

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

## **Bionanocompositi a base di $\beta$ -glucani**



### **Relatori**

prof.ssa Barbara Onida

prof.ssa Francesca Bosco

### **Candidato**

Giorgia Pellegrino

Luglio 2021



## Indice

Acronimi.....	i
Introduzione .....	1
Capitolo 1: Attività Biologica .....	2
1.1 Stimolazione del sistema immunitario .....	2
1.2 Attività antibatterica .....	4
1.2.1 Metodi per la valutazione dell'attività antimicrobica.....	6
1.3 Fonte di estrazione .....	8
1.3.1 <i>Sargassum crassifolium</i> .....	8
1.3.2 <i>Ganoderma lucidum</i> .....	9
1.3.2.1 Solfatazione .....	9
1.3.3 <i>Hordeum vulgare</i> .....	10
1.3.3.1 Carbossimetilazione .....	10
1.3.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
1.3.4.1 Trattamento con raggi $\gamma$ .....	12
1.4 Effetto antimicrobico.....	12
1.4.1 $\beta$ -glucani estratti da <i>Sargassum crassifolium</i> .....	12
1.4.2 $\beta$ -glucani estratti da <i>Ganoderma lucidum</i> .....	15
1.4.3 $\beta$ -glucani estratti da <i>Hordeum vulgare</i> .....	16
1.4.4 $\beta$ -glucani estratti da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	17
Capitolo 2: Proprietà dei film compositi a base di $\beta$ -glucani .....	19
2.1 Proprietà della medicazione ideale.....	19
2.2 Formulazione dei film .....	20
2.3 Proprietà meccaniche .....	22
2.3.1 Resistenza a trazione .....	22
2.3.2 Allungamento a rottura.....	23
2.3.3 Modulo elastico .....	24
2.3.4 Resistenza a compressione .....	25
2.4 Controllo dell'umidità .....	26
2.4.1 Assorbimento dell'acqua .....	26
2.4.2 Swelling ratio .....	28
2.4.3 Velocità di trasmissione e permeabilità al vapore acqueo .....	31
2.5 Attività antimicrobica.....	33
2.6 Wound healing .....	33

2.7 Rapporto costo/efficienza.....	36
Capitolo 3: Materiali e metodi .....	38
3.1 Materiali .....	38
3.2 Sintesi e caratterizzazione dell'ossido di zinco .....	38
3.2.1 Sintesi per precipitazione .....	38
3.2.2 Metodi per la caratterizzazione dell'ossido di zinco .....	38
3.2.2.1 Diffrazione a raggi X.....	38
3.2.2.2 Analisi di fisisorbimento di azoto .....	38
3.3 Sintesi e caratterizzazione dei film compositi.....	39
3.3.1 Formulazione dei film .....	39
3.3.2 Caratterizzazione dei film .....	41
3.3.2.1 Microscopia a Scansione Elettronica.....	41
3.3.2.2 Diffrazione a raggi X.....	42
3.3.2.3 ATR-FTIR .....	42
3.2.2.4 Analisi termica .....	42
3.3 Test di swelling .....	43
3.4 Valutazione dell'attività antimicrobica .....	43
3.4.1 Metodo "Broth micro-dilution" in piastre multiwell da 96 pozzetti .....	44
3.4.2 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia .....	46
3.4.3 Metodo Kirby-Bauer della diffusione del disco .....	48
Capitolo 4: Risultati .....	49
4.1 Metodi per la caratterizzazione dell'ossido di zinco .....	49
4.1.1 Diffrazione a raggi X.....	49
4.1.2 Analisi di fisisorbimento di azoto .....	49
4.2 Sintesi e caratterizzazione dei film compositi.....	50
4.2.1 Formulazione dei film .....	50
4.2.2 Caratterizzazione dei film .....	51
4.2.2.1 Microscopia a Scansione Elettronica.....	51
4.2.2.2 Diffrazione a raggi X.....	52
4.2.2.3 ATR-FTIR .....	53
4.2.2.4 Analisi termica .....	54
4.3 Swelling.....	56
4.4 Valutazione dell'attività antimicrobica .....	57
4.4.1 Metodo di micro-diluizione in piastre multiwell da 96 pozzetti .....	57

4.4.2 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia.	58
4.4.3 Metodo Kirby-Bauer della diffusione del disco .....	60
Capitolo 5: Conclusioni e sviluppi futuri .....	62
Bibliografia.....	65
Ringraziamenti .....	69



## Acronimi

BG	$\beta$ -glucani
nZnO	Ossido di zinco nanostrutturato
BRM	<i>Biological Response Modifier</i>
PAMP	Pattern molecolari associati ai patogeni
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Minima concentrazione inibente
MBC	Minima concentrazione battericida
DMSO	Dimetilsulfossido
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico
PVA	Alcol polivinilico
ZnO NPs	Nanoparticelle di ossido di zinco
EGDGE	Glicole etilenico diglicidil etere
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
WVTR	<i>Water Vapor Transmission Rate</i>
WVP	<i>Water Vapor Permeability</i>
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
WCR	<i>Wound Contraction Ratio</i>
HPMC	Idrossipropilmetilcellulosa
PEO	Ossido di polietilene

BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barret-Joyner-Helenda
SEM	Microscopia a scansione elettronica
ATR-FTIR	Spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata
TGA	Analisi termogravimetrica
DSC	Calorimetria a scansione differenziale
Tg	Temperatura di transizione vetrosa
EDS	<i>Energy Dispersive Spectrometry</i>





## Introduzione

Negli ultimi anni i  $\beta$ -glucani (BG) hanno attirato molto l'attenzione per il ventaglio di attività biologiche che presentano, in particolar modo l'attività antimicrobica. Per questo motivo sono stati portati avanti studi volti a testarne la capacità di formare film e il loro effetto sulla cute lesa, con l'obiettivo di ottenere hydrogel o film per il wound dressing.

Questo lavoro di tesi nasce nell'ottica di evidenziare i principali meccanismi relativi all'attività antibatterica ed ottimizzare il processo di preparazione di film in BG. In seguito ad uno studio dello stato dell'arte, sono stati formulati e ottenuti sperimentalmente film di soli BG, e film di BG funzionalizzati con ossido di zinco nanostrutturato (nZnO), noto per essere un potente antimicrobico, sintetizzato in laboratorio per precipitazione.

Nel primo capitolo è stata studiata l'attività biologica dei BG, descrivendo brevemente l'effetto principale di stimolazione del sistema immunitario e accelerazione della riepitelizzazione della ferita, concentrandosi successivamente sull'attività antimicrobica dei BG estratti da diverse fonti, i metodi per misurarla, e le strategie per incrementarla laddove fosse scarsa o inesistente.

Nel secondo capitolo è stato eseguito uno studio delle principali proprietà che rendono un film adatto al wound dressing, esaminando come l'aggiunta di BG influisca su tali proprietà e comparandole con quelle delle principali medicazioni avanzate usate per la cura di ferite croniche. È stato inoltre effettuato anche uno studio dello stato dell'arte di hydrogel e film usati per il wound dressing: è stato esaminato il potenziale utilizzo delle medicazioni con sperimentazioni *in vivo* su animali riportate in letteratura e, in aggiunta, è stato analizzato anche l'aspetto economico, valutando il rapporto costi/efficienza.

Nel terzo capitolo è stata esposta la procedura di sintesi di nZnO e dei film compositi in BG e nZnO, e sono stati illustrati i metodi per la caratterizzazione di entrambi. In seguito, sono stati presentati i test a cui sono stati sottoposti i film e le diverse prove antimicrobiche effettuate per verificare le proprietà batteriostatiche e battericide di nZnO e dei film in BG, sia funzionalizzati che non.

Nel quarto capitolo sono stati discussi i risultati ottenuti dalle prove sperimentali ed è stato individuato il miglior metodo di sintesi dei film in BG e nZnO.

Infine, nel quinto e ultimo capitolo sono state tratte le conclusioni di questo lavoro di tesi e sono stati proposti degli spunti per continuare ad approfondire il lavoro in futuro.

## Capitolo 1: Attività Biologica

### 1.1 Stimolazione del sistema immunitario

I  $\beta$ -glucani (BG) sono polisaccaridi che costituiscono la struttura della parete cellulare di funghi, lieviti, alghe e cereali, dai quali possono essere estratti. Sono formati da lunghe catene polimeriche in cui i monomeri di glucosio sono legati tramite legami beta e differiscono tra di loro per dimensione, grado di ramificazione, metodo di purificazione e fonte di estrazione. Quest'ultimo aspetto influenza la posizione dei legami, cambiando quindi la forma finale della catena: i BG estratti da lieviti e funghi contengono principalmente catene lineari  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) o  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) con catene laterali  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), mentre quelli estratti da cereali hanno una catena principale  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), interrotta da legami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) separati. Ciò comporta una grande diversificazione nelle proprietà fisiche e chimiche. Il legame viene definito "beta" a causa della posizione che il gruppo -OH, legato al carbonio in posizione 1, assume nello spazio nel caso della conformazione ad anello: graficamente, utilizzando la proiezione di Haworth, il gruppo -OH è rappresentato rivolto verso l'alto, a differenza degli  $\alpha$ -glucani che invece hanno tale gruppo rivolto verso il basso; la notazione  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) si riferisce invece alla posizione dei legami del singolo monomero con le altre molecole di glucosio della catena (Figura 1.1).

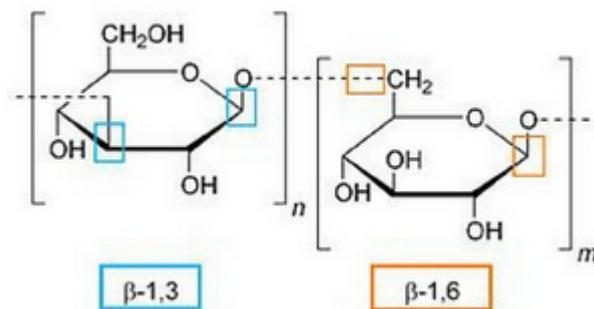
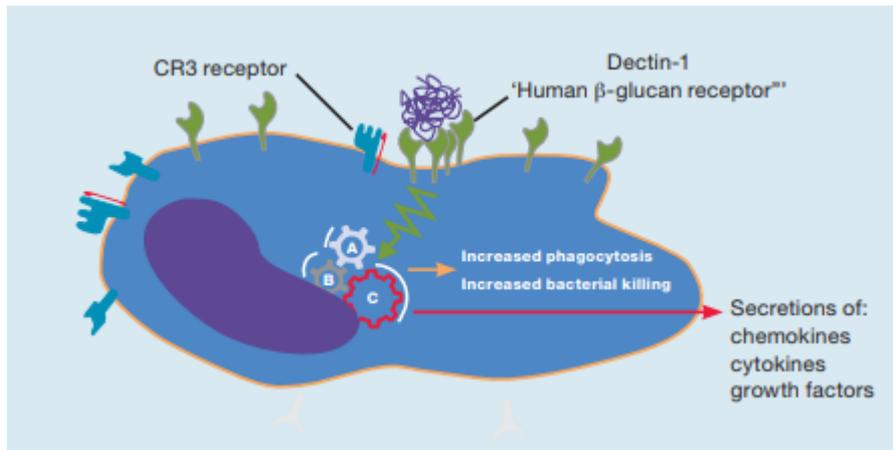


Figura 1.1: Esempio di legame beta [1]

I BG fanno parte di un gruppo di composti chiamati *biological response modifier* (BRM), ovvero sostanze che modificano la risposta immunitaria. Ciò avviene perché non sono presenti nelle cellule dei mammiferi, né sono sostanze prodotte durante il metabolismo cellulare, perciò dal punto di vista del sistema immunitario sono considerati *non self*. [2]

Le cellule del sistema immunitario possiedono sulla membrana esterna dei recettori specifici che riconoscono i BG come pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP), stimolando prima la risposta immunitaria innata, cioè quella che l'organismo mette in atto in prima istanza, e in seguito quella adattativa. [3]

Esistono diversi recettori associati al riconoscimento dei BG, tra questi solo Dectin-1 ha dimostrato di avere un ruolo chiave nella risposta cellulo-mediata descritta in Figura 1.2.



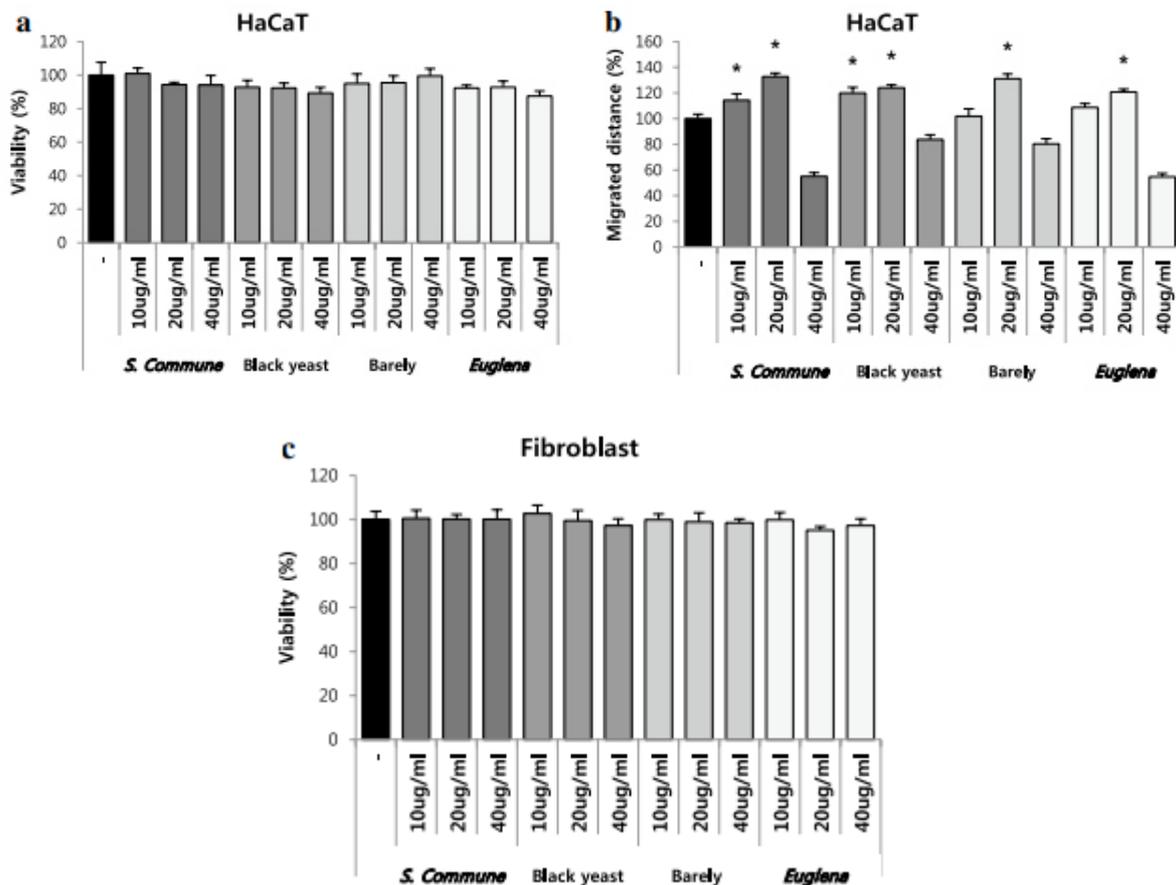
**Figura 1.2:** Attivazione dei macrofagi tramite Dectin-1 [2]

