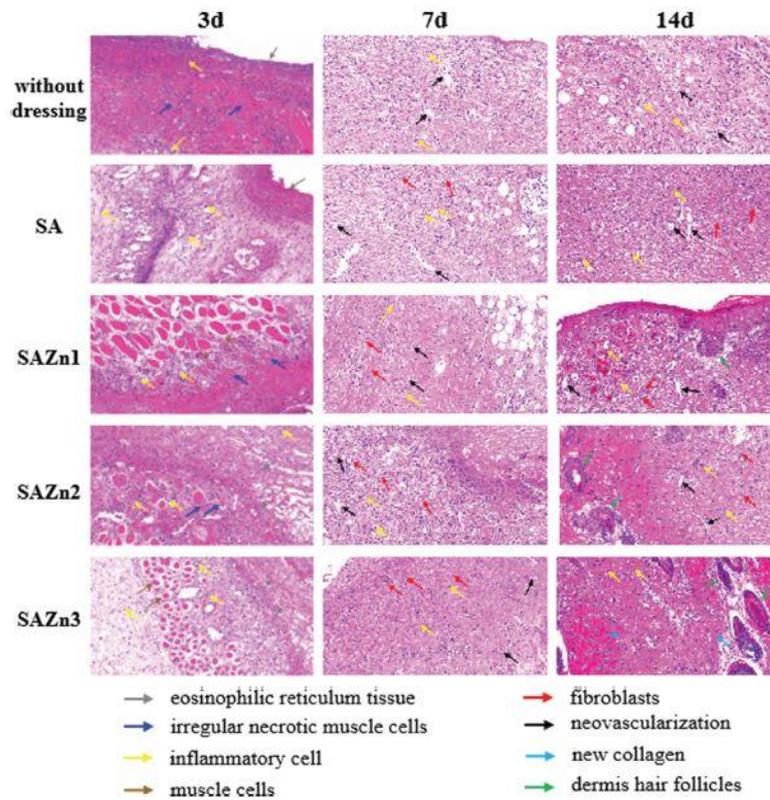


Figura 50. Fasi del processo di wound healing in base al trattamento impiegato in Wang et al.[130]

Anche Mohandas et al.[127] descrive il processo di rigenerazione tissutale del loro composito Alginato/ZnO: l'epitelizzazione è favorita dalla proliferazione e migrazione dei cheratinociti in situ. Dopo 48 ore, i bordi della ferita si mostrano ricoperti da cellule epiteliali sia in corrispondenza del controllo di alginato, sia nei nanocompositi. L'effetto si attesta maggiore nelle membrane alginato/ZnO.

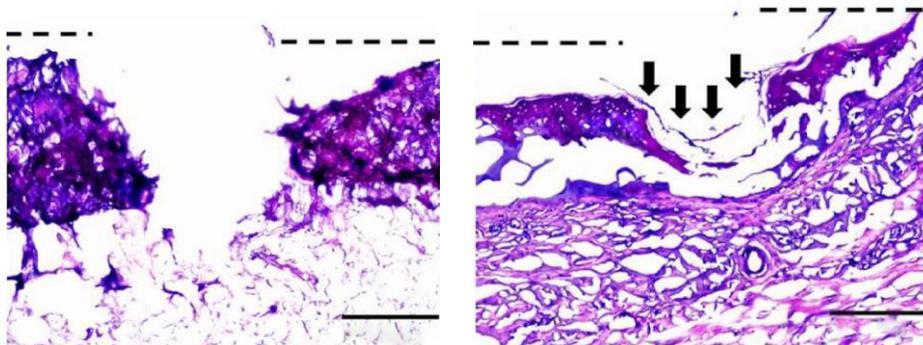


Figura 51. Controllo di alginato (sx) e idrogelo di alginato/ZnO(1%) (dx). Le frecce indicano la riepitelizzazione in Mohandas et al.[127]

Discussione

In questo elaborato sono stati proposti degli esempi di nanocompositi contenenti ossido di zinco per *wound dressing*, in particolare come soluzione per ferite croniche.

Dagli studi descritti si può vedere come essi spazino dai film, agli idrogeli, fino a giungere alle schiume.

In primis, analizzando gli articoli nel loro insieme è possibile notare una correlazione tra l'attività antimicrobica e la presenza di ZnO, in quanto tutti gli autori citati segnalano valori più elevati di zone di inibizione o riduzione della conta batterica allorché si considerano i compositi dopati rispetto alle sole matrici polisaccaridiche, che fungono da controllo.

Tuttavia, tra i vari case studies, si rileva a sua volta una discrepanza che presuppone come alcune matrici prive di ZnO siano di per sé più antibatteriche delle altre, si veda per esempio il caso del chitosano affrontato da *Ahmed et al.*, *Li et al.* ed *Hezma et al.*[117][121][118]. Difatti, in tutti gli altri casi di differenti matrici (come, ad esempio, in *Bužarovska et al.*, *Yadollahi et al.*, *Shalumon et al.*[128][123][124]), il controllo di solo polisaccaride mostra dimensioni della zona di inibizione batterica molto minori o perfino nulle in confronto al chitosano.

La validità di quest'ultimo come materiale antibatterico viene supportata nella letteratura anche da autori come *Mi et al.* che descrivono l'efficacia di una matrice di chitosano asimmetriche, *Campos et al.* e *Chung et al.*[131][132][133].

In secundis, per quanto concerne le concentrazioni di ossido di zinco impiegate negli esperimenti, si può concludere prevalentemente che più è elevato il contenuto di ossido più è rilevante l'efficacia battericida delle nanoparticelle incorporate nel composito considerato (si vedano i case studies di *Yadollahi et al.*[123] e *Shalumon et al.*[124], *Paduraru et al.*[125], *Raafat et al.*[126], *Mohandas et al.*[127], *Bužarovska et al.*[128]), ma la relazione positiva del rapporto ZnO-Antibattericità si inverte negli studi di *Ahmed et al.*[117] e *Abdalkarim et al.*[122]. Ciò accade presumibilmente a causa della cattiva dispersione delle nanoparticelle nelle rispettive matrici, infatti le stesse in virtù dell'alta concentrazione (es. 20% (wt%) in *Hezma et al.*[118]), tendono ad aggregarsi e quindi vi è una dispersione meno uniforme che causa una bassa efficacia antibatterica.