Una volta che la molecola di  $\beta$ -glucano si lega al recettore si mettono in moto due meccanismi distinti:

1. produzione di macrofagi, neutrofili e cellule dendritiche, protagonisti della risposta immunitaria, che innescano la fagocitosi dei corpi estranei;
2. produzione di cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali, incrementata anche dalla presenza di citochine e fattori di crescita attivati dai macrofagi. La presenza di molecole di  $\beta$ -glucano favorisce non solo la proliferazione, ma anche la migrazione di queste cellule, promuovendo la riepitelizzazione e accelerando il processo di chiusura e guarigione della ferita. [3, 4]

Il processo che regola tutto ciò non è ancora perfettamente chiaro, molto probabilmente a causa di prove sperimentali condotte utilizzando BG molto diversi in termini di peso molecolare, fonte di estrazione ed eventuali modificazioni chimiche, rendendo così incoerenti e controversi i risultati ottenuti. Queste discordanze possono essere attribuite alla diversa capacità dei BG di stimolare il sistema immunitario, fortemente influenzata dalla struttura terziaria, dal grado di ramificazione e dalla lunghezza del polimero. [5]

Uno studio comparativo [6] condotto su quattro BG con struttura diversa, estratti rispettivamente dal fungo *S. commune*, da un lievito del gruppo dei *Black yeast*, dall'orzo e dall'alga *E. gracilis*, ha messo in luce i diversi effetti sulle cellule epiteliali (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** a) vitalità delle linee cellulari di cheratinociti umani immortalizzati (HaCaT); b) distanza di migrazione; c) vitalità dei fibroblasti [6]

I risultati di questo studio dimostrano che i BG non hanno potere citotossico sulle cellule, indipendentemente dalla loro natura, ma hanno una diversa influenza sulla mobilità delle cellule. Il test per la valutazione della “distanza di migrazione” prevede la realizzazione di un’incisione sul monostrato di cheratinociti e la comparazione della lunghezza del graffio dopo 24h, tramite il programma di elaborazione digitale delle immagini *ImageJ*. Dalla figura 1.3b si deduce che, in generale, la concentrazione ottimale di BG con cui trattare i cheratinociti è 20 µg/ml e che, tra tutti, i BG estratti da *S. commune* sono i più efficaci.

Il motivo per cui però la mobilità non aumenti o diminuisca in maniera commisurata al quantitativo di BG non è ancora noto. Gli autori dello studio attribuiscono questo comportamento a reazioni complesse che avvengono a causa della presenza di probabili impurezze nei campioni di BG usati. È necessario quindi uno studio più preciso e accurato, che preveda innanzitutto un’analisi dettagliata della composizione dei campioni e la loro caratterizzazione, al fine di valutare quali possono essere le reazioni secondarie che concorrono ad una maggiore o minore distanza di migrazione dei cheratinociti al variare della concentrazione dei BG. [6]

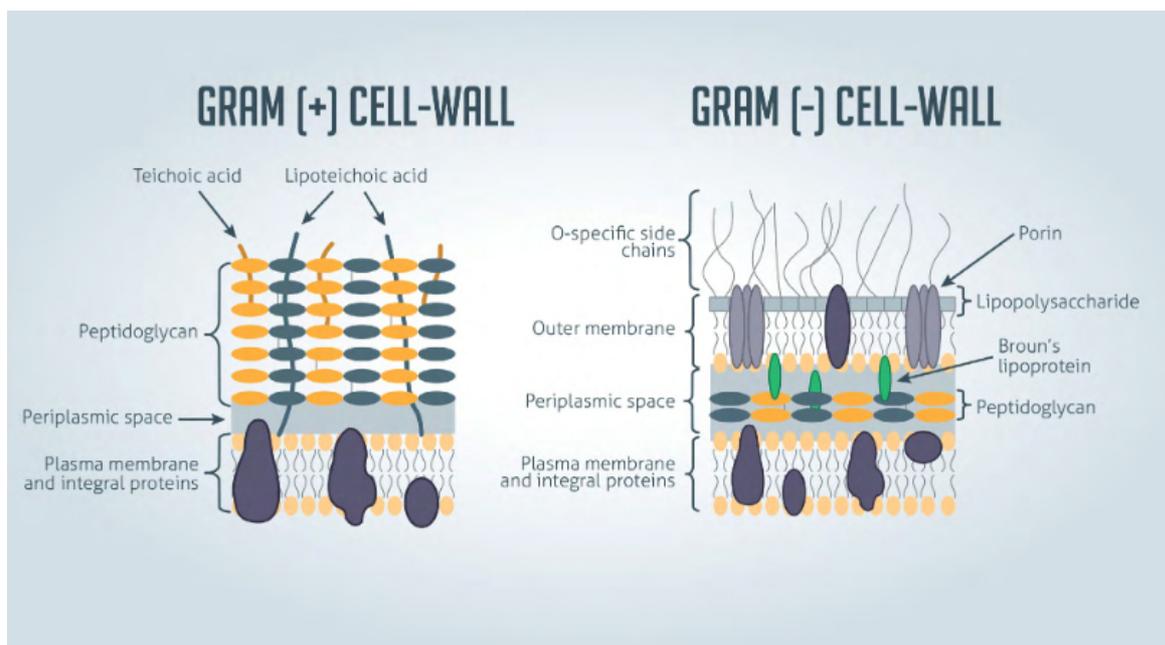
## 1.2 Attività antibatterica

L’antibiotico-resistenza è un problema dilagante nella società odierna, dovuto principalmente all’uso smodato e improprio di antibiotici, ma anche al loro errato smaltimento che, di fatto, ne fa perdere l’efficacia, perché porta alla selezione di determinati

ceppi batterici in grado di tollerare la presenza dell'antibiotico. Risulta infatti sempre più complicato non solo riuscire a bloccare il propagarsi di un'infezione già in corso, ma anche evitare che l'infezione stessa abbia luogo. Nasce quindi la necessità di sviluppare soluzioni antimicrobiche alternative a quelle convenzionali. [7]

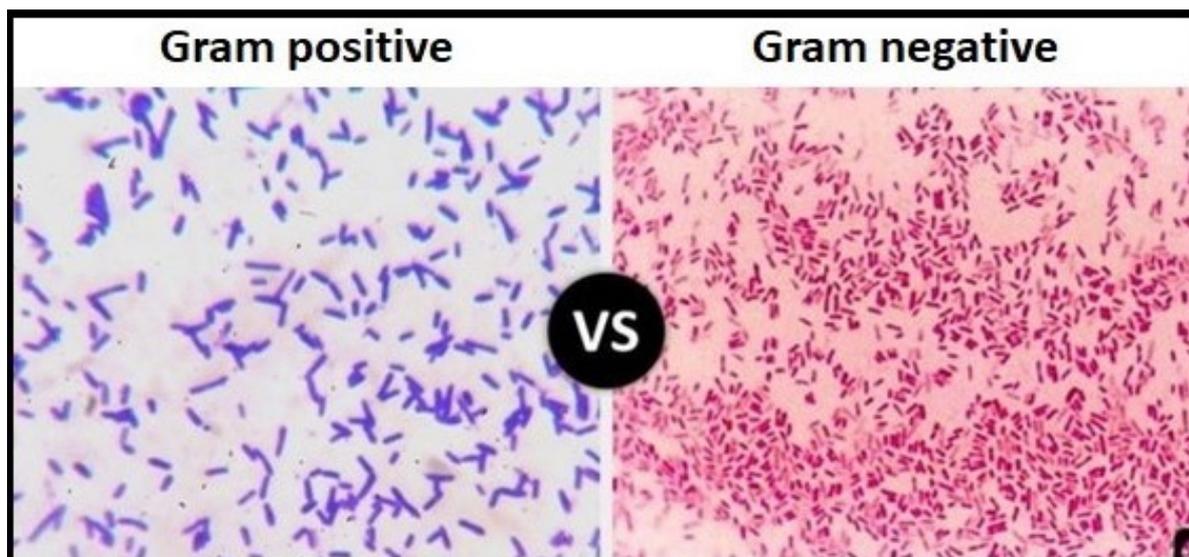
In questo panorama si fanno spazio i BG, che nell'ultimo decennio sono stati oggetto di studio e di prove sperimentali *in vitro*, in modo tale da valutare un altro aspetto della loro attività biologica, cioè l'attività antimicrobica diretta: in questo caso non è previsto l'intervento del sistema immunitario, ma il meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiaro. La presenza di attività antimicrobica diretta porta ad estendere l'utilizzo dei BG anche al di là dell'uso medico e farmaceutico del wound dressing, trovando spazio nel mondo del food packaging o in generale riscontrando applicazione in tutti quegli ambiti in cui sono necessari rivestimenti antibatterici.

I batteri sono classificati in Gram positivi (+) e Gram negativi (-), in base alla struttura della loro parete esterna che induce una risposta diversa in seguito all'utilizzo del metodo di colorazione di Gram. I batteri Gram (+) infatti hanno uno spesso strato di peptidoglicano e nessuna membrana lipidica esterna, a differenza dei Gram (-), che oltre ad avere la membrana di lipopolisaccaridi hanno lo strato di peptidoglicano più sottile, come mostrato in Figura 1.4.



**Figura 1.4:** Differenze nella struttura della parete dei batteri Gram (+) e Gram (-) [8]

L'aggettivo "positivo" si riferisce alla capacità di questi batteri di conservare il caratteristico aspetto viola, visibile con il microscopio ottico, in seguito al trattamento di Gram, abilità che invece non hanno i "negativi", che perdono la colorazione viola e ne acquisiscono un'altra che vira al rosso o rosa (Figura 1.5) [8].



**Figura 1.5:** Differenza nella colorazione dei batteri Gram (+) e Gram (-) [8]

### 1.2.1 Metodi per la valutazione dell'attività antimicrobica

Per valutare l'attività antimicrobica di un composto possono essere usati diversi metodi, suddivisi in due classi: i metodi a diffusione e i metodi a diluizione. Fanno parte dei metodi a diffusione il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar conformemente alla procedura standard Eucast "Agar disk-diffusion method", il metodo del gradiente antimicrobico, il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato "Agar well diffusion method" e il metodo "Agar plug diffusion method". Nei metodi a diffusione, invece, sono compresi il "Broth dilution method", definito "macro-dilution" o "micro-dilution" in base al volume impiegato durante l'analisi, e "Agar dilution method" [9].

In letteratura sono descritti due metodi per valutare l'attività antimicrobica dei BG in soluzione acquosa:

- Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar.

La procedura standardizzata [10] è la seguente:

1. Preparazione dell'inoculo standardizzato: 3 colonie, di dimensioni simili, vengono prelevate da una coltura batterica cresciuta per 18-24h su terreno solido, e disperse in soluzione salina 0,85% w/v. La dispersione viene quindi diluita in brodo di coltura in modo tale da ottenere una concentrazione pari a  $10^6$  CFU/mL (*Colony Forming Units/mL*).
2. L'inoculo viene depositato su terreno solido Mueller Hinton Agar (MHA) in piastre Petri e disperso uniformemente con un'ansa sterile.
3. Applicazione dei dischi antimicrobici: dischi impregnati con una soluzione della sostanza antimicrobica da testare vengono poggiati sulla piastra, facendo attenzione a farli aderire bene al terreno ed evitando di spostarli una volta posizionati. Il numero di dischi che è possibile collocare su ogni piastra è limitato dalle dimensioni della stessa Petri, poiché un numero eccessivo di dischi potrebbe portare ad aloni di inibizione sovrapposti e quindi ad una misura poco precisa ed affidabile.
4. Incubazione delle piastre: le Petri sono lasciate in incubazione a 37 °C per 24h
5. Misura della zona di inibizione: si posano le piastre sul piano di lavoro e le si osserva a 30 cm di distanza, misurando con un righello il diametro di inibizione intorno al

disco, partendo dal punto in cui non è possibile valutare crescita microbica ad occhio nudo.

Esiste anche una variante di questo test, chiamata “Oxford penicillin cup method” [11], in cui non sono usati dei dischi ma dei cilindri metallici posti sulla piastra e al cui interno è inserita la sostanza antimicrobica da testare.

- Metodo di micro-diluizione.

Anche in questo caso si usa una procedura standardizzata [12] che prevede l'utilizzo di una piastra multiwell da 96 pozzetti, divisa in 8 righe per 12 colonne. Gli step da seguire sono:

1. Preparazione delle diluizioni seriali dell'agente antimicrobico da testare.
2. Preparazione dell'inoculo standardizzato: in maniera analoga a quella descritta precedentemente, 3 colonie vengono prelevate da una coltura batterica cresciuta 18-24 h a 37°C su MHA e disperse in 5 mL di soluzione salina 0,85% w/v. La dispersione viene in questo caso diluita 1:1000 in MHB, ottenendo una concentrazione di  $10^5$  CFU/mL.
3. Riempimento dei pozzetti della piastra multiwell con brodo di coltura, agente antimicrobico e inoculo, tramite pipette, procedendo con concentrazioni decrescenti di agente antimicrobico. All'interno della stessa piastra sono presenti anche righe prive di inoculo, denominate “controllo abiotico”, e righe prive di agente antimicrobico, denominate “controllo biotico”.
4. Incubazione della piastra in ambiente controllato a 37 °C per 16-20h, avendo cura di sigillare la piastra con coperchio e nastro di plastica per evitare che il contenuto dei pozzetti si secchi.
5. Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC), in  $\mu\text{g/mL}$ , definita come “la più bassa concentrazione di agente antimicrobico che inibisce completamente la crescita dell'organismo nei pozzetti di micro-diluizione, rilevata ad occhio nudo” [12]. Per stabilire la MIC, si mette a confronto la torbidità dei pozzetti contenenti l'agente antimicrobico con quella dei pozzetti dei due controlli: si sceglie come MIC la concentrazione presente nel primo pozzetto in cui non è visibile una torbidità comparabile con i pozzetti di controllo biotico.

A partire dalla MIC viene misurata anche la concentrazione minima battericida, *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), cioè la concentrazione più bassa di antimicrobico sufficiente a ridurre la vitalità dei microorganismi di una quantità superiore al 99,9% e in un lasso di tempo prefissato tra le 18 e le 24 ore. Anche questo tipo di test segue un protocollo standardizzato [13]:

1. Partendo dal pozzetto in cui è stata individuata la MIC, si preleva una porzione di inoculo e la si sparge su una piastra. Si ripete la procedura per tutte le concentrazioni di nZnO più alte della MIC.
2. Le piastre sono lasciate in incubazione per 24h, al termine delle quali, si stabilisce come MBC la concentrazione più bassa presente nella Petri in cui non è individuabile la formazione di colonie batteriche.

La misura della MBC può essere considerata una prova integrativa alla valutazione della MIC, dato che la concentrazione minima inibente non assicura la morte della popolazione batterica, la quale potrebbe sviluppare una tolleranza a quella quantità di antibiotico. Gli

agenti antibatterici possono essere considerati “battericidi” se il rapporto MBC/MIC è inferiore a 4, altrimenti sono definiti “batteriostatici” [13].

Per entrambe le tipologie di test, sono previsti controlli positivi e negativi. Le prove sperimentali condotte sui BG hanno rivelato che l’attività antimicrobica varia non solo in base alla fonte di estrazione, ma anche in base al metodo di purificazione e può essere migliorata grazie a trattamenti chimici. Anche in questo caso quindi non è possibile affrontare il discorso in termini generali.

Di seguito sono presentate le principali fonti di estrazione e i possibili trattamenti per aumentare l’attività antibatterica nei casi in cui è stata riscontrata poco rilevante.

### 1.3 Fonte di estrazione

#### 1.3.1 *Sargassum crassifolium*

I polisaccaridi estratti da alghe brune, come ad esempio la *Sargassum crassifolium* che ha note proprietà antimicrobiche, sono detti “Laminarine”: essi rientrano nella famiglia dei BG per i legami  $\beta$  che uniscono tra loro i monomeri di glucosio.

Nello studio di Chamidah et al. [7] vengono realizzati test relativi all’attività antimicrobica su BG estratti con due apparecchiature diverse:

1. agitatore magnetico a piastra calda (HPMS), un dispositivo da laboratorio usato per ottenere miscele omogenee, composto principalmente da un contenitore con all’interno barrette metalliche rivestite in PTFE, poste in movimento da un magnete rotante. Il contenitore, solitamente in vetro per non influenzare il campo magnetico che è alla base del movimento delle barrette metalliche, è collocato sopra una piastra riscaldante per aumentare la temperatura della miscela, indebolire la parete cellulare e facilitare l’estrazione dei BG;
2. omogeneizzatore ad ultrasuoni, strumento da laboratorio costituito da un recipiente contenente la sospensione cellulare in cui è immersa una sonda metallica capace di emettere onde ultrasonore ad alta frequenza. La generazione di onde ultrasonore si basa sulla magnetostrizione, ossia il fenomeno per il quale un nucleo ferromagnetico inizia a vibrare ad elevate frequenze quando viene sottoposto ad un campo magnetico alternato: le onde ultrasonore generano cicli alternati di alta e bassa pressione, quindi di compressione ed espansione, portando alla generazione di bolle che collassano per cavitazione. Questo fenomeno altamente energetico porta alla lisi cellulare, agevolando la successiva fase di prelievo dei BG.

Dopo un primo step di rottura cellulare, i campioni ottenuti con modalità diverse sono stati trattati con acido solforico per ottenere un primo estratto, denominato dagli autori LAE, il cui residuo è stato trattato con acqua distillata per ricavare un secondo prodotto di estrazione, LME. Ai due campioni è quindi attribuito il suffisso “m” o “s” per distinguere le diverse procedure di lisi cellulare, rispettivamente quella con agitatore magnetico e quella con l’omogeneizzatore ad ultrasuoni.

Dato che il risultato della prima estrazione dopo l’omogeneizzazione ad ultrasuoni (LAEs) non presentava il caratteristico spettro infrarosso proprio di questo tipo di BG, ovvero l’“impronta digitale”, si è arrivati alla conclusione che quel tipo di separazione non porta ad avere BG, o una loro concentrazione sufficientemente elevata. Di conseguenza, sono state effettuate prove antimicrobiche solo sui restanti tre campioni, denominati “LAEm”, “LMEm” ed “LMEs”.

### 1.3.2 *Ganoderma lucidum*

Il *Ganoderma lucidum* è un fungo molto diffuso e consumato in Asia per le sue proprietà benefiche sull'organismo, come effetti antibatterici e antiproliferativi delle cellule tumorali, attribuite alla presenza di BG nel micelio. Purtroppo, però, sono state riscontrate delle difficoltà nell'utilizzo di questa tipologia di BG a causa della loro insolubilità, che ne ostacola la formulazione di prodotti farmaceutici e additivi in ambienti acquosi. Sembra inoltre esserci un legame tra solubilità e incremento delle proprietà antimicrobiche. [14, 15] Negli studi di Wan-Mohtar et al. [14] e Wang et al. [15] si cerca di superare i limiti correlati all'insolubilità rendendo i BG solubili tramite una reazione di solfatazione successiva all'estrazione.

#### 1.3.2.1 Solfatazione

La reazione di solfatazione prevede la sostituzione dei gruppi terminali, quali ad esempio i gruppi -OH presenti nella molecola di  $\beta$ -glucano, con il radicale solfato tramite reazione con acido solforico concentrato. Il risultato è un aumento dell'attività biologica, in particolar modo l'attività antimicrobica, ma anche un incremento della solubilità del composto, proprio grazie alle caratteristiche idrofile del radicale solfato e al riarrangiamento della struttura del  $\beta$ -glucano. Infatti, la presenza di gruppi ossidrilici nella struttura dei BG favorisce la formazione di legami idrogeno interni, che modellano la molecola dandole la forma di una tripla elica compatta e insolubile.

L'amplificazione di queste proprietà dipende dal *Degree of Sulphation* (DS), cioè dal grado di solfatazione: più il polisaccaride è in grado di legarsi ai radicali solfato, maggiore sarà il grado di sostituzione e la solubilità in acqua, mentre diminuirà il peso molecolare a causa delle condizioni della reazione stessa, che porteranno ad una degradazione della catena polisaccaridica. Il grado di solfatazione può essere calcolato a seguito di un'analisi elementare del composto tramite la seguente formula:

$$DS = \frac{72s}{32c}$$

Dove s e c rappresentano rispettivamente il rapporto in massa dello zolfo e del carbonio presenti nel composto solfata. [15, 16, 17]

Wang et al. [15] hanno sviluppato un processo di solfatazione eterogeneo dei BG che impiega una soluzione di reazione a base di n-propanolo e acido solforico in eccesso che danno luogo ad una reazione di esterificazione, mentre l'acido solforico in eccesso reagisce con la molecola di  $\beta$ -glucano come in Figura 1.6.

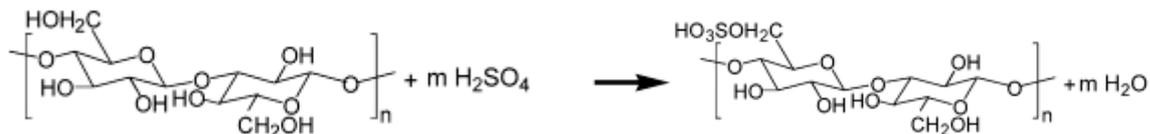


Figura 1.6: Reazione di solfatazione [14]

In questo modo sia il  $\beta$ -glucano iniziale che quello solfata sono insolubili nella soluzione di reazione dalla quale possono essere facilmente isolati tramite separazione solido-liquido

e la soluzione può essere riutilizzata semplicemente regolando la quantità di acido solforico. Successivamente le due tipologie di BG possono essere separate tramite sospensione in acqua e centrifugazione, in cui il sedimentato rappresenta i BG che non hanno reagito e quindi sono rimasti insolubili, mentre il surnatante viene raccolto e sottoposto a essiccamento.

Il punto di forza di questo processo di solfatazione, a differenza di altri, come quello sviluppato da Williams et al. e migliorato da Wan-Mohtar et al. [14], in cui si usa un processo omogeneo a base di dimetilsolfossido (DMSO) e urea, è che non vengono prodotte sostanze di scarto ed è quindi ecosostenibile. Questo vantaggio si paga però sia in termini di resa in solubilità, con un rapporto BG solubili/ BG iniziali pari a 37,4 (w/w) per Wang et al. [15] e pari a 87,5 (w/w) per Wan-Mohtar et al. [14], sia in termini di grado di solfatazione, rispettivamente pari a 0,36 e 0,9.

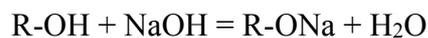
### 1.3.3 *Hordeum vulgare*

L'*Hordeum vulgare* altro non è che il comunissimo orzo alimentare, una specie molto ricca in BG, in particolar modo nei semi nudi, e dotata di attività biologica. Come visto precedentemente, questo tipo di attività dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche e strutturali del composto, ma possono essere incrementate tramite trattamento chimico: Song et al. [11] hanno modificato i BG estratti da orzo tramite carbossimetilazione e ne hanno testato l'attività antimicrobica contro il batterio *S. aureus*.

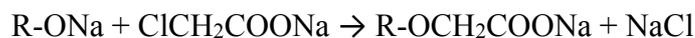
#### 1.3.3.1 Carbossimetilazione

La carbossimetilazione è una reazione a due step di alcalinizzazione ed eterificazione dei gruppi alcolici primari e/o secondari del polisaccaride, utilizzando acido cloroacetico e idrossido di sodio.

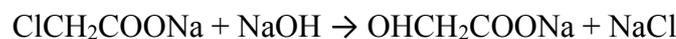
Nel primo passaggio l'idrossido di sodio reagisce con il gruppo -OH del  $\beta$ -glucano (R-OH) sostituendolo, tramite reazione di equilibrio, con un gruppo alcossido:



Nel secondo passaggio vengono aggiunti alla miscela acido cloroacetico e idrossido di sodio, che reagendo danno come prodotto il sale cloroacetato di sodio. A questo punto il  $\beta$ -glucano con il gruppo alcossido reagisce con il cloroacetato di sodio, ottenendo l'etere:



Esiste poi una reazione secondaria dovuta alla reazione tra cloroacetato di sodio e idrossido di sodio che dà come prodotto glicolato di sodio:

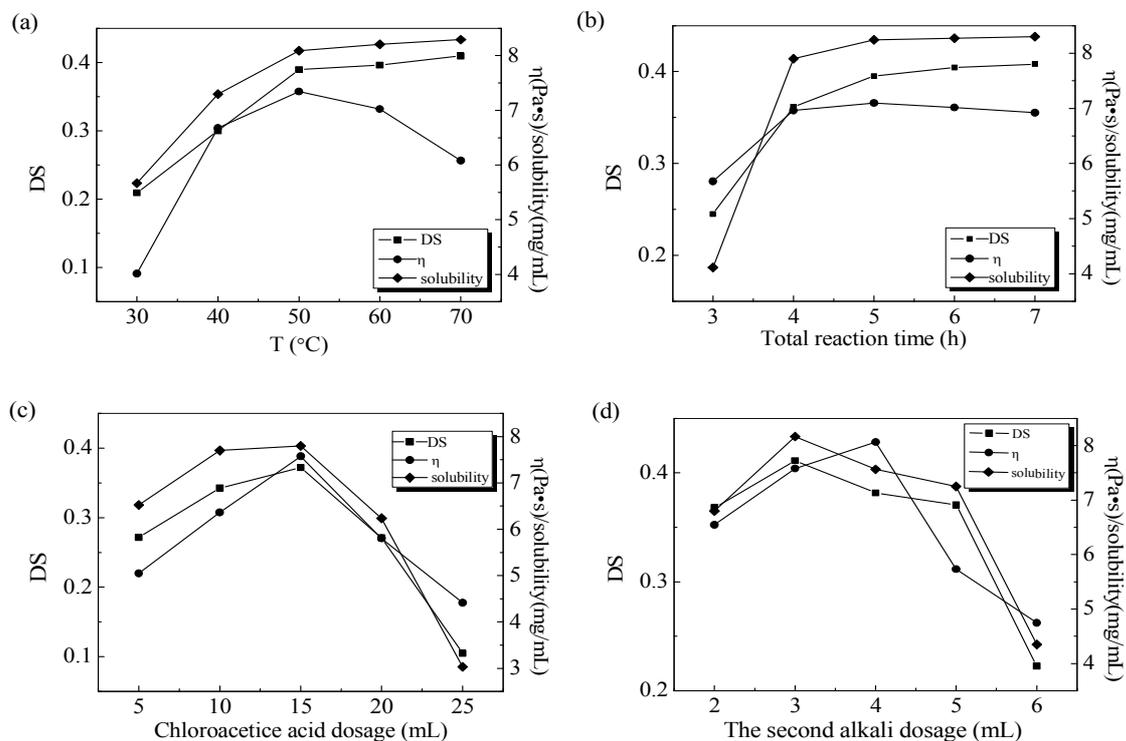


per cui, per migliorare la reazione principale e minimizzare la secondaria, Ding et al. [18] hanno sviluppato un metodo di ottimizzazione della carbossimetilazione di BG. Il punto di partenza è stata l'individuazione dei quattro parametri principali che potessero influenzare il grado di sostituzione, la viscosità e la solubilità: tali parametri sono temperatura e tempo di reazione e le quantità di acido cloroacetico e idrossido di sodio nel secondo dosaggio.

Nello specifico, il grado di sostituzione (DS) è stato calcolato tramite complessometria, usando EDTA come titolante tramite la seguente formula:

$$DS = \frac{162 w}{8100 - 80w}$$

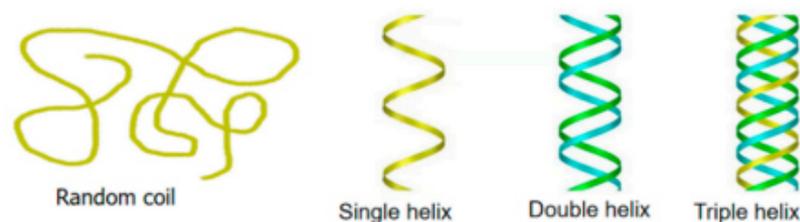
con  $w$  che rappresenta la quantità del gruppo  $-\text{CH}_2\text{COONa}$  presente. I risultati sperimentali sono mostrati in Figura 1.7.



**Figura 1.7:** Dipendenza di DS, viscosità e solubilità dalla temperatura, dal tempo di reazione e dalle quantità di acido cloroacetico e idrossido di sodio nel secondo dosaggio. [18]

Si osserva che, dalla posizione del valore massimo per ogni curva, le condizioni ottimali sono ottenute per una temperatura di  $50^{\circ}\text{C}$ , un tempo di reazione di 5h, 15 ml di acido cloroacetico e 3 ml di idrossido di sodio al 50% nel secondo dosaggio.