Inoltre, viene più volte comparata l'efficacia tra i batteri più ricorrenti: *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) ed *Escherichia coli* (Gram negativo). Negli articoli di *Ahmed et al.*[117], *Hezma et al.*[118] e *Soubhagya et al.*[119], tutti vertenti su matrici di chitosano, si pone l'attenzione su come *E.coli* appaia più vulnerabile al potere antibatterico del nanocomposito di chitosano.

Generalmente, invece, la maggioranza degli studi sui compositi contenenti ZnO, ivi riportati e non, descrive come sia *S.aureus* il microrganismo tra gli altri più inibito: ciò viene spiegato come conseguenza del suo essere Gram positivo, ovvero avente per conformazione una membrana cellulare più sottile rispetto alle specie Gram negative. Queste, infatti, sono composte da uno strato di peptidoglicani a cui si aggiungono strati di lipopolisaccaridi e proteine, che li renderebbero più difficili alla penetrazione delle nanoparticelle e delle specie ioniche e reattive, secondo la maggioranza dei ricercatori.

Ciononostante, riguardo agli esiti dei test con i compositi di chitosano/ZnO, si ipotizza che la maggior efficacia sui Gram negativi dipenda dall'interazione matrice CS-batterio. Nello specifico, *E.coli* ha una struttura composta da una membrana esterna (OM), una interna e uno spazio citoplasmatico tra le due. L'OM è formata da alcuni tipi di proteine quali lipopolisaccaridi (LPS), fosfolipidi e

lipoproteine che sono mantenuti insieme dalle interazioni elettrostatiche con cationi divalenti necessari per stabilizzare l'OM[134].

Perciò, l'attività inibitoria del chitosano verso i Gram negativi (GN) è esplicata in tal modo: come macromolecola esso non è in grado di passare attraverso la membrana esterna dei GN, poiché questa funziona come una efficiente barriera impermeabile all'esterno, quindi l'accesso nello spazio intracellulare è improbabile da parte delle macromolecole del CS. Tuttavia, una caratteristica fondamentale risiede nella carica positiva che tale materiale possiede grazie al gruppo amminico in condizioni di pH inferiori alla pK_a (a $pH=6.3$), questo crea una struttura policationica tale che la carica interagisce con i componenti dello strato liposaccaridico dei batteri Gram negativi, in questo caso di *E.coli*. Quindi il legame delle molecole policationiche interrompe l'integrità della membrana esterna con conseguente perdita della funzione di barriera, inducendo poi il microrganismo a lisi[135].

La maggior suscettibilità di *E.coli* nei confronti del chitosano è stata verificata anche da *Chen et al.*[139] in cui questa risulta maggiormente inibita rispetto a *S.aureus*, se posta a contatto con il suddetto polisaccaride.

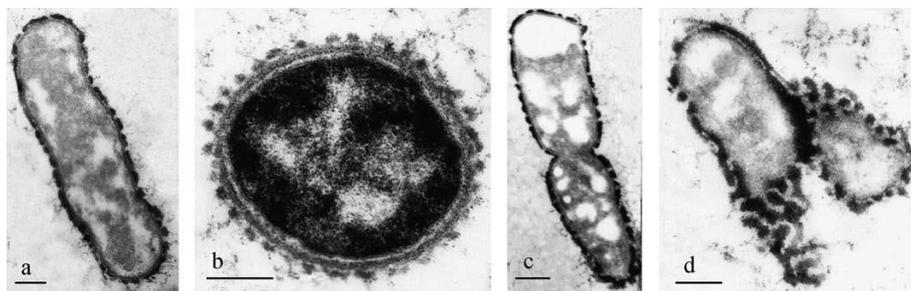


Figura 52. Immagine TEM della morfologia di *E.coli* trattato con Cs[136]

In aggiunta, è bene segnalare che in *Wahid et al.*[120] gli autori si sarebbero aspettati un potere antibatterico rilevante del carbossimetil-chitosano, poiché esso presenta una densità di carica ancor più positiva del materiale tradizionale. Contrariamente i risultati dimostrano una esigua efficacia battericida verosimilmente dovuta alla reticolazione del CMCh provocata dalla reazione del gruppo $-NH_2$ con l'epicloridrina (utilizzata durante la sintesi), causando una diminuzione della carica positiva sull'idrogel, oppure dalla dispersione della matrice nella soluzione PBS (utilizzata sia per la sospensione dei campioni, sia come controllo negativo).

Non meno importante risulta la questione sul tipo di meccanismo antimicrobico che interviene nei nanocompositi presentati: quasi la totalità degli autori fa derivare l'efficacia dalle già menzionate attività di produzione di ROS e rilascio di ioni Zn^{2+} . Tuttavia, in *Abdalkarim et al.*[122], per il nanocomposito CNC/ZnO/PBV si ipotizza che l'azione sia dovuta ad uno stretto contatto tra le nanoparticelle di ossido di zinco nella matrice e la parete cellulare, invece della penetrazione nella cellula. Ciò determina una solubilizzazione dello zinco o delle specie ossidative che danneggiano il batterio. A quanto riportato, la tossicità delle NPs di ZnO non appare direttamente correlata al loro ingresso nella cellula, infatti il loro stretto contatto con questa sembra provocare cambiamenti nel microambiente in prossimità dell'area di contatto batterio-particella, fatto che determina la solubilizzazione dell'ossido o genera ROS[137].

Per ciò che concerne il wound healing, si vede come tutti i nanocompositi contenenti ZnO analizzati, a paragone delle sole matrici, siano maggiormente efficaci nel favorire la contrazione della ferite fino ad una rimarginazione completa, che solitamente si attesta dopo 12/14 giorni nei casi di *Ahmed et al.*[117] e *Wang et al.*[130] Ciò può essere spiegato per la presenza dell'ossido di zinco nella

medicazione applicata, in quanto gli ioni metallici rilasciati aumenterebbero la proliferazione e migrazione delle cellule cheratinocitiche verso l'area interessata. Ci sarebbero infatti due meccanismi coinvolti: da una parte, gli ioni zinco imiterebbero l'azione dei fattori di crescita migliorando le vie di segnalazione mitogeniche intracellulari, essendo in grado di sovra regolare fattori di crescita come l'Insulin-like Growth Factor (IGF), che può aumentare l'epitelizzazione. Dall'altra gli Zn^{2+} sembrerebbero attivare un processo antiapoptosi nell'epitelio, laddove sia presente un danno a carico dei cheratinociti[148]. Questo fenomeno spiegherebbe anche un maggior sviluppo della guarigione del nanocomposito SAZnO₃, rispetto agli altri campioni con ridotto ZnO, in *Wang et al.*[130].