Si nota come l'andamento della solubilità segue quello del grado di sostituzione, a prova del fatto che i due parametri sono strettamente collegati. Infatti, all'aumentare di DS, la struttura dei BG cambia, partendo dalla tipica struttura a tripla elica, passando per una struttura a singola elica, fino ad arrivare ad una struttura casuale (Figura 1.8). [17, 18]



**Figura 1.8:** Possibili conformazioni dei BG

### 1.3.4 *Saccharomyces cerevisiae*

I BG estratti dal lievito *S. cerevisiae* sono i più usati nella formulazione di materiali per il

wound healing perché mostrano una migliore efficacia nella stimolazione del sistema immunitario: sono infatti presenti diversi studi su applicazioni *in vivo*, grazie anche alle loro proprietà fisiche e meccaniche che permettono la realizzazione di hydrogel e film. Molto scarse sono invece le informazioni sulla loro attività antimicrobica: in letteratura è presente un solo articolo [19] in cui si cerca di incrementare il potere antibatterico naturale dei BG sottoponendoli a trattamento con raggi  $\gamma$ .

#### 1.3.4.1 Trattamento con raggi $\gamma$

L'irradiazione con raggi  $\gamma$  è un trattamento che altera la struttura e le correlate proprietà chimico-fisiche dei BG, ma più in generale dell'elemento sul quale sono indirizzati. Al crescere della dose di radiazione, infatti, diminuisce il peso molecolare a causa di modifiche nella struttura primaria e al maggior numero di legami glicosidici spezzati (Figura 1.9); inoltre, come constatato più volte, ad un minor peso molecolare si accompagna una maggiore solubilità.

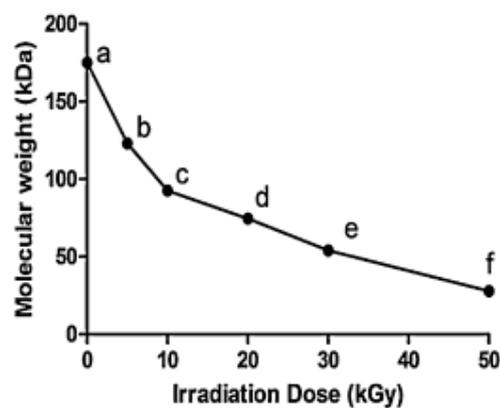


Figura 1.9: Effetto delle radiazioni  $\gamma$  sul peso molecolare [19]

Un altro vantaggio di questo trattamento è che, a differenza di quelli visti precedentemente, non comporta alcun cambiamento dei gruppi funzionali dei BG, ma solo una lunghezza inferiore della catena polisaccaridica e una diversa conformazione della struttura [17].

### 1.4 Effetto antimicrobico

Di seguito saranno discussi gli esiti delle prove antimicrobiche effettuate sui BG estratti dalle diverse fonti menzionate nei paragrafi precedenti.

#### 1.4.1 $\beta$ -glucani estratti da *Sargassum crassifolium*

Nello studio di Chamidah et al. [7] sono state svolte prove per determinare l'effetto antimicrobico solo sui tre campioni – LAEm, LMEm ed LMEs - a due diverse concentrazioni: 250 mg/ml, concentrazione identificata come MIC, e 375 mg/ml. Il campione denominato LAEs, invece, è stato scartato, come anticipato nel paragrafo 1.3.1

Ogni campione è stato sottoposto tre volte a test di diffusione con dischi da 6 mm di diametro, utilizzando acqua distillata come controllo negativo e un antibiotico commerciale ad ampio spettro d'azione, l'amoxicillina, come controllo positivo. L'esito è mostrato in

Tabella 1.1.

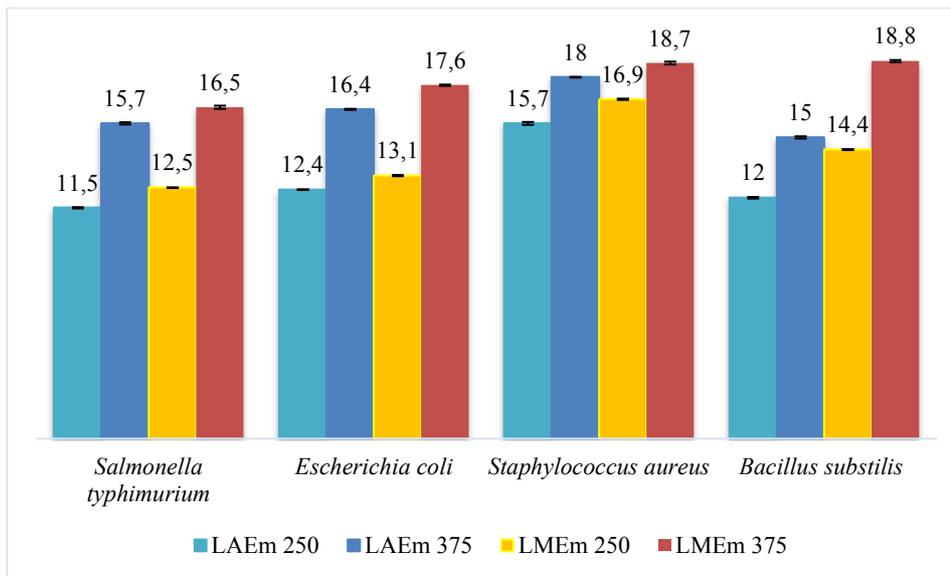
Nell'articolo di Monks et al. [20], citato anche nello studio di Chamidah et al. [7], si hanno a disposizione degli intervalli di riferimento attinenti al diametro della zona di inibizione, per analizzare in maniera critica i risultati sperimentali ottenuti, relativi all'attività antimicrobica:

- diametro < 7 mm: attività nulla;
- diametro 7-11 mm: attività debole;
- diametro 11-16 mm: attività modesta;
- diametro > 16 mm: attività forte.

**Tabella 1.1:** Zone di inibizione di batteri Gram (+) e Gram (-) [7]

Campione (mg/ml)	Diametro della zona di inibizione (mm)			
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus substilis</i>
Controllo (-)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
LMEs (250)	9.90±0.02	8.20±0.01	7.10±0.15	6.80±0.03
LMEs (375)	11.30±0.05	9.30±0.02	10.80±0.14	11.80±0.04
LAEm (250)	11.50±0.03	12.40±0.02	15.70±0.07	12.00±0.04
LMEEm (250)	12.50±0.02	13.10±0.03	16.90±0.03	14.40±0.02
LAEm (375)	15.70±0.05	16.40±0.02	18.00±0.02	15.00±0.05
LMEEm (375)	16.50±0.08	17.60±0.03	18.70±0.07	18.80±0.05
Controllo (+)	31.00±0.01	29.00±0.05	35.50±0.01	39.40±0.04

È stato dunque possibile dedurre che, indipendentemente dal tipo di estrazione e dal grado di purificazione, i campioni con una concentrazione maggiore di BG danno luogo a una zona di inibizione maggiore. Entrando più nel particolare, si evince che i campioni ottenuti tramite omogeneizzatore ad ultrasuoni hanno un'attività antibatterica decisamente debole, mentre quelli ottenuti con l'agitatore magnetico presentano dei risultati più rilevanti. Ciò può essere dovuto al fatto che l'azione sinergica tra energia meccanica e termica, risultato dell'impiego di un miscelatore e di una piastra riscaldante, sia più efficiente in termini di rottura cellulare rispetto alla sola cavitazione che si ha con gli ultrasuoni. Inoltre, nel caso dell'agitatore magnetico è possibile anche fare un confronto sulla base della maggiore o minore purezza dell'estratto: si nota infatti che i risultati inerenti alle due estrazioni consecutive mostrano un'attività maggiore, seppur leggermente, rispetto a quelli corrispondenti alla sola prima estrazione. Risulta chiaro quindi come l'attività antimicrobica dei BG sia dose-dipendente, cioè aumenta all'aumentare della quantità e della purezza dei BG stessi. Questa ipotesi è confermata dal fatto che l'attività maggiore, escludendo ovviamente quella relativa al controllo positivo, sia quella riguardante la seconda estrazione a concentrazione più alta riferita all'agitatore magnetico. In Figura 1.10 è riassunto l'andamento del diametro della zona di inibizione al variare della concentrazione di BG e della loro purezza.



**Figura 1.10:** Andamento dimensione zona di inibizione (mm)

Come detto precedentemente, una maggiore purezza influisce poco sull'aumento della zona di inibizione, tranne per il batterio *B. subtilis*, dove un incremento della purezza accresce la zona di inibizione del 20-25%. Per gli altri batteri, a parità di purezza, sono stati ottenuti valori di incremento dell'alone di inibizione minori del 10%.

Un altro punto su cui gli autori [7] pongono l'attenzione è la condizione per cui, nota la concentrazione e la purezza dei BG nel campione, si ha una risposta antimicrobica diversa in base all'appartenenza del batterio testato alla famiglia dei Gram (+) o dei Gram (-): facendo riferimento all'azione dell'amoxicillina, si evidenzia come l'attività dell'antibiotico sia più forte nei confronti dei batteri Gram (+). In generale, questo comportamento può nascere proprio dalla diversa struttura che caratterizza i due gruppi di batteri: come si è visto in precedenza, nonostante i batteri Gram (+) abbiano uno strato di peptidoglicano più spesso, che conferisce loro una maggiore rigidità rispetto ai Gram (-), quest'ultimi hanno un'ulteriore membrana lipopolisaccaridica che li protegge maggiormente dall'effetto degli antibiotici che agiscono proprio inibendo la sintesi di peptidoglicano della parete cellulare. Questo andamento è rispettato, in linea di massima, anche nel caso particolare dei BG, ad esclusione degli estratti da omogeneizzatore ad ultrasuoni, in cui si osserva un comportamento opposto, ma che comunque non costituiscono oggetto di interesse a causa dell'attività antimicrobica bassa.

Per determinare il valore di MBC si parte dal valore di MIC e si testa la vitalità dei microrganismi, aumentando la concentrazione di agente antimicrobico fino ad ottenere una popolazione microbica pari all'0,1% di quella iniziale [7]. Nel caso in esame questa percentuale corrisponde a 8 CFU.

Dalla Tabella 1.2 si deduce che i BG estratti con agitatore magnetico HPMS alla concentrazione di 250 mg/ml hanno un'azione non solo batteriostatica, ma anche battericida, dato che 8 CFU è il valore massimo raggiunto tra tutti e quattro i diversi ceppi batterici. I batteri Gram (-) sono quelli che mostrano una vitalità maggiore, poiché sono più resistenti agli antibiotici, come visto in precedenza.

In questo caso si osserva, inoltre, che una maggiore purezza dell'estratto riduce fortemente la vitalità delle colonie batteriche, dimezzando il numero di CFU, tranne nel caso del *B.*

*subtilis* in cui, invece, l'effetto rimane invariato, al contrario della reazione mostrata in termini di diametro di inibizione.

**Tabella 1.2:** Concentrazione Minima Battericida [7]

Campione (mg/ml)	Batteri			
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
LMEs (250)	17.0	17.0	11.0	9.0
LAEm (250)	8.0	6.0	4.0	3.0
LMEEm (250)	4.0	3.0	2.0	3.0

#### 1.4.2 $\beta$ -glucani estratti da *Ganoderma lucidum*

Wan-Mohtar et al. [15] hanno testato l'attività antimicrobica dei BG sottoposti a solfatazione (Tabella 1.3) contro due gruppi di batteri Gram (+) e Gram (-), avendo come controllo negativo dell'etanolo puro e come controllo positivo 30  $\mu$ g di gentamicina, un antibiotico ad ampio spettro, in modo tale che sia valido per entrambi i gruppi di batteri. Anche in questo caso è stato usato il metodo di diffusione del disco, con dischi dal diametro pari a 11 mm. I risultati delle prove antimicrobiche svolte sui BG non trattati non sono stati mostrati nell'articolo, a causa della bassissima attività rilevata. La Tabella 1.3 di seguito mostra pertanto i soli risultati relativi ai BG solfatati seguendo la procedura descritta alla sezione 1.3.2.1.

**Tabella 1.3:** Attività antimicrobica dei BG solfatati [15]

No./ G	Bacteria	GS							
		Diameter of inhibition zone <sup>b</sup> (mm)				MIC <sup>d</sup> mg/ml	MBC <sup>e</sup> mg/ml	GENT <sup>f</sup> 30 $\mu$ g	Ethanol <sup>f</sup> 100%
		200 mg/ml	300 mg/ml	400 mg/ml	500 mg/ml				
1 (G-)	<i>Escherichia coli</i> EPIC S17	22 $\pm$ 2.6	26 $\pm$ 1.2	29 $\pm$ 1.0	34 $\pm$ 3.2	3	10	19 $\pm$ 2.5	11.4 $\pm$ 0.1
2 (G-)	<i>Escherichia coli</i>	20 $\pm$ 1.5	22 $\pm$ 1.5	20 $\pm$ 1.1	24 $\pm$ 2.6	1	2	23 $\pm$ 3.1	11.3 $\pm$ 0.1
3 (G-)	<i>Shigella sonnei</i> 20071599	16 $\pm$ 1.0	21 $\pm$ 0.5	23 $\pm$ 2.1	25 $\pm$ 2.6	3	20	22 $\pm$ 1.5	11.4 $\pm$ 0.1
4 (G-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16 $\pm$ 1.0	20 $\pm$ 1.0	20 $\pm$ 0.5	23 $\pm$ 2.8	3	5	23 $\pm$ 1.1	11.2 $\pm$ 0.1
5 (G-)	<i>Salmonella enteritidis</i>	17 $\pm$ 1.5	20 $\pm$ 1.0	23 $\pm$ 1.0	27 $\pm$ 1.5	3	10	24 $\pm$ 2.5	11.1 $\pm$ 0.1
6 (G-)	<i>Salmonella</i> BA54 SL1344 (pSsaG)	20 $\pm$ 2.1	24 $\pm$ 1.5	26 $\pm$ 1.0	28 $\pm$ 0.5	3	5	28 $\pm$ 2.0	11.2 $\pm$ 0.1
7 (G+)	<i>Listeria monocytogenes</i>	26 $\pm$ 2.1	28 $\pm$ 1.0	30 $\pm$ 1.5	32 $\pm$ 1.0	3	8	34 $\pm$ 1.0	11.1 $\pm$ 0.1
8 (G+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	18 $\pm$ 1.0	20 $\pm$ 0.5	21 $\pm$ 2.3	26 $\pm$ 1.0	2	5	21 $\pm$ 1.0	11.1 $\pm$ 0.1
9 (G+)	<i>Staphylococcus epidermis</i>	22 $\pm$ 1.5	23 $\pm$ 4.0	28 $\pm$ 1.5	30 $\pm$ 1.0	5	10	27 $\pm$ 1.5	11.2 $\pm$ 0.1
10 (G+)	Methicillin-Susceptible- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 292123	22 $\pm$ 2.1	24 $\pm$ 2.0	27 $\pm$ 1.2	30 $\pm$ 3.1	3	10	25 $\pm$ 2.5	11.2 $\pm$ 0.1

Anche in questo caso l'attività antimicrobica dei BG è dose-dipendente nella quasi totalità dei campioni esaminati, dato che il diametro della zona di inibizione aumenta all'aumentare della concentrazione di BG.