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata effettuata una trattazione di bionanocompositi contenenti ossido di zinco, ed alcuni case studies di particolare rilievo sono stati approfonditi ed analizzati al fine di poter proporre potenziali soluzioni al problema delle ferite croniche. Esse sono infatti complesse in merito alla guarigione e soggette alla formazione del biofilm batterico, che è spesso la causa principale della cronicizzazione. Il problema della resistenza batterica agli antibiotici ha posto infatti la necessità di trovare un metodo alternativo ai trattamenti farmaceutici già esistenti. Il wound care e le infezioni di natura batterica rappresentano un elevato costo per il sistema sanitario che ha richiesto dapprima la ricerca e poi lo sviluppo di una grande varietà di medicazioni. Nel particolare caso delle ferite croniche, a prescindere dalla tipologia, è necessario trattarle primariamente mediante tecnica di *debridement* affinché, con una pulizia profonda del letto della lesione, si riesca ad avere una più probabile guarigione ed evitare le recidive batteriche.

Tuttavia, i semplici *wound dressing* di copertura e/o assorbimento degli essudati, nati nel corso del '900, sembrano risultare poco efficaci se non associati a degli agenti antibatterici. Tra quelli descritti, oltre agli stessi derivabili naturalmente come il miele o gli oli essenziali, i nanomateriali di ossidi metallici rappresentano una scelta preferibile, in quanto non solo riescono ad evitare l'attecchimento del biofilm, ma permettono di essere impiegati variando le modalità di sintesi e applicazione in base alla necessità. Essi hanno poi il pregio di non risultare deperibili o difficilmente recuperabili come le sostanze naturali proposte.

A loro volta, fra i suddetti spiccano le nanoparticelle costituite da ossido di zinco, le quali possono vantare un'azione antimicrobica composta da una svariata gamma di meccanismi propri dell'ossido, che sono stati oggetto di indagini in numerosi studi della letteratura scientifica. In questo lavoro di analisi concentrato sul *wound dressing*, si è notato come i processi antimicrobici e anti-biofilm dell'ossido di zinco più frequenti siano quelli indotti da ROS e dal rilascio di ioni. In aggiunta, si può osservare che semplicemente aumentando particolari parametri (es. temperatura o irraggiamento) le NPs subiscono un ulteriore aumento dell'attività desiderata.

Malgrado i tanti vantaggi delle NPs, si è anche visto che ZnO può rappresentare un pericolo per la salute umana, se utilizzato in concentrazioni sopra quelle ammesse dai limiti DNEL o TLV, ed è perciò doveroso verificarne la citotossicità caso per caso.

Relativamente alle matrici per *wound dressing* viste, si è trovato che le più utilizzate sono quelle di cellulosa, chitosano e alginato in virtù della loro non citotossicità ma anche il poliuretano sembra essere altrettanto preposto a tale campo, soprattutto le schiume, grazie alla sua grande versatilità. Oltre a queste, appaiono degne di note anche particolari matrici costituite da fibre di albumina del siero bovina (BSA) o derivanti del guscio d'uovo (ESM) che risultano molto biocompatibili e contribuiscono allo sviluppo della matrice extra-cellulare.

Interessante è il ruolo che assume l'ossido di zinco se combinato con matrici polisaccaridiche o polimeriche. L'importanza dello studio dei bionanocompositi risiede nel fatto che l'associazione delle NPs alle matrici derivanti da fonti biologiche permette di realizzare delle medicazioni efficaci ma altrettanto biocompatibili e biodegradabili, mentre l'accoppiamento alle matrici di polimeri, opportunamente selezionati, di migliorarne le proprietà meccaniche, con lo scopo di mantenere quanto più possibile la medicazione in situ ed evitare ricambi troppo soventi.

Dagli articoli riportanti i comportamenti antibatterici e di wound healing dei nanocompositi di ossido di zinco è possibile concludere che tutti questi sono preferibili rispetto alle sole matrici come *wound dressing* per ferite croniche, in quanto presentano allo stesso modo risultati positivi per quanto riguarda l'antibattericità e il tasso di guarigione.

In merito, risulta chiaro come la concentrazione di ZnO sia la chiave per una efficiente inibizione batterica, infatti più contenuto è disperso nelle matrici più essa è accentuata. Tra i materiali, particolarmente convenienti si attestano i nanocompositi a base di chitosano per il loro verosimile doppio meccanismo perpetrato sia dalle nanoparticelle di ossido di zinco, con la loro ambivalente produzione di ROS e ioni Zn^{2+} , sia dalla matrice stessa grazie alla sua densità di carica superficiale che attrae in particolar modo i batteri Gram negativi. Difatti, si può concludere che se da un lato le specie come *S.aureus* si evidenziano più suscettibili alla penetrazione delle specie ossidative (dato il sottile spessore), dall'altro si ha una maggior probabilità che anche batteri come *E.coli* vengano contrastati in modo rilevante, in virtù dell'azione caratteristica del polisaccaride.

Nello specifico, è auspicabile altresì l'uso del polivinil-alcool nella stessa matrice, giacché utilizzabile con funzione di rinforzo.

Inoltre, dagli esiti della sezione 3.2.2 si può affermare che tali materiali compositi sono allo stesso tempo in grado di contribuire in maniera importante alla chiusura della lesione e alla rigenerazione tissutale completa, presentando almeno il 90% della capacità di guarigione entro le due settimane dalla lesione.

Nondimeno, la varietà di forme dei *wound dressing* affrontati si dimostra un'arma positiva per contrastare l'insorgenza delle infezioni nelle ferite cutanee giacché ognuno si adatta meglio ad uno specifico tipo di lesione: si pensi agli idrogeli utilizzati in ferite pressoché asciutte come le piaghe da decubito o le schiume, adoperate per le lesioni con molto essudato e le ulcere degli arti.

Per quanto riguarda la quantità di contenuto dell'ossido di zinco, negli approfondimenti futuri sarà quindi necessario rilevare la concentrazione MIC per ogni tipo di matrice affrontata e altrettanto opportuno diverrà capire quali siano i rapporti tra la dispersione delle NPs nei campioni e i parametri in fase di sintesi. La soluzione all'aggregazione delle nanoparticelle potrebbe essere guidata sulla ricerca di valori di concentrazione dell'ossido che siano meno soggette alla suddetta condizione e/o l'uso di tecniche che migliorino la dispersione quale il trattamento con ultrasuoni che disgrega gli eventuali agglomerati di nanomateriali.

Per aumentare l'attività antimicrobica delle nanoparticelle di ossido di zinco si potrebbe pensare di rivestirle con un coating di antibiotico, in modo che non solo vi sia l'azione dei ROS o ioni ma che essa sia coadiuvata anche dal potere del farmaco, applicandole specialmente alla matrice di chitosano e ponendo a confronto l'inibizione della specie *E.coli* contro *S.aureus*.

Inoltre, sarebbe interessante indagare quale sia il comportamento dei nanocompositi qualora, oltre alle NPs, vi sia inserito un estratto naturale, si pensi all'estratto di pompelmo (naturale antiossidante), in modo tale da osservare in che modo cambi il potere battericida in base al contenuto dell'agente naturale. Non meno importante sarebbe indagarne anche la biocompatibilità.

Infine, particolarmente utile sarebbe impiegare, per la produzione di nanocompositi, tecniche di sintesi *green* delle NPs, come ad esempio la sintesi via *solution plasma process (SPP)*.

Bibliografia

- [1] Meazzini C., “*Principi di Dermatologia*”, Editore Claudia Meazzini, 2020
- [2] Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. “*The dynamic anatomy and patterning of skin*”. *Exp Dermatol*. 2016;25(2):92-98. doi:10.1111/exd.12832
- [3] Dhivya S, Padma VV, Santhini E. “*Wound dressings - a review*”. *Biomedicine (Taipei)*. 2015;5(4):22. doi:10.7603/s40681-015-0022-9
- [4] Zarrintaj P, Moghaddam AS, Manouchehri S, et al. “*Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing*”. *Nanomedicine (Lond)*. 2017;12(19):2403-2422. doi:10.2217/nmm-2017-0173
- [5] Qin Y. “*Advanced Wound Dressings*” *The Journal of The Textile Institute*, 2001, 92:2, 127-138, DOI: 10.1080/00405000108659563
- [6] Peghetti A., Mantovani M., Canova G., Ferri L., “*Le medicazioni avanzate per il trattamento delle ferite acute e croniche, dalle evidenze della letteratura alla pratica quotidiana*”, Servizio Sanitario Regionale Emilia-Romagna, Commissione Regionale Dispositivi Medici (Delibera Giunta Regionale n.1523/2008), 2012
- [7] Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, et al. “*Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review*”. *Syst Rev*. 2016;5(1):152. doi:10.1186/s13643-016-0329-y
- [8] Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. “*Inflammation in Chronic Wounds*”. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2085. doi:10.3390/ijms17122085
- [9] Di Giulio P., “*Le ulcere cutanee croniche*”, Università degli studi di Torino per il gruppo PARI (Percorsi Assistenziali e Ricerca Infermieristica), Istituto Mario Negri di Milano, 2001, BIF- N. 6, 227-231
- [10] Kloth L. “*The Roles of Physical Therapists in Wound Management, Part II: Patient and Wound Evaluation*”. *J Am Col Certif Wound Spec*. 2009;1(2):49-50. doi:10.1016/j.jcws.2009.03.003
- [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] Grey JE, Harding KG, Enoch S. “*Venous and arterial leg ulcers*”. *BMJ*. 2006;332(7537):347-350. doi:10.1136/bmj.332.7537.347
- [13] <https://www.bbraun.it/it/Prodotti-e-terapie/gestione-lesioni/ulcere-pressione.html>, “*Le ulcere da pressione o piaghe da decubito*”, ultima visita 14/03/2021

- [14] Bonadeo P., Marazzi M., Masina M., Ricci E., Romanelli M., “*Wound Bed Preparation: evoluzione della pratica clinica secondo i principi del TIME*”, Aretré, 2004
- [15] <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/malattie-infettive/batteri-e-farmaci-antibatterici/panoramica-sui-batteri?query=batteri>, “panoramica sui batteri”, ultima visita 15/03/2021, Werth B.J.
- [16] Benamara H, Rihouey C, Abbas I, et al. “*Characterization of membrane lipidome changes in Pseudomonas aeruginosa during biofilm growth on glass wool*”. PLoS One. 2014;9(9):e108478. doi:10.1371/journal.pone.0108478
- [17] Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. “*Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents*” [published correction appears in Future Med Chem. 2015;7(10):1362]. Future Med Chem. 2015;7(4):493-512. doi:10.4155/fmc.15.6
- [18] Rutherford ST, Bassler BL. “*Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control*”. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(11):a012427. doi:10.1101/cshperspect.a012427
- [19] Yin W, Wang Y, Liu L, He J. “*Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments*”. Int J Mol Sci. 2019;20(14):3423. doi:10.3390/ijms20143423
- [20] Gardner SE, Frantz RA, Doebbeling BN. “*The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection*”. Wound Repair Regen. 2001;9(3):178-186. doi:10.1046/j.1524-475x.2001.00178.x
- [21] Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd SE. “*Biofilms and chronic wound inflammation*”. J Wound Care. 2008;17(8):333-341. doi:10.12968/jowc.2008.17.8.30796
- [22] Izadi K, Ganchi P. “*Chronic wounds*”. Clin Plast Surg. 2005;32(2):209-222. doi:10.1016/j.cps.2004.11.011
- [23] Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, et al. “*Wound bed preparation: a systematic approach to wound management*”. Wound Repair Regen. 2003;11 Suppl 1:S1-S28. doi:10.1046/j.1524-475x.11.s2.1.x
- [24] Strohal, R., Apelqvist, J., Dissemond, J. et al. “*EWMA Document: Debridement. An updated overview and clarification of the principle role of debridement*”. J Wound Care. 2013; 22 (Suppl. 1): S1–S52
- [25] Furlini S., Somà K., “*Detersione e Disinfezione*”, www.lesionicutaneecroniche.it
- [26] Pickles SF, Pritchard DI. “*Quality control of a medicinal larval (Lucilia sericata) debridement device based on released gelatinase activity*”. Med Vet Entomol. 2017;31(2):200-206. doi:10.1111/mve.12220