Nonostante i valori di MIC siano molto più bassi rispetto a quelli riportati nella sezione precedente (Tabella 1.2), sono necessarie concentrazioni di due ordini di grandezza

superiori per ottenere zone di inibizione paragonabili a quella mostrata dalla gentamicina. I valori di MBC sono prevedibilmente più alti dei MIC, ma il loro rapporto è comunque inferiore a 4, indice del fatto che i BG solfatati hanno azione non solo batteriostatica, ma anche battericida. Questo discorso non vale però nel caso di *S. sonnei*, in cui il rapporto MBC/MIC è pari a 6,67.

Attualmente, gli studi sulla correlazione tra le modifiche strutturali dei BG e l'incremento dell'attività antimicrobica sono davvero pochi, perciò il meccanismo d'azione non è molto chiaro. Nell'articolo sopracitato [15] sono state avanzate delle ipotesi, quali ad esempio, come accennato prima, una correlazione tra solubilità e proprietà biologiche. Potrebbe anche incidere un minor peso molecolare dei BG solfatati, quindi una dimensione ridotta della molecola che ne migliora la penetrazione all'interno della parete batterica, o più in generale un diverso effetto sterico dovuto alla presenza del radicale solfato, che ne altera la conformazione spaziale.

### 1.4.3 $\beta$ -glucani estratti da *Hordeum vulgare*

Nello studio di Song et al. [11] i  $\beta$ -glucani estratti dall'orzo sono stati sottoposti a ultrafiltrazione su membrane a differenti cut-off (100 kDa, 50 kDa e 10 kDa), ottenendo quindi campioni con diverso peso molecolare e diversa purezza, denominati rispettivamente BG-2, BG-3 e BG-4. Il residuo a più alto peso molecolare è invece stato denominato BG-1 (Tabella 1.4).

**Tabella 1.4:** Purezza e peso molecolare delle frazioni di ultrafiltrazione [11]

Sample	Purity (%)	Molecular weight (kDa)
BG	97.42	248.90
BG-1	97.20	364.00
BG-2	97.65	88.00
BG-3	97.33	41.00
BG-4	96.02	17.20

Sia i quattro campioni ottenuti che il campione non trattato con ultrafiltrazione (BG) sono stati sottoposti a carbossimetilazione (CMG) ed è stata valutata l'attività antimicrobica, sia prima che dopo la reazione, contro il batterio Gram (+) *S. aureus*. Sono stati utilizzati 100  $\mu$ g/ml di ampicillina come controllo positivo e della soluzione fisiologica come controllo negativo, inoltre è stato testato anche un campione di  $\beta$ -glucani "standard" (Sigma-Aldrich). In questo caso, è stato usato il metodo di Oxford, con cilindri dal diametro di 4 mm.

Da Tabella 1.5 si nota che il  $\beta$ -glucano "standard" mostra l'attività antibatterica più debole tra quelle in esame, ad esclusione dei campioni BG-4 e CMG-4, che rappresentano i prodotti a più basso peso molecolare, i quali hanno un'attività del tutto trascurabile. Song et al. [11] avanzano due ipotesi sul meccanismo alla base dell'attività antimicrobica dei BG: essi sarebbero in grado sia di distruggere la membrana batterica, penetrandone all'interno, che di formare uno strato di polisaccaridi intorno al batterio, ostacolando lo scambio di sostanze con l'ambiente esterno.

**Tabella 1.5:** Attività antimicrobica contro *S. aureus* [11]

Sample	Inhibition diameters (mm)
BG-standard	2.28 ± 0.26 <sup>a</sup>
BG	8.37 ± 0.36 <sup>c</sup>
BG-1	5.73 ± 0.40 <sup>b</sup>
BG-2	13.17 ± 0.17 <sup>f</sup>
BG-3	9.43 ± 0.18 <sup>d</sup>
BG-4	—
CMG	12.17 ± 0.17 <sup>e</sup>
CMG-1	8.39 ± 0.33 <sup>c</sup>
CMG-2	19.37 ± 0.45 <sup>h</sup>
CMG-3	14.47 ± 0.48 <sup>g</sup>
CMG-4	—
Ampicillin <sup>a</sup>	20.08 ± 0.30 <sup>h</sup>

Analizzando anche gli altri esiti del test e tenendo presenti i risultati descritti in Tabella 1.4, si possono fare due considerazioni relative a:

- Purezza: un campione di  $\beta$ -glucani puro al 100% è meno efficace, in termini di attività antimicrobica, di uno con una purezza leggermente più bassa (97-98%), molto probabilmente perché i residui ancora presenti dopo l'estrazione e la purificazione, quali ad esempio proteine o altri polisaccaridi, non riducono il potere antimicrobico, ma anzi lo accentuano.
- Peso molecolare: se, come riscontrato precedentemente, un peso molecolare elevato si traduce in una scarsa solubilità e nell'incapacità di penetrare nella parete cellulare, un peso molecolare troppo basso porta comunque ad avere un potere antibatterico esiguo, perché diventa più difficile formare uno strato antimicrobico intorno al batterio.

Si può osservare infatti che la zona di inibizione più estesa è stata ottenuta, per entrambi i tipi di  $\beta$ -glucani con i campioni a peso molecolare compreso tra 50 kDa e 100 kDa, cioè BG-2 e CMG-2. In generale, i CMG hanno proprietà antimicrobiche migliori rispetto ai rispettivi BG e ciò potrebbe essere dovuto al fatto che il gruppo legato ai  $\beta$ -glucani, derivante dalla reazione di carbossimetilazione, ne aumenta la solubilità e, cambiandone la conformazione, permette che entrino più agevolmente nella parete cellulare. In particolare, CMG-2 è il campione che esibisce l'attività antimicrobica maggiore, con un diametro di inibizione molto vicino a quello dell'antibiotico di riferimento, anche se le quantità in gioco sono ben diverse: per le prove antibatteriche sono stati usati 40 mg/ml di BG contro i 100  $\mu$ g/ml di ampicillina, ma il valore di MIC è stato individuato a 20 mg/ml. Nello studio non si accenna al valore di MBC, quindi non è possibile valutare l'azione battericida dei  $\beta$ -glucani carbossimetilati.

#### 1.4.4 $\beta$ -glucani estratti da *Saccharomyces cerevisiae*

Nello studio di Khan et al. [19] dopo l'estrazione i campioni di BG sono stati posti in sacchi a doppio strato di polietilene e irradiati con l'isotopo <sup>60</sup>Co con dosi di 5, 10, 20, 30 e 50 kGy.

Successivamente, è stata testata l'attività antimicrobica contro batteri Gram (+) e Gram (-), utilizzando il test di diffusione del disco. I risultati sono riportati in Tabella 1.6.

**Tabella 1.6:** Diametro zona di inibizione al variare della dose di radiazione [19]

Irradiation dose (KGy)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella typhii</i>
0	1.12 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.50 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.04 <sup>a</sup>
5	1.39 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.43 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.43 ± 0.07 <sup>b</sup>
10	1.60 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.61 ± 0.10 <sup>bc</sup>	2.65 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.13 <sup>c</sup>	1.74 ± 0.06 <sup>bc</sup>
20	2.71 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.92 ± 0.09 <sup>c</sup>	2.85 ± 0.1 <sup>bc</sup>	1.80 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.94 ± 0.03 <sup>c</sup>
30	3.7 ± 0.13 <sup>d</sup>	2.63 ± 0.10 <sup>d</sup>	3.23 ± 0.25 <sup>c</sup>	2.41 ± 0.10 <sup>d</sup>	2.35 ± 0.2 <sup>d</sup>
50	4.13 ± 0.32 <sup>e</sup>	2.89 ± 0.05 <sup>d</sup>	3.88 ± 0.53 <sup>d</sup>	2.81 ± 0.10 <sup>e</sup>	2.70 ± 0.35 <sup>e</sup>
Positive control	9.06 ± 0.51 <sup>f</sup>	8.49 ± 0.21 <sup>e</sup>	7.98 ± 0.30 <sup>e</sup>	9.02 ± 0.47 <sup>f</sup>	8.25 ± 0.27 <sup>f</sup>

Il DMSO è stato preso come controllo negativo, mentre come controllo positivo è stato preso un antibiotico diverso e specifico per ogni batterio.

Seppur l'estensione della zona di inibizione aumenti al crescere della dose irradiata, l'attività antimicrobica rimane comunque molto scarsa: per esempio, prendendo come modello il batterio Gram (-) *E. coli*, si passa da un valore di 1,12 mm nel caso di BG non trattati, ad un massimo di 4,13 mm ottenuti con la dose più alta. Analogamente, per un batterio Gram (+) come *S. aureus*, con una dose irradiata di 50 KGy si ottiene un'estensione del diametro di inibizione pari a 2.89 mm.

Questi risultati, poco soddisfacenti, potrebbero essere dovuti ad una concentrazione di campione troppo bassa (10 mg/ml), probabilmente perché lo scopo degli autori dello studio era solo indagare quale fosse la risposta dei BG, in termini di attività antibatterica, in seguito ad un trattamento con raggi  $\gamma$ , e non valutare quale fosse la concentrazione ottimale per avere un'attività elevata. A conferma di ciò, anche la quantità di antibatterico di riferimento è molto bassa e nell'articolo non vengono individuati né MIC né MBC.

Se ci soffermiamo però sull'effetto che il trattamento con raggi  $\gamma$  ha sul peso molecolare, resta comunque un metodo potenzialmente interessante per aumentare il potere antimicrobico: da Figura 1.9 si nota infatti come già con solo 10 kGy si ottiene un peso molecolare medio (50 kDa < PM < 100 kDa), ideale per un'attività antibatterica rilevante. Il trattamento con raggi  $\gamma$  porta non solo alla rottura dei legami glicosidici all'interno della catena polisaccaridica, con conseguente riduzione del peso molecolare, ma causa anche una maggiore esposizione di gruppi funzionali quali -OH, C=O e C-H, migliorando proprietà come la viscosità e la solubilità [19].

Sono necessari quindi ulteriori studi che approfondiscano le qualità di questo trattamento, stabilendo MIC e MBC e la concentrazione tale che permetta di ottenere un potere antibatterico equiparabile a quello di un antibiotico commerciale.

## Capitolo 2: Proprietà dei film compositi a base di $\beta$ -glucani

### 2.1 Proprietà della medicazione ideale

La guarigione delle ferite è un processo biologico molto complesso poiché coinvolge cellule di diverso tipo, come i cheratinociti, i fibroblasti e le cellule del sistema immunitario, che partecipano al ripristino della matrice extracellulare. A seconda del tempo necessario alla guarigione, le ferite possono essere definite “acute” o “croniche”: le ferite acute, come ad esempio le lesioni chirurgiche, guariscono in media tra le 8 e le 12 settimane, in base alla profondità della ferita stessa; le ferite croniche, come ad esempio ustioni, ulcere e lesioni da pressione, non guariscono in un periodo di tempo ben definito e spesso non totalmente. [21, 22]

In generale, il processo di guarigione si suddivide in quattro fasi di diversa durata (Figura 2.1) [23]:

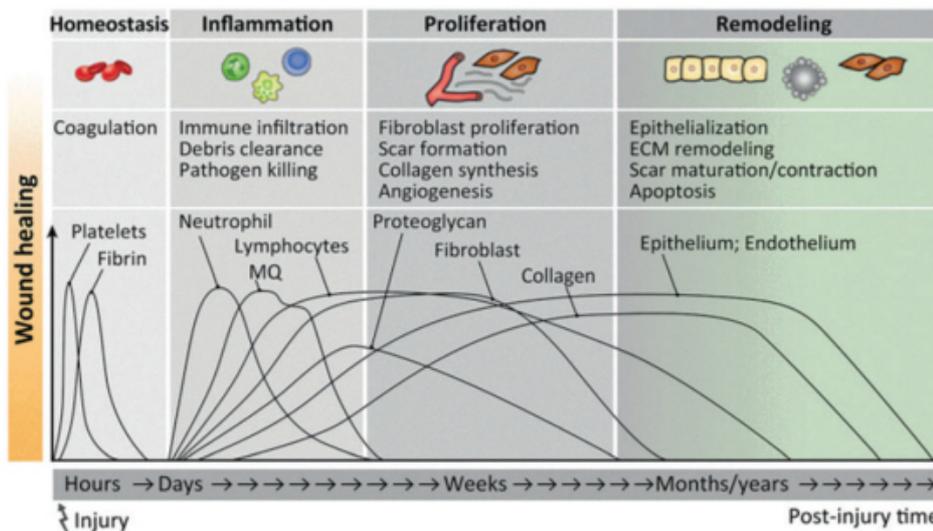


Figura 2.1: Processo di guarigione [23]

- Omeostasi: è la prima risposta difensiva che l'organismo mette in atto subito dopo la lesione e consiste nella formazione di un coagulo di piastrine e fibrina con lo scopo di bloccare la fuoriuscita di sangue, impedire l'infiltrazione di microrganismi e favorire l'ingresso dei neutrofilo e dei monociti.
- Infiammazione: i neutrofilo, richiamati dalle citochine prodotte dalle piastrine, si occupano della rimozione delle cellule morte e degli organismi estranei, mentre i monociti si differenziano in macrofagi che producono citochine e fattori di crescita che inducono la proliferazione di fibroblasti e cellule epiteliali nella zona della lesione.
- Proliferazione: in questa fase avviene la riepitelizzazione della ferita e la formazione delle proteine della matrice extracellulare.
- Rimodellamento: contrazione e cicatrizzazione della ferita e successivamente rigenerazione della pelle e delle sue funzionalità, ad eccezione delle ferite croniche.

Lo scopo della medicazione, o *wound dressing*, è quello di creare l'ambiente ottimale per una rapida guarigione della ferita ed è perciò necessario scegliere il materiale più adatto.

Per la cura di ferite, sia acute che croniche, si usano le “medicazioni avanzate”, materiali biocompatibili che proteggono dalle infezioni, favoriscono la chiusura della ferita e assorbono la giusta quantità di essudato, costituito da una miscela acquosa di proteine e cellule. Infatti, a differenza delle medicazioni classiche, composte principalmente da garze a contatto con la ferita, le medicazioni avanzate mantengono la ferita umida, in modo tale che il materiale non aderisca troppo alla cute e sia possibile rimuoverlo più facilmente e in maniera indolore. [22]

In generale, il dressing ideale deve avere le seguenti caratteristiche [23, 25, 26, 27]:

- Adeguate proprietà meccaniche, per adattarsi alla pelle del paziente e ai suoi movimenti, ma anche per proteggerlo dall’ambiente esterno. Deve essere quindi allo stesso tempo elastico e resistente alle sollecitazioni, con un basso modulo elastico, un’elevata resistenza alla trazione e un elevato allungamento a rottura.
- Controllo dell’umidità tramite l’assorbimento dell’essudato in eccesso e la permeabilità al vapore acqueo, per evitare sia la macerazione che l’essiccamento della ferita.
- Favorire la contrazione e riepitelizzazione della ferita

Altri fattori importanti sono:

- Atossicità
- Biodegradabilità
- Biocompatibilità
- Attività antimicrobica
- Economicità

Attualmente, non esiste una medicazione avanzata che sia adatta a seguire il decorso della ferita in tutte le sue fasi, ma deve essere selezionata quella più appropriata in base alle proprietà che la caratterizzano, in particolar modo la capacità di trattenere e rilasciare il giusto quantitativo di umidità [23]:

- per ferite secche e necrotiche sono usati hydrogel composti al 90% di acqua, che rilasciano nel tessuto reidratandolo, con il rischio di macerazione della ferita e lo svantaggio di avere scarse proprietà meccaniche;
- per ferite superficiali e con poco essudato sono usati film semipermeabili in poliuretano, che offrono elevata resistenza meccanica, infatti sono spesso usati come medicazioni secondarie, favoriscono il passaggio di ossigeno e vapore acqueo e danno la possibilità di controllare visivamente l’evoluzione della ferita grazie alla loro trasparenza;
- per ferite essudative sono usati gli idrocolloidi sotto forma di schiume, fibre o fogli, che a contatto con la ferita formano un gel assorbente e protettivo contro la proliferazione batterica; lo svantaggio è la possibilità di sviluppare reazione allergiche, in particolare con le schiume in poliuretano, a causa della loro composizione.

In questo capitolo sarà studiato l’andamento delle proprietà più rilevanti per una medicazione, al variare della concentrazione dei BG.

## **2.2 Formulazione dei film**

In letteratura esistono diverse procedure per ottenere film composti sia da soli BG che combinati con altre sostanze, come ad esempio pullulano, amido di mais, alcol polivinilico (PVA) o nanoparticelle (NPs) di ZnO [28, 29, 30, 31, 32].

La procedura adottata da Chang et al. [28] e Sagnelli et al. [29], seppur con qualche differenza, prevede la preparazione di una soluzione acquosa contenente rispettivamente

1,5% [28] e 2% [29] in peso di BG, a cui è stata aggiunta una quantità di glicerolo pari al 23%, 30% o 33% rispetto al peso secco dei BG stessi [28, 29]. In seguito, la soluzione è stata denaturata a 80 °C per 2 h [28] o a 95°C per 1 h [29], mantenendo un'agitazione costante, e subito dopo raffreddata e colata in dischi di polistirene [28] o in Petri ricoperte di teflon [29]. Infine, i film sono stati essiccati in stufa a 35 °C per 10 h [28] o a 60 °C fino a completa asciugatura [29].

Lo step di denaturazione termica, volto ad aumentare la solubilità dei BG, non è stato adottato in tutti gli studi.

Novak et al. [30] hanno formulato un film partendo da una soluzione acquosa con una concentrazione in BG corrispondente ad una densità superficiale di 10 mg/cm<sup>2</sup>, alla quale è stato aggiunto il 25% in peso di glicerolo rispetto al contenuto di BG; successivamente, la soluzione è stata colata in dischi di metallo e i film sono stati essiccati in stufa a 65 °C per 2 h.

Azari et al. [31] hanno impiegato, invece, una procedura diversa per la realizzazione di un film ibrido di gelatina e BG. In primo luogo, la soluzione di partenza è composta da 4g di gelatina, disciolti in 100 mL di acqua distillata, tenuta sotto costante agitazione a 45 °C per 30 minuti, a cui sono stati addizionati 2 mL di glicerolo. A seguire, sono stati preparati 50 mL di sospensione di ZnO NPs in acqua, con concentrazione pari a 2,5% e 5% rispetto al peso secco della soluzione finale, da aggiungere a 50 mL di soluzione di gelatina, miscelata poi per 30 minuti a 600 rpm. A 70 mL di soluzione di gelatina o gelatina e ZnO NPs, sono stati aggiunti 30 mL di soluzione acquosa di BG, con una concentrazione pari a 10% e 20% in peso secco rispetto alla soluzione finale. Infine, sono stati colati 80 mL di soluzione finale in piastre di polipropilene e i film sono stati essiccati in stufa a 40 °C per 24 h. In Tabella 2.1 sono riassunte le concentrazioni in peso di gelatina, BG e ZnO NPs nei diversi film.

**Tabella 2.1:** Concentrazioni di gelatina, BG e ZnO NPs [31]

Sample code	Gelatin (%)	β-Glucan (%)	ZnONPs (%)
G	100	0	0
G/βG10%	90	10	0
G/βG20%	80	20	0
G/ZnONPs2.5%	97.5	0	2.5
G/βG10%/ZnONPs2.5%	87.5	10	2.5
G/βG20%/ZnONPs2.5%	77.5	20	2.5
G/ZnONPs5%	95	0	5
G/βG10%/ZnONPs5%	85	10	5
G/βG20%/ZnONPs5%	75	20	5

Huang et al. [32] hanno formulato un film privo di glicerolo, partendo da una soluzione acquosa al 16% in peso di PVA, denaturata a 90 °C per 2 h, a cui sono state aggiunte diverse concentrazioni in volume di BG, fino ad un massimo del 60%. La miscela è stata depositata su un film di polietilenterefalato ed essiccata usando una spalmatrice a rullo, tenuta alla temperatura di 110 °C per 3 minuti, ottenendo un film con uno spessore di 30 μm.

I film ottenuti, seppur con procedure differenti, sono accomunati dallo stesso meccanismo di formazione, basato sulla creazione di legami idrogeno tra i BG e gli altri componenti

solubili del film quali glicerolo, gelatina, pullulano e PVA. La presenza di questo tipo di legame è stata valutata nei diversi studi tramite i metodi per la caratterizzazione dei film, in particolare attraverso la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e la spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIR).

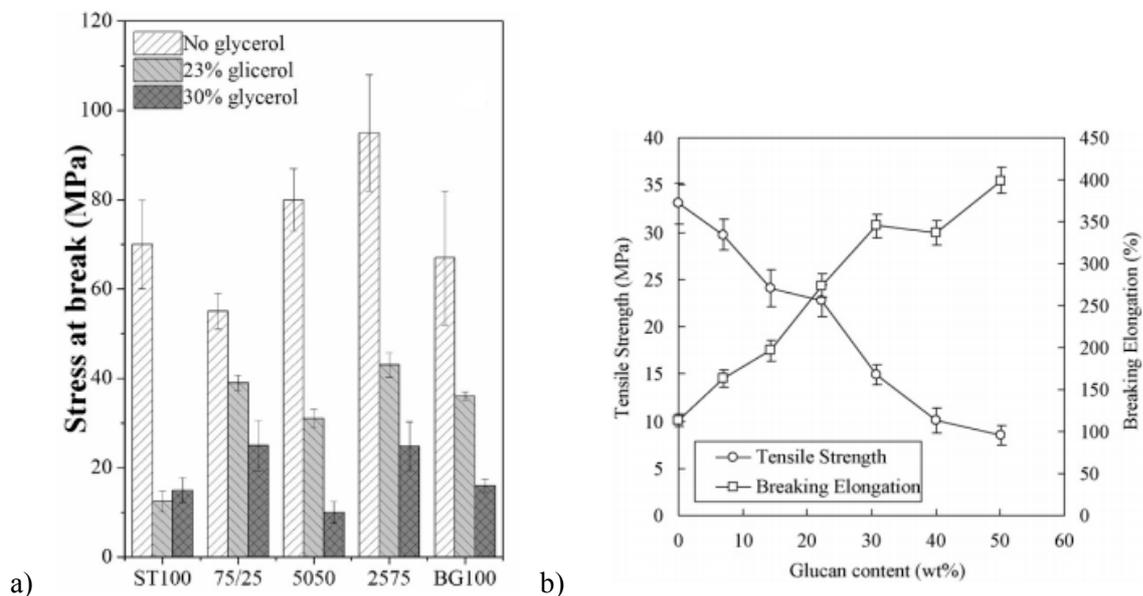
## 2.3 Proprietà meccaniche

### 2.3.1 Resistenza a trazione

La prova di trazione è un esame distruttivo, dove il provino viene sottoposto a carico costante fino a rottura: il valore massimo di carico che un materiale riesce a sopportare prima di rompersi è definito “resistenza a trazione”.

Lo studio di Sagnelli et al. [29] sulla formulazione di un film bioplastico composto da amido di mais e BG a diverse percentuali, mostra come un film composto da BG con una purezza al 73% presenta un valore di resistenza a trazione pari a circa 70 MPa, simile a quello del policarbonato. L’andamento di questa proprietà cambia in base alla sostanza che si combina ai BG: l’aggiunta di glicerolo diminuisce il valore di resistenza a trazione da due a quattro volte, in base alla quantità di glicerolo stesso. Questa tendenza è probabilmente dovuta all’azione plastificante del glicerolo, che può formare volumi vuoti all’interno della struttura e ridurre così la robustezza del film. Nel caso dell’amido di mais invece la massima forza di trazione aumenta per valori superiori al 50% di concentrazione di BG (Figura 2.2a).

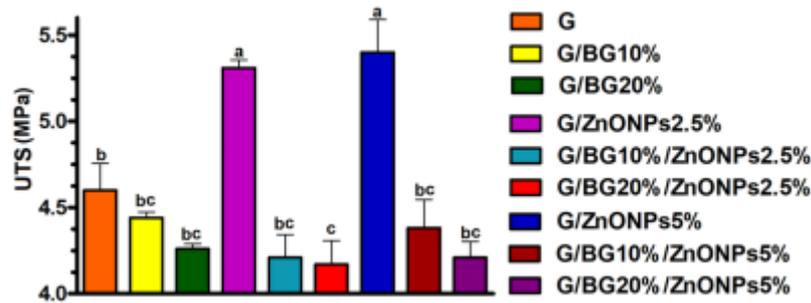
Huang et al. [32] hanno invece studiato le proprietà di film composti da PVA e BG, notando che all’aumentare del contenuto di BG diminuisce la resistenza a trazione, passando da 33 MPa a 8,5 MPa, rendendo così il film meccanicamente più debole (Figura 2.2b).



**Figura 2.2:** Resistenza a trazione di a) un film di amido e BG con l’aggiunta di glicerolo [29]; b) un film di PVA e BG [32]

Azari et al. [31] hanno studiato le proprietà di un film composto da gelatina e BG, incorporato con ZnO NPs. Anche in questo caso la presenza dei BG riduce, anche se di

poco, la resistenza a trazione sia del film in gelatina che dei film con diversa percentuale di ZnO NPs (Figura 2.3).



**Figura 2.3:** Resistenza a trazione di film composti da gelatina, BG e ZnO NPs. Le diverse lettere indicano una differenza significativa al livello del 5% nel test di Duncan ( $p < 0,05$ ) [31]

In entrambi gli studi, la riduzione della resistenza a trazione non costituisce un problema poiché i valori ottenuti sono dello stesso ordine di grandezza di quelli di un film in poliuretano usato per il wound dressing [33] e maggiori di quelli di tipiche medicazioni in schiuma di poliuretano [34] o hydrogel, i quali hanno una resistenza a trazione molto bassa, con valori compresi tra 4 e 220 kPa [35].

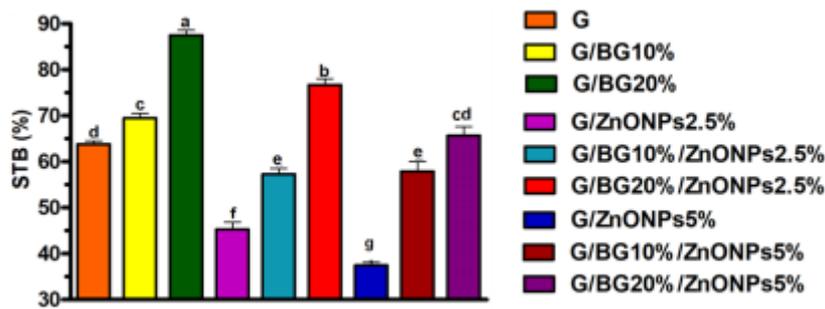
### 2.3.2 Allungamento a rottura

Durante una prova di trazione il provino subisce un'estensione lineare a causa della sollecitazione applicata. L'allungamento ottenuto può essere di tipo elastico, se il provino torna alla forma originale una volta rimosso il carico, o di tipo plastico, se la deformazione permane. L'allungamento che si ottiene con l'applicazione del carico massimo che porta il provino a rompersi è detto "allungamento a rottura".

Nello studio di Sagnelli et al. [29], il film composto principalmente da BG mostra un comportamento fragile, con una deformazione trascurabile prima della rottura. La situazione cambia con l'aggiunta di glicerolo, che rende il materiale più duttile, mentre rimane quasi inalterata combinando BG e amido di mais.

Come si può notare invece da Figura 2.2b, l'allungamento a rottura di un film in PVA e BG ha un incremento di quasi il 300%, ottenendo un materiale molto più malleabile e con una percentuale di allungamento a rottura comparabile con quella di schiume in poliuretano in commercio [34].

Anche nel caso del film di Azari et al. [31], l'aumento della percentuale di BG migliora l'elasticità del film, soprattutto se comparato con quello composto da gelatina e ZnO NPs (Figura 2.4).



**Figura 2.4:** Allungamento a rottura del film di gelatina, BG e ZnO NPs [31].

Questo comportamento potrebbe essere spiegato dal fatto che le ZnO NPs interagiscono con la matrice di gelatina riducendo la mobilità delle catene polimeriche e ottenendo così un film più rigido, ma evidentemente l'affinità tra BG e gelatina è molto alta e porta comunque ad avere un film più plastico, analogamente al caso BG/glicerolo [31, 32].

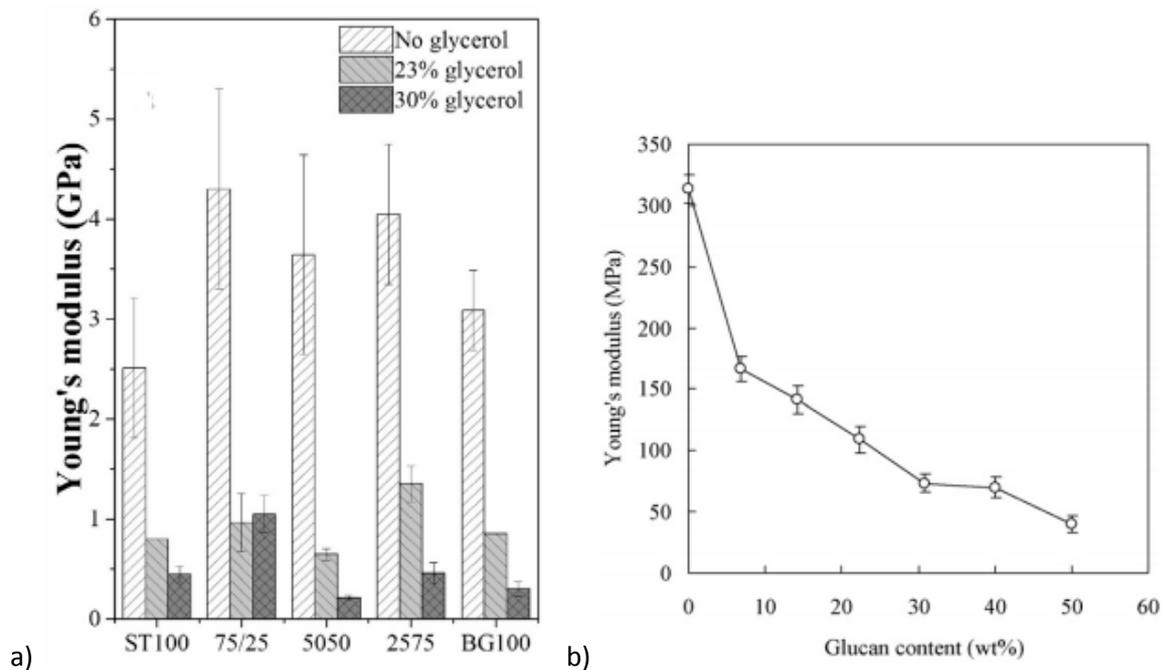
I valori ottenuti sono comunque confrontabili con quelli richiesti per una medicazione avanzata, come ad esempio un film in poliuretano [33] e simili a quelli della pelle umana, che ha un'elasticità che può variare tra il 70% e il 100% [35].