- [27] <https://www.msdmanuals.com/it-it/casa/la-salute-degli-anziani/copertura-del-sistema-sanitario-per-gli-anziani/medicare>, “Medicare”, Roger I. Schreck , ultima visita 15/03/2021
- [28] Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, et al. “*An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds*”. *Value Health*. 2018;21(1):27-32. doi:10.1016/j.jval.2017.07.007
- [29] Drew P, Posnett J, Rusling L; Wound Care Audit Team. “*The cost of wound care for a local population in England*”. *Int Wound J*. 2007;4(2):149-155. doi:10.1111/j.1742-481X.2007.00337.x
- [30] Pankey GA, Sabath LD. “*Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections*”. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):864-870. doi:10.1086/381972
- [31] Mondello F., Marella A.M., Bellardi M.G., Di Vito M., “*Oli essenziali per la salute dell’uomo e la salvaguardia dell’ambiente*”, Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2015 (Rapporti ISTISAN 15/6)
- [32] Mandal MD, Mandal S. “*Honey: its medicinal property and antibacterial activity*”. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(2):154-160. doi:10.1016/S2221-1691(11)60016-6
- [33] Arul V, Masilamoni JG, Jesudason EP, et al. “*Glucose oxidase incorporated collagen matrices for dermal wound repair in diabetic rat models: a biochemical study*”. *J Biomater Appl*. 2012;26(8):917-938. doi:10.1177/0885328210390402
- [34] Minden-Birkenmaier BA, Neuhalfen RM, Janowiak BE, Sell SA. “*Preliminary Investigation and Characterization of Electrospun Polycaprolactone and Manuka Honey Scaffolds for Dermal Repair*”. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 2015. doi:10.1177/155892501501000406
- [35] <https://www.nurse24.it/infermiere/farmaci/antibiotici-cosa-sono-e-come-si-usano.html>, “Antibiotici cosa sono e come si usano”, Chiara Vannini, ultima visita 15/03/2021
- [36] Simões D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonça AG, Correia IJ. “*Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review*”. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;127:130-141. doi:10.1016/j.ejpb.2018.02.022
- [37] <https://www.medicinainternaonline.com/2007/12/antibiotici-piu-comuni.html>, “Antibiotici più comuni”, ultima visita 13/03/2021
- [38] Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. “*Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity*”. *Nanomedicine*. 2016;12(3):789-799. doi:10.1016/j.nano.2015.11.016
- [39] Ivask A, Elbadawy A, Kaweeteerawat C, et al. “*Toxicity mechanisms in Escherichia coli vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver*”. *ACS Nano*. 2014;8(1):374-386. doi:10.1021/nm4044047

- [40] Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, et al. “*Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro*”. PLoS One. 2014;9(7):e102108. Published 2014 Jul 21. doi:10.1371/journal.pone.0102108
- [41] Mohammad EJ, Majeed AMA, Mater FS, Hassan SG, Shakir IA, Shaker FK “*Image Processing of SEM Image Nano Silver Using K-means MATLAB Technique*”. Al-Mustansiriyah Journal of Science. 2019, 29. 150. 10.23851/mjs.v29i3.635.
- [42]<http://progettomicrobiomaitaliano.org/2018/07/cosa-sono-le-batteriocine>, “Cosa sono le batteriocine”, ultima visita 13/03/2021
- [43] Schirru S, “*Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra*”, Tesi di Dottorato in Scienze dei sistemi agrari e forestali e delle produzioni alimentari, Indirizzo: Biotecnologie microbiche agroalimentari, Università degli studi di Sassari, aa.2008/2009, Tutor: Prof. Deiana Pietrino
- [44] 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
- [45] Padmavathy N, Vijayaraghavan R. “*Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study*”. Sci Technol Adv Mater. 2008;9(3):035004. doi:10.1088/1468-6996/9/3/035004
- [46] Pal S.L, Jana U., Manna PK, Mohanta GP, Manavalan R, “*Nanoparticle: An overview of preparation and Characterization*”. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2011; 01(06): 228-234
- [47] Hett A., “*Nanotechnology: small matters, many unknown*”, Swiss Reinsurance Company, 2004
- [48] Park KH, Han GD, Neoh KC, Kim TS, Shim JH, Park HD, “*Antibacterial activity of the thin ZnO film formed by atomic layer deposition under UV-A light*”, Chemical Engineering Journal 2017; 328: 988–996
- [49] Akhavan O., Azimirad R., Safa S., “*Functionalized carbon nanotubes in ZnO thin films for photoinactivation of bacteria*”, Mater Chem Phys 2011;130:598–602
- [50] Arias LR, Yang L. “*Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions*”. Langmuir. 2009;25(5):3003-3012. doi:10.1021/la802769m
- [51] Bai YPI, Lee SJ, Bae TS, Watari F, Uo M., Lee MH. “*Aqueous dispersion of surfactant-modified multiwalled carbon nanotubes and their application as an antibacterial agent*”. Carbon. 2011 ;49:3663-3671. 10.1016/j.carbon.2011.05.002.
- [52] Rodrigues DF, Elimelech M. “*Toxic effects of single-walled carbon nanotubes in the development of E. coli biofilm*”. Environ Sci Technol. 2010;44(12):4583-4589. doi:10.1021/es1005785

- [53] <https://areeweb.polito.it/strutture/cemed/sistemaperiodico/fuller.html> , “Il Fullerene”, ultima visita 15/03/2021
- [54] Santos A, Veiga F, Figueiras A. “*Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity and Biomedical Applications*”. Materials (Basel). 2019;13(1):65. Published 2019 Dec 21. doi:10.3390/ma13010065
- [55] Abdel-Sayed P, Kaeppli A, Siriwardena T, et al. Corrigendum: “*Anti-Microbial Dendrimers against Multidrug-Resistant P. aeruginosa Enhance the Angiogenic Effect of Biological Burn-wound Bandages*”. Sci Rep. 2016;6:23872. doi:10.1038/srep23872
- [56] Zhang L, Yin L, Wang C, Lun N, Qi Y. “*Sol-gel growth of hexagonal faceted ZnO prism quantum dots with polar surfaces for enhanced photocatalytic activity*”. ACS Appl Mater Interfaces. 2010;2(6):1769-1773. doi:10.1021/am100274d
- [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;14:9395-9410. Published 2019 Dec 2. doi:10.2147/IJN.S216204
- [58] Venturini L., “*Nanostrutture di Magneti a Singola Molecola mediante Micro-Contact Printing*”, Tesi di Laurea in Chimica, Università degli studi di Firenze, 2012, Rel Mannini Matteo
- [59] Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, et al. “*Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism*”. Nanomicro Lett. 2015;7(3):219-242. doi:10.1007/s40820-015-0040-x
- [60] Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu ZQ, Lin M. “*Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7*”. J Appl Microbiol. 2009;107(4):1193-1201. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04303.x
- [61] Pan X, Wang Y, Chen Z, et al. “*Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano-Mg(OH)₂*”. ACS Appl Mater Interfaces. 2013;5(3):1137-1142. doi:10.1021/am302910q
- [62] Kołodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T. “*Zinc Oxide-From Synthesis to Application: A Review*”. Materials (Basel). 2014;7(4):2833-2881. Published 2014 Apr 9. doi:10.3390/ma7042833
- [63] Özgür Ü., Alivov Ya. I., Liu C., Teke A., Reshchikov M. A., Doğan S., Avrutin V., Cho S.-J., Morkoç H., “*A comprehensive review of ZnO materials and devices*”, Journal of Applied Physics 98, 2005
- [64] Guo K.W., “*Property of zinc oxide (ZnO) nanostructures potential for biomedical system and its common growth mechanism*”, J Appl Biotechnol Bioeng. 2017;2(5):197–202. doi: 10.15406/jabb.2017.02.00046