### 2.3.3 Modulo elastico

Il modulo elastico (E), o modulo di Young, è calcolato, a seguito di una prova di trazione, come il rapporto tra lo sforzo applicato e la deformazione ottenuta e indica quindi la propensione del materiale ad essere allungato o compresso, per poi tornare alla forma originale una volta rimosso il carico. Graficamente rappresenta la pendenza della retta sul diagramma sforzo-deformazione, perciò è facile intuire come ad elevati valori di modulo elastico corrispondano materiali meno deformabili.

Un film composto totalmente da BG [29] si presenta come un materiale rigido, con modulo elastico pari a circa 3 GPa, valore che diminuisce di un ordine di grandezza con l'aggiunta di glicerolo. La combinazione tra amido di mais e BG fornisce film con valori di modulo elastico maggiori rispetto a quelli composti totalmente da solo amido o BG, ma non si nota un andamento costante (Figura 2.5a).

Nel caso del film in PVA [32], il modulo elastico diminuisce all'aumentare della concentrazione di BG (Figura 2.5b), rendendo così il materiale più flessibile: con una concentrazione pari a circa il 50% di BG si ottiene un modulo di Young pari a 40 MPa, valore simile a quello della pelle [35].



**Figura 2.5:** Modulo elastico di a) un film di amido e BG con l'aggiunta di glicerolo [29]; b) un film di PVA e BG [32]

I valori di resistenza a trazione, allungamento a rottura e modulo elastico mostrano come la miscela BG/PVA sia un materiale più flessibile ed elastico rispetto al PVA. Ciò può essere attribuito ai legami intermolecolari e alla diversa forma delle due molecole: la struttura ramificata del  $\beta$ -glucano interferisce con la linearità delle molecole di PVA, creando vuoti che riducono la resistenza meccanica del composto, rendendolo però più duttile [32].

Non abbiamo dati sul modulo elastico del film di gelatina, BG e ZnO NPs, ma osservando gli andamenti di resistenza a trazione e allungamento a rottura è ragionevole supporre che aumentando la percentuale di BG diminuisca il modulo di Young.

### 2.3.4 Resistenza a compressione

Analogamente alla resistenza a trazione, anche la resistenza a compressione è una proprietà che si studia tramite una prova distruttiva in cui il provino viene compresso in maniera monoassiale fino a rottura.

Matsumoto et al. [36] hanno sintetizzato degli hydrogel composti da BG, usando glicole etilenico diglicidil etere (EGDGE) come reticolante e acqua distillata per il lavaggio. In seguito, hanno sottoposto i campioni a prove di compressione per valutarne la resistenza, la deformazione a rottura e la capacità di recuperare la forma originale alla fine della prova. In Tabella 2.2 sono presentati i risultati al variare del contenuto di EGDGE, di BG e del loro peso molecolare.

**Tabella 2.2:** Modulo elastico, resistenza a compressione e deformazione a rottura degli hydrogel.  
ND = non rilevato [36]

Glucan hydrogel		Glucan (g)	EGDGE (mL)	Elastic modulus (kPa)	Compression strength (kPa)	Strain at break (%)
LMW-1,3- $\beta$ -D-glucan	1	2.0	0.5	12 $\pm$ 1.3	600 $\pm$ 330	94 $\pm$ 6.4
	2	2.0	1.0	8.3 $\pm$ 1.1	410 $\pm$ 51	92 $\pm$ 2.0
	3	2.0	2.0	5.3 $\pm$ 0.4	88 $\pm$ 8.3	76 $\pm$ 0.7
	4	3.0	0.5	15 $\pm$ 3	1010 $\pm$ 56	ND
	5	3.0	1.0	19 $\pm$ 2	348 $\pm$ 130	80 $\pm$ 3
	6	3.0	2.0	14 $\pm$ 2.0	180 $\pm$ 57	71 $\pm$ 3.2
HMW-1,3- $\beta$ -D-glucan	1	1.0	0.5	3.5 $\pm$ 0.3	730 $\pm$ 140	ND*
	2	1.0	1.0	2.7 $\pm$ 0.4	456 $\pm$ 123	ND*
	3	1.0	2.0	1.4 $\pm$ 0.1	66 $\pm$ 26	90 $\pm$ 4.2
	4	2.0	0.5	12 $\pm$ 2	861 $\pm$ 27	95 $\pm$ 0.3
	5	2.0	1.0	8.6 $\pm$ 0.5	270 $\pm$ 36	87 $\pm$ 0.5
	6	2.0	2.0	10 $\pm$ 1.0	56 $\pm$ 26	67 $\pm$ 4.8
	7	3.0	0.5	11 $\pm$ 6.0	700 $\pm$ 130	90 $\pm$ 1.0
	8	3.0	1.0	19 $\pm$ 2.3	170 $\pm$ 70	72 $\pm$ 5.0
	9	3.0	2.0	28 $\pm$ 4.3	109 $\pm$ 24	61 $\pm$ 3.3

Si può osservare un andamento decrescente delle proprietà meccaniche all'aumentare del volume di reticolante, che quindi rende l'hydrogel più elastico ma meno resistente a compressione e con una deformazione a rottura minore, mentre un minor contenuto di BG rende i film meno resistenti, ma più deformabili. Non si notano invece sostanziali differenze tra l'utilizzo di BG a peso molecolare minore ( $10^5$  Da) o maggiore ( $10^6$  Da), tranne una migliore resistenza a compressione già a basse concentrazioni di BG ad elevato peso molecolare. Anche il grado di recupero dell'altezza del campione cilindrico alla fine della prova di compressione è molto simile: 90% nel caso dei BG a basso peso molecolare, 98% nel caso dei BG a più elevato peso molecolare [36]. Matsumoto et al. [36] hanno ipotizzato che il motivo delle caratteristiche meccaniche leggermente migliori dei BG a maggior peso molecolare sia dovuto al fatto che le loro catene polimeriche siano molto intricate già a basse concentrazioni e che quindi siano più facilmente portati a deformarsi e a recuperare la propria forma originale rispetto ai BG a più basso peso molecolare.

Tutti gli hydrogel testati hanno comunque le caratteristiche ottimali per essere impiegati nel wound dressing: in letteratura sono infatti riportati casi di hydrogel con resistenza a compressione compresa tra 0.04 MPa e 3.73 MPa e deformazione a rottura del 40-95% [35].

## 2.4 Controllo dell'umidità

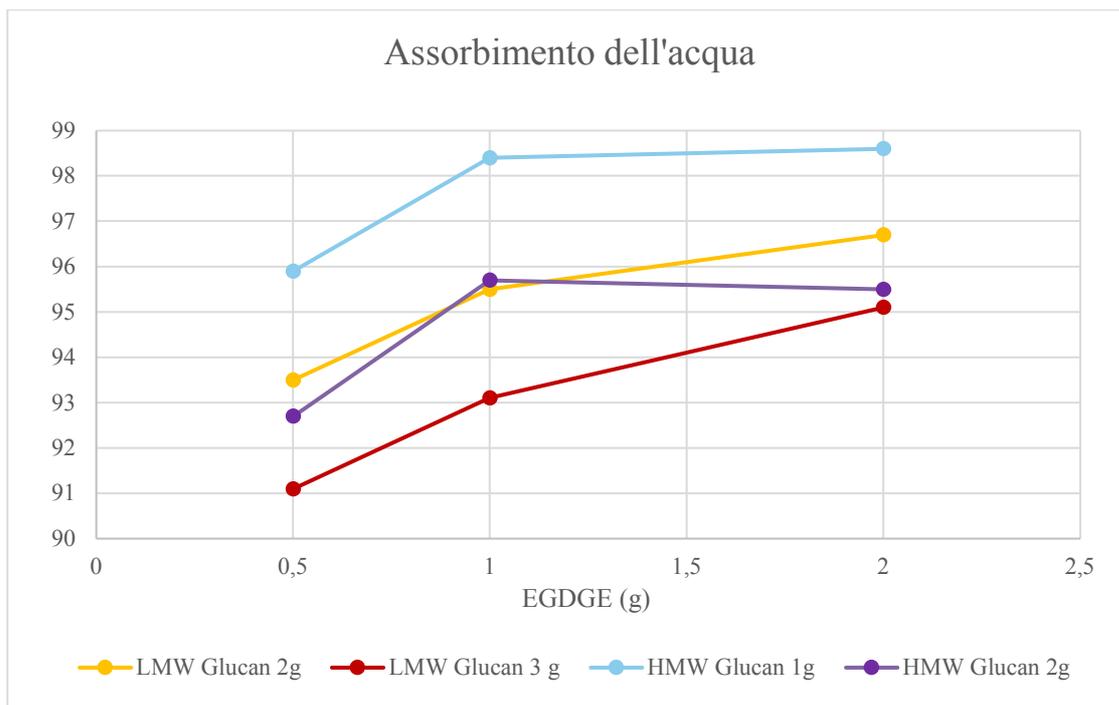
### 2.4.1 Assorbimento dell'acqua

La capacità di assorbire l'acqua è una caratteristica importante nella valutazione di un dressing, poiché si traduce nella possibilità di controllare la presenza di essudato, creando un ambiente umido e favorevole alla proliferazione delle cellule epiteliali [37]. Si calcola come:

$$\text{Assorbimento dell'acqua (\%)} = \left( \frac{W_w - W_d}{W_w} \right) \times 100$$

con  $W_d$  e  $W_w$  che rappresentano rispettivamente il peso del campione secco e del campione immerso in acqua, dopo averne eliminato l'eccesso con carta assorbente.

Matsumoto et al. [36] hanno sottoposto a essiccamento i campioni di hydrogel formati da BG e glicole etilenico diglicidil etere (EGDGE) e hanno misurato il quantitativo di acqua assorbita durante il lavaggio, constatando come questa capacità variasse in funzione della quantità di reticolante, della concentrazione e del peso molecolare dei BG (Figura 2.6).



**Figura 2.6:** Assorbimento dell'acqua di hydrogel composti da BG a diverso peso molecolare in funzione della quantità di reticolante [36]

Si nota come la percentuale di acqua assorbita aumenti inizialmente con il contenuto di EGDGE, per poi continuare a crescere nei campioni con BG a basso peso molecolare e rimanere pressoché costante o diminuire leggermente nei campioni con BG ad elevato peso molecolare, presentando un comportamento opposto rispetto a quello tipico evidenziato negli studi su hydrogel reticolati [36]. Matsumoto et al. hanno supposto che la causa di questo andamento anomalo sia da ricercare nella conformazione stessa del reticolo: un quantitativo basso di reticolante ha una scarsa influenza sulla struttura dei BG, che mantengono quindi inalterata la loro insolubilità iniziale dovuta ai legami intermolecolari; aumentando il contenuto di EGDGE invece, i legami intermolecolari sono ostacolati dalla presenza del reticolante stesso, che allontana le catene polimeriche impedendo la formazione dei legami idrogeno, responsabili della struttura compatta e idrofoba dei BG. Un quantitativo elevato di reticolante può però rendere il polimero più coeso, condizione che, unita ad un elevato peso molecolare, porta il campione ad essere meno idrofilo e ad assorbire meno acqua, come accade nel caso dei BG con dimensione maggiore.

Da Tabella 2.3 è possibile osservare come l'aggiunta del 10% di BG al film di gelatina e ZnO NPs diminuisca di poco la capacità di assorbimento dell'acqua e che in generale la presenza di BG nel film sia poco influente in termini di controllo dell'umidità. Confrontando però i valori ottenuti con quelli specifici di diversi dressing commerciali, si nota che la capacità di assorbimento è dello stesso ordine di grandezza di quella di un idrocolloide e di un hydrogel, sebbene i valori siano quasi dimezzati.