- [65] Cosendey G.,“(In,Al)N-based blue microcavity lasers”, Thèse n°5675, Faculté des Sciences de base Laboratoire en semiconducteurs avancés pour la photonique et l'électronique programme, Doctoral en Photonique, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2013
- [66] Król A, Pomastowski P, Rafińska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. “Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism” [published correction appears in Adv Colloid Interface Sci. 2018 Apr;254:100]. Adv Colloid Interface Sci. 2017;249:37-52. doi:10.1016/j.cis.2017.07.033
- [67] Wang Y, Zhang C, Bi S, Luo G, “Preparation of ZnO nanoparticles using the direct precipitation method in a membrane dispersion micro-structured reactor”, Powder Technol 2010; 202:130–136
- [68] Kumar H, Rani R, “Structural and Optical Characterization of ZnO Nanoparticles Synthesized by Microemulsion Route”, International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy, 2013;19: 26-36,
- [69] Gour A, Jain NK. “Advances in green synthesis of nanoparticles”. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2019;47(1):844-851. doi:10.1080/21691401.2019.1577878
- [70]<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/zinc-oxide-market-116672256.html>, “Zinc oxide market by process, grade, application, region- Global Forecast to 2024”, ultima visita 15/03/2021
- [71] Das A., Wang D.Y., Leuteritz A., Subramaniam K., Greenwell, H.C., Wagenknecht U., Heinrich G., “Preparation of zinc oxide free, transparent rubber nanocomposites using a layered double hydroxide filler”, J. Meater. Chem., 21, 2011, pp. 7194–7200
- [72] Ramazanzadeh B, Jahanbin A, Yaghoubi M, et al. “Comparison of Antibacterial Effects of ZnO and CuO Nanoparticles Coated Brackets against Streptococcus Mutans”. J Dent (Shiraz). 2015;16(3):200-205.
- [73] Vaishnav J., Subha V., Kirubanandan S., Arulmozhi M., Renganathan S., “Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by Celosia argentea and its characterization”, Journal of Optoelectronic and Biomedical Materials 2017; 9:59–714
- [74] Sudhagar S, Sathya S, Pandian K, Lakshmi BS. “Targeting and sensing cancer cells with ZnO nanoprobes in vitro”. Biotechnol Lett. 2011;33(9):1891-1896. doi:10.1007/s10529-011-0641-5
- [75] Liu Y, Ai K, Yuan Q, Lu L. “Fluorescence-enhanced gadolinium-doped zinc oxide quantum dots for magnetic resonance and fluorescence imaging”. Biomaterials. 2011;32(4):1185-1192. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.10.022
- [76] Nie L, Gao L, Feng P, et al. “Three-dimensional functionalized tetrapod-like ZnO nanostructures for plasmid DNA delivery”. Small. 2006;2(5):621-625. doi:10.1002/smll.200500193

- [77] Akbar A., Anal A.K., “Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat poultry meat”, *Food Control*, 38, 2014, pp. 88-95
- [78] Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. “Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles”. *Langmuir*. 2011;27(7):4020-4028. doi:10.1021/la104825u
- [79] Pasquet J, Chevalier Y, Pelletier J, Couval E, Bouvier D, Bolzinger MA, “The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*”. 2014;457:263–274. 10.1016/j.colsurfa.2014.05.057.
- [80] Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fiévet F. “Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium”. *Nano Lett*. 2006;6(4):866-870. doi:10.1021/nl052326h
- [81] Mohd Yusof H, Mohamad R, Zaidan UH, Abdul Rahman NA. “Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review”. *J Anim Sci Biotechnol*. 2019;10:57. doi:10.1186/s40104-019-0368-z
- [82] Cho WS, Duffin R, Howie SE, et al. “Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes”. *Part Fibre Toxicol*. 2011;8:27. doi:10.1186/1743-8977-8-27
- [83] Kumar R., Umar A., Kumar G., Singh H., “Antimicrobial Properties of ZnO Nanomaterials: A Review”, *Ceramics International*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.062>
- [84] Siddiqi KS, Ur Rahman A, Tajuddin, Husen A. “Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes”. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(1):141. Published 2018 May 8. doi:10.1186/s11671-018-2532-3
- [85] Arakha M, Saleem M, Mallick BC, Jha S. “The effects of interfacial potential on antimicrobial propensity of ZnO nanoparticle”. *Sci Rep*. 2015;5:9578. Published 2015 Apr 15. doi:10.1038/srep09578
- [86] Emami-Karvani Z., Chehrazi P., “Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram positive and gram-negative bacteria”, *African Journal of Microbiology Research*, 2011;5(12):1368-1373 doi: 10.5897/AJMR10.159
- [87] Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A. “Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems”. *Appl Phys Lett*. 2007;90(213902):2139021-2139023. doi:10.1063/1.2742324
- [88] Wang X, Yang F, Yang W, Yang X. “A study on the antibacterial activity of one-dimensional ZnO nanowire arrays: effects of the orientation and plane surface”. *Chem Commun (Camb)*. 2007;(42):4419-4421. doi:10.1039/b708662h

- [89] Schumacher A, Vranken T, Malhotra A, Arts JJC, Habibovic P. “*In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models*”. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018;37(2):187-208. doi:10.1007/s10096-017-3089-2
- [90] https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, “Clinical breakpoints - breakpoints and guidance”, ultima visita 15/03/2021
- [91] Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. “*Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*”. J Pharm Anal. 2016;6(2):71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- [92] Jorgensen JH, Ferraro MJ. “*Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices*”. Clin Infect Dis. 2009;49(11):1749-1755. doi:10.1086/647952
- [93] Lertcanawanichakul M, Sawangnop S “*A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of Bacillus Species*”. Walailak J Sci & Tech, 2008;5(2):161-171
- [94] López-Carballo G, Gómez-Estaca J, Catalá R, Hernández-Muñoz P, Gavara R, “*Active antimicrobial food and beverage packaging*”, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATAACSIC) Woodhead Publishing Series in Food Science”, Technology and Nutrition, 2012: 27-54
- [95] Tenover FC. “*Antibiotic Susceptibility Testing*”, Centers for Disease Control and Prevention, 2009, Atlanta, GA, USA, doi:10.1016/B978-012373944-5.00239-X
- [96] Iavicoli I, Leso V, Beezhold DH, Shvedova AA. “*Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks*”. Toxicol Appl Pharmacol. 2017;329:96-111. doi:10.1016/j.taap.2017.05.025
- [97] Yang P, Hong W, Zhou P, Chen B, Xu H. “*Nano and bulk ZnO trigger diverse Zn-transport-related gene transcription in distinct regions of the small intestine in mice after oral exposure*”. Biochem Biophys Res Commun. 2017;493(3):1364-1369. doi:10.1016/j.bbrc.2017.09.165
- [98] Singh S. “*Zinc oxide nanoparticles impacts: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity*”. Toxicol Mech Methods. 2019;29(4):300-311. doi:10.1080/15376516.2018.1553221
- [99] Hu YL, Gao JQ. “*Potential neurotoxicity of nanoparticles*”. Int J Pharm. 2010;394(1-2):115-121. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.04.026
- [100] Hu, R., Yang, J., Yang, P. et al. “*Fabrication of ZnO@Cotton fabric with anti-bacterial and radiation barrier properties using an economical and environmentally friendly method*”. Cellulose 27, 2901–2911 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02965-1>
- [101] <https://www.puntosicuro.it/sicurezza-sul-lavoro-C-1/tipologie-di-rischio-C-5/rischio-chimico-C-33/rischio-chimico-i-valori-di-riferimento-nel-processo-di-valutazione-AR-18449/>, “Rischio chimico: i valori di riferimento nel processo di valutazione”, a cura di Nicholas Giralico, ultima visita 15/03/2021

- [102] Scheda dati di sicurezza ossido di zinco, Fabbrica ossido di zinco, A-Esse S.p.A., Revisione: 8, Data emissione: 01/06/2017, Data di stampa:14/06/2017
- [103] https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=0208&p_version=2&p_lang=it, “Ossido di zinco”, ultima visita 15/03/2021
- [104] Zafar R, Zia KM, Tabasum S, Jabeen F, Noreen A, Zuber M. “*Polysaccharide based bionanocomposites, properties and applications: A review*”. Int J Biol Macromol. 2016;92:1012-1024. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.07.102
- [105] Mhd Haniffa MAC, Ching YC, Abdullah LC, Poh SC, Chuah CH. “*Review of Bionanocomposite Coating Films and Their Applications*”. Polymers (Basel). 2016;8(7):246. Published 2016 Jun 29. doi:10.3390/polym8070246
- [106] Al-Tayyar NA, Youssef AM, Al-Hindi R. “*Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne Pathogens: A review*”. Food Chem. 2020;310:125915. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125915
- [107] Aderibigbe BA, Buyana B. “*Alginate in Wound Dressings*”. Pharmaceutics. 2018;10(2):42. Published 2018 Apr 2. doi:10.3390/pharmaceutics10020042
- [108] Chen Y, Lu W, Guo Y, Zhu Y, Song Y. “*Electrospun Gelatin Fibers Surface Loaded ZnO Particles as a Potential Biodegradable Antibacterial Wound Dressing*”. Nanomaterials (Basel). 2019;9(4):525. Published 2019 Apr 3. doi:10.3390/nano9040525
- [109] Kumar D, Saini N, Pandit V, Ali S, “*An Insight to Pullulan: A Biopolymer in Pharmaceutical Approaches*”, International Journal of Basic and Applied Sciences 2012;1 doi:10.14419/ijbas.v1i3.101
- [110] Baghaie S, Khorasani MT, Zarrabi A, Moshtaghian J. “*Wound healing properties of PVA/starch/chitosan hydrogel membranes with nano Zinc oxide as antibacterial wound dressing material*”. J Biomater Sci Polym Ed. 2017;28(18):2220-2241. doi:10.1080/09205063.2017.1390383
- [111] Gadani E., “*Le proteine del siero: un sottoprodotto dalle grandi potenzialità salutistiche*”, Tesi di Laurea, Corso di Studio in Tecnologie alimentari, Università di Bologna, Cesena, 2019, Rel. Caboni Maria
- [112] Morr CV, Ha EY. “*Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties*”. Crit Rev Food Sci Nutr. 1993;33(6):431-476. doi:10.1080/10408399309527643
- [113] Heine WE, Klein PD, Reeds PJ. “*The importance of alpha-lactalbumin in infant nutrition*”. J Nutr. 1991;121(3):277-283. doi:10.1093/jn/121.3.277
- [114] Gunatillake PA, Adhikari R. “*Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*”. Eur Cell Mater. 2003;5:1-16. Published 2003 May 20. doi:10.22203/ecm.v005a01

- [115] Sun X, Xu C, Wu G, Ye Q, Wang C. “*Poly(Lactic-co-Glycolic Acid): Applications and Future Prospects for Periodontal Tissue Regeneration*”. *Polymers (Basel)*. 2017;9(6):189. Published 2017 Jun 1. doi:10.3390/polym9060189
- [116] Wu JY, Li CW, Tsai CH, Chou CW, Chen DR, Wang GJ. “*Synthesis of antibacterial TiO₂/PLGA composite biofilms*”. *Nanomedicine*. 2014;10(5):1097-1107. doi:10.1016/j.nano.2014.01.002
- [117] Ahmed R, Tariq M, Ali I, et al. “*Novel electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/zinc oxide nanofibrous mats with antibacterial and antioxidant properties for diabetic wound healing*”. *Int J Biol Macromol*. 2018;120(Pt A):385-393. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.08.057
- [118] Hezma A.M., Rajehb A., Mannaab M.A., “An insight into the effect of zinc oxide nanoparticles on the structural, thermal, mechanical properties and antimicrobial activity of Cs/PVA Composite”, *Colloids and Surfaces A* 2019; 581,123821
- [119] Soubhagya AS, Moorthi A, Prabakaran M. “*Preparation and characterization of chitosan/pectin/ZnO porous films for wound healing*”. *Int J Biol Macromol*. 2020;157:135-145. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.156
- [120] Wahid F, Yin JJ, Xue DD, et al. “*Synthesis and characterization of antibacterial carboxymethyl Chitosan/ZnO nanocomposite hydrogels*”. *Int J Biol Macromol*. 2016;88:273-279. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.03.044
- [121] Li LH, Deng JC, Deng HR, Liu ZL, Li XL, “*Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films*”, *Chemical Engineering Journal*, 2010;160:378–382,
- [122] Abdalkarim SYH, Yu HY, Wang D, Yao J, “*Electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose reinforced nanofibrous membranes with ZnO nanocrystals for antibacterial wound dressings Cellulose*” Springer, 2017, doi:10.1007/s10570-017-1303-0
- [123] Yadollahi M, Gholamali I, Namazi H, Aghazadeh M. “*Synthesis and characterization of antibacterial carboxymethyl cellulose/ZnO nanocomposite hydrogels*”. *Int J Biol Macromol*. 2015;74:136-141. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.11.032
- [124] Shalumon KT, Anulekha KH, Nair SV, Nair SV, Chennazhi KP, Jayakumar R. Corrigendum to “*Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings*” [*Int. J. Biol. Macromol.*, 49 (2011) 247-254]. *Int J Biol Macromol*. 2019;134:1218. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.152
- [125] Paduraru A, Ghitulica C, Trusca R, et al. “*Antimicrobial Wound Dressings as Potential Materials for Skin Tissue Regeneration*”. *Materials (Basel)*. 2019;12(11):1859. Published 2019 Jun 8. doi:10.3390/ma12111859
- [126] Raafat AI, El-Sawy NM, Badawy NA, Mousa EA, Mohamed AM. “*Radiation fabrication of Xanthan-based wound dressing hydrogels embedded ZnO nanoparticles: In vitro evaluation*”. *Int J Biol Macromol*. 2018;118(Pt B):1892-1902. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.07.031

- [127] Mohandas A, Kumar P T S, Raja B, Lakshmanan VK, Jayakumar R. “*Exploration of alginate hydrogel/nano zinc oxide composite bandages for infected wounds*” [published correction appears in Int J Nanomedicine. 2019 Apr 11;14:2607-2608]. Int J Nanomedicine. 2015;10 Suppl 1(Suppl 1):53-66. Published 2015 Oct 1. doi:10.2147/IJN.S79981
- [128] Bužarovska A, Dinescu S, Lazar AD, et al. “*Nanocomposite foams based on flexible biobased thermoplastic polyurethane and ZnO nanoparticles as potential wound dressing materials*”. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;104:109893. doi:10.1016/j.msec.2019.109893
- [129] Gong CP, Luo Y, Pan YY. “*Novel synthesized zinc oxide nanoparticles loaded alginate-chitosan biofilm to enhanced wound site activity and anti-septic abilities for the management of complicated abdominal wound dehiscence*”. J Photochem Photobiol B. 2019;192:124-130. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.01.019
- [130] Wang T, Wang J, Wang R, Yuan P, Fand Z, Yang S, “*Preparation and properties of ZnO/sodiumalginate bi-layered hydrogel films as novel wound dressings*”, New J. Chem., 2019;43:8684—8693, doi: 10.1039/c9nj00402e
- [131] Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN. “*Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing*”. Biomaterials. 2001;22(2):165-173. doi:10.1016/s0142-9612(00)00167-8
- [132] Campos M, Cordi L, Duran N, Mei L, “*Antibacterial Activity of Chitosan Solutions for Wound Dressing*”, Macromol. Symp, 2006;245–246:515–518
- [133] Chung YC, Chen CY. “*Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan*”. Bioresour Technol. 2008;99(8):2806-2814. doi:10.1016/j.biortech.2007.06.044
- [134] Li XF, Feng XQ, Yang S, Fu GQ, Wang TP, Su ZG., “*Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism*”, Carbohydrate Polymers 2010;79:493–499
- [135] Helander IM, Nurmiäho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. “*Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria*”. Int J Food Microbiol. 2001;71(2-3):235-244. doi:10.1016/s0168-1605(01)00609-2
- [136] Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. “*Chitosan kills bacteria through cell membrane damage*”. Int J Food Microbiol. 2004;95(2):147-155. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022
- [137] Emamifar A., Kadivar M., Shahedi M., Soleimani-Zad S., “*Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice*”, Innovative Food Science and Emerging Technologies 2010;11:742–748
- [138] Li CH, Shen CC, Cheng YW, et al. “*Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. Nanotoxicology*”. 2012;6(7):746-756. doi:10.3109/17435390.2011.620717

- [139] Chen YM , Chung YC , Wang LW , Chen KT, Li SY
“Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen”, Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 2002;37:7, 1379-1390
- [140] <https://www.pinterest.nz/pin/500110733616318768/?send=true>, ultima visita 16/03/2021
- [141] <http://studyofdentistry.blogspot.com/2017/10/wound-healing.html>, modificata, ultima visita 16/03/2021
- [142] <https://www.piedediabeticonline.it/ulcera-diabetica.html>, “Ulcera Neuropatica plantare”, ultima visita 16/03/2021
- [143] <https://www.mwr-it.com/>, “Microbiota” , ultima visita 16/03/2021
- [144] <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-gram-positive-gram-negative-bacteria-difference-bacterial-image45337024>, ultima visita 16/03/2021
- [145] <https://it.wikipedia.org/wiki/Batteriostatico>, ultima visita 16/03/2021
- [146] <https://www.chimica-online.it/composti/nitrato-di-argento.htm>, ultima visita 16/03/2021
- [147] <https://www.stileolistico.it/oli-essenziali-conoscerli-usarli-al-meglio/>, “Oli essenziali, conoscerli per usarli al meglio”, ultima visita 16/03/2021
- [148] Lansdown AB, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Agren MS. “Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects”. Wound Repair Regen. 2007;15(1):2-16. doi:10.1111/j.1524-475X.2006.00179.x