**Tabella 2.3:** Capacità di assorbimento dell'acqua dei diversi dressing. \*valore medio

Nome	Tipo di dressing	Assorbimento dell'acqua (%)	Riferimento
G/ZnONPs2.5%	Film	31.79±1.22	[31]
G/βG10%/ZnONPs2.5%	Film	30.28±1.50	[31]
G/βG20%/ZnONPs2.5%	Film	30.30±0.82	[31]
Opsite	Film in poliuretano	0.8	[32]
Allevyn	Schiuma in poliuretano	646 ± 18	[38]
Neoderm	Idrocolloide	56.54±6.27*	[39]
Neoheal	Hydrogel	65.5*	[40]

### 2.4.2 Swelling ratio

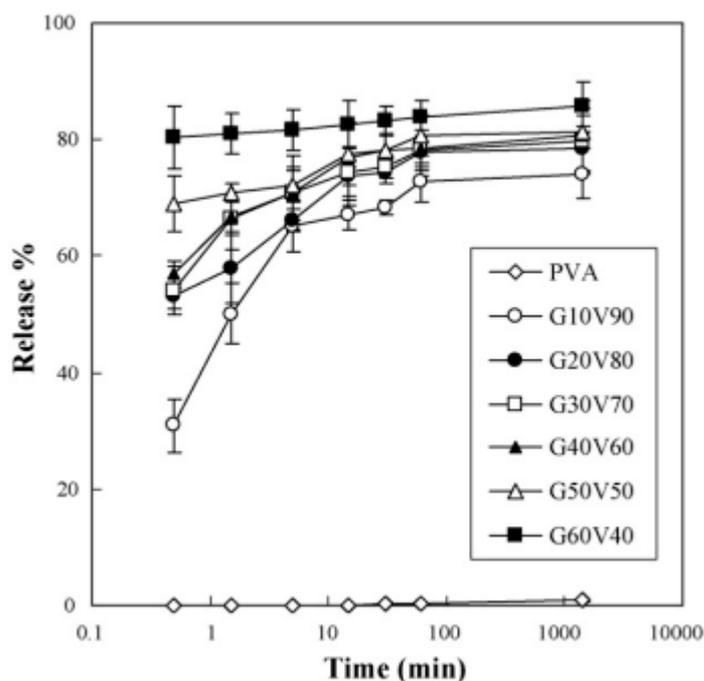
Spesso l'assorbimento dell'acqua è calcolato in termini di rapporto di rigonfiamento, o *swelling ratio*, definito come "l'aumento del peso del materiale dovuto all'assorbimento dell'acqua" [41]:

$$Swelling\ ratio = \frac{W_w}{W_d}$$

con  $W_d$  e  $W_w$  che rappresentano rispettivamente il peso del campione secco e del campione immerso in acqua, come visto precedentemente nella formula dell'assorbimento dell'acqua. Secondo Huang et al [32] l'accrescimento del rapporto di rigonfiamento in un film in PVA è direttamente proporzionale all'incremento della concentrazione di BG, passando da un valore di 1.18 nel film in PVA a 1.51 nel film con il 50% wt di BG. Questo aspetto influenza anche la capacità del film di rilasciare BG, la quale aumenta all'aumentare della concentrazione dei BG stessi. La prova è stata effettuata immergendo un campione di film, già sottoposto a swelling, in una soluzione salina fisiologica e misurando a intervalli stabiliti la percentuale di rilascio calcolata come:

$$Rilascio\ (\%) = \left( \frac{W_{G0} - W_{Gt}}{W_{G0}} \right) \times 100$$

Dove  $W_{G0}$  e  $W_{Gt}$  rappresentano rispettivamente la massa di BG all'inizio del test e dopo un certo intervallo di tempo. La percentuale di rilascio è stata normalizzata sulla base del peso di ogni film, perciò al tempo  $t = 0$ , prima di essere immersi nella soluzione salina, tutti i campioni avevano lo stesso peso. Al tempo  $t = 0,5$  min è stato misurato un rilascio pari al 30% per il film a minor percentuale di BG (circa il 7%) e pari all'80,5% nel caso di film composto al 50% wt. da BG; dopo 90 minuti la situazione si è assestata intorno a valori compresi tra il 75% e l'85% seguendo sempre un andamento crescente e dipendente dalla quantità di β-glucano stesso (Figura 2.7).

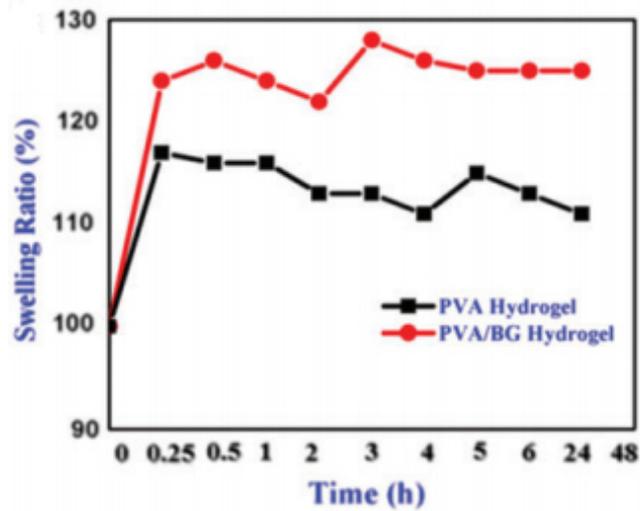


**Figura 2.7:** Andamento del rilascio di BG nel tempo. G =  $\beta$ -glucano; V = PVA. [31]

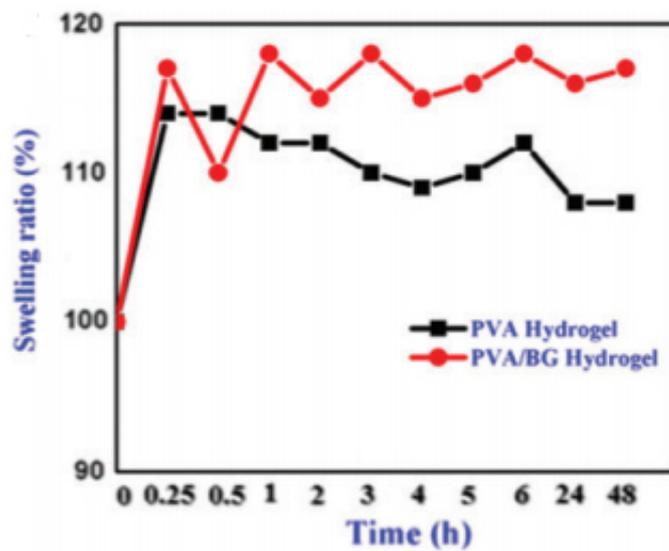
Misure analoghe di swelling ratio sono state ottenute anche da Muthuramalingam et al. [42], che hanno formulato un hydrogel in PVA e BG con rapporto volumetrico 1:1 e hanno studiato l'evoluzione nel tempo del rapporto di rigonfiamento in percentuale dovuto all'assorbimento di acqua a diverse condizioni: in acqua distillata (Figura 2.8a) si raggiungono valori di swelling ratio che oscillano tra 120% e 130% e in generale maggiori di quelli che si ottengono in una soluzione salina (Figura 2.8b). In entrambi i casi l'hydrogel in PVA e BG ha uno swelling ratio superiore a quello di un hydrogel in PVA.

In Figura 2.8c è invece mostrato l'effetto del pH sul rapporto di rigonfiamento: si può notare che se per valori di pH che variano da leggermente acido a neutro si hanno valori di swelling ratio compresi tra 100% e 150%, per una soluzione con pH pari a 9 si ha un incremento del grado di swelling pari a circa 4 volte il peso originale del campione.

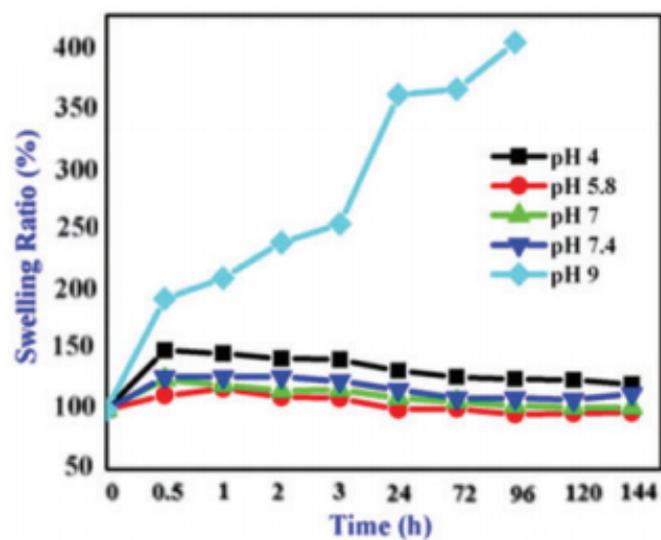
Questa caratteristica rende l'hydrogel in PVA e BG un'ottima medicazione per le ferite infette, le quali hanno un essudato basico, garantendo così un'elevata efficienza di assorbimento e continuando a mantenere un ambiente umido nella ferita [42]. I valori di swelling ratio ottenuti in entrambi gli studi sono inoltre in linea con quelli di medicazioni avanzate presenti sul mercato [39, 43].



a)



b)



c)

**Figura 2.8:** Swelling ratio dell'hydrogel in PVA e BG a) in acqua distillata, b) in una soluzione salina, c) a diverso pH [42]

### 2.4.3 Velocità di trasmissione e permeabilità al vapore acqueo

Come già accennato in precedenza, il mantenimento di un ambiente umido è fondamentale per favorire la guarigione della ferita ed è uno dei principali obiettivi del wound dressing poiché, in seguito alla lesione il quantitativo di acqua che evapora dalla pelle può essere anche 20 volte superiore a quello che si avrebbe nel caso di cute non lesa. Infatti, una ferita esposta all'aria tende a disidratarsi e a formare una crosta in grado di proteggerla dagli agenti patogeni esterni, ma è anche vero che quando le cellule si trovano in un microambiente non ottimale perdono la propria forza vitale [26]. È chiaro, quindi, come non sia sufficiente controllare il contenuto di umidità solo attraverso la capacità di assorbimento della medicazione, ma è importante valutarne anche la potenziale permeabilità ai gas, tra cui il vapore acqueo, in termini di velocità di trasmissione, o *Water Vapor Transmission Rate* (WVTR).

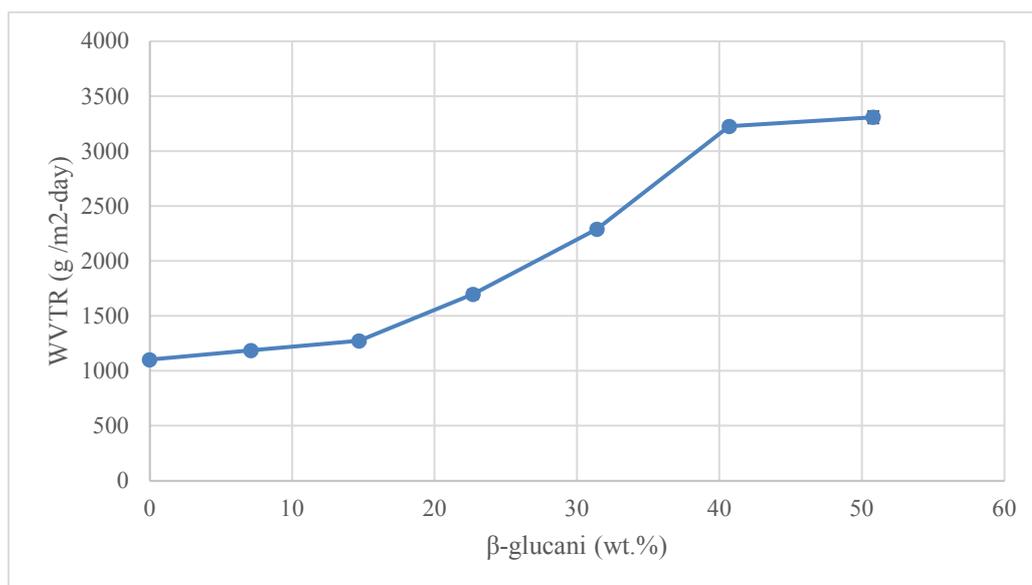
Per valutare il WVTR di un dressing si pone il campione sulla sommità di un recipiente cilindrico contenente una certa quantità di acqua o un sale in grado di assorbire l'umidità, come ad esempio il cloruro di calcio, e lo si pone in una camera a temperatura e grado di umidità controllati, misurando il peso dell'intero recipiente a intervalli regolari [32, 39]. Il valore di WVTR si calcola come:

$$WVTR = \frac{W_i - W_f}{S}$$

dove  $W_i$  e  $W_f$  sono rispettivamente il peso iniziale e finale del recipiente sul quale è stato posto il campione di dressing, mentre  $S$  è l'area di trasmissione del campione.

Nello studio di Xu et al. [26] è stato valutato che il valore ideale di WVTR che una medicazione dovrebbe avere per garantire la quantità ottimale di umidità in grado di favorire una rapida riepitelizzazione della ferita è pari a  $2028,3 \pm 237,8 \text{ g/m}^2\text{-day}$ , a fronte dei  $5138 \pm 202 \text{ g/m}^2\text{-day}$  di una ferita aperta [32].

Un film formato al 16% wt da PVA [32] ha un WVTR pari a  $1103 \pm 24 \text{ g/m}^2\text{-day}$ , circa la metà del valore ottimale. In Figura 2.9 si può notare come aggiungendo BG al composto il WVTR aumenta, fino a raggiungere il valore ottimale intorno ad una concentrazione del 30% di BG.



**Figura 2.9:** Andamento di WVTR al variare della concentrazione di BG [32]

Il WVTR più alto raggiunto con la concentrazione di BG pari a circa il 50% wt. è di  $3310 \pm 56 \text{ g} / \text{m}^2\text{-day}$ , valore che comunque non si discosta troppo da quello ottimale ed è comunque inferiore a quello riscontrato in una ferita aperta esposta all'aria, perciò anche i film con concentrazioni di BG più alte del 30% sono adatti alla traspirazione del vapore acqueo senza seccare la ferita.

La traspirabilità del dressing è valutata anche in termini di permeabilità al vapore acqueo, o *Water Vapor Permeability* (WVP), definita da ASTM E631 come “velocità di trasmissione del vapore acqueo, attraverso l'area del materiale, indotta dalla differenza di pressione del vapore tra le due superfici specifiche, in condizioni fisse di temperatura e umidità” [44]. I campioni di dressing sono posti sul bordo di apposite fiale con all'interno un sale anidro, come ad esempio  $\text{CaSO}_4$ , in grado di fornire un'umidità pari a 0% all'interno della fiala; in seguito, le fiale sono poste in un essiccatore a temperatura e umidità costanti.

A partire dal WVTR si può calcolare il WVP come:

$$WVP = \frac{WVTR}{\Delta P(R_2 - R_1)} X$$

con X che equivale allo spessore del film,  $\Delta P$  è la differenza di pressione ed  $R_2$  e  $R_1$  sono i valori di umidità rispettivamente nell'essiccatore e nella fiala [46].

In un film composto da amido, BG e il 23% in peso di glicerolo [29] la WVP diminuisce all'aumentare del contenuto di BG, fino ad un valore 8 volte inferiore rispetto a quello misurato nel caso di un film senza BG. All'aumentare della quantità di glicerolo, la permeabilità del vapore assume valori costanti e indipendenti dalla concentrazione di BG.

Anche nel film sintetizzato da Azari et al. [31] incrementando la quantità di BG si riduce la permeabilità del vapore nel film con gelatina e in misura maggiore in quello con ZnO NPs e gelatina. Ciò potrebbe essere dovuto alla minor idrofilia del film composto da ZnO NPs e BG, che provoca una maggiore interazione tra le catene di gelatina, rendendo così più tortuoso il percorso di diffusione del vapore e riducendone la sua velocità di trasmissione.

Questa ipotesi è giustificata anche dall'aumento dell'angolo di contatto tra l'acqua e la superficie nei film con ZnO NPs e BG rispetto al film in sola gelatina. L'angolo di contatto è infatti un indice dell'idrofilia del film: maggiore è l'angolo di contatto, minore è la bagnabilità della superficie (Tabella 2.4).

**Tabella 2.4:** Permeabilità del vapore e angolo di contatto [31]

Samples	WVP ( $\times 10^{-8} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ )	WCA ( $^\circ$ )	
		$t_1$	$t_2$
G	$2.15 \pm 1.82^a$	$44.29 \pm 0.73^c$	$44.29 \pm 0.73^d$
G/ $\beta$ G10%	$1.93 \pm 2.01^c$	$49.89 \pm 1.40^{bc}$	$47.77 \pm 0.85^{bc}$
G/ $\beta$ G20%	$1.96 \pm 7.31^{bc}$	$49.03 \pm 1.27^{cd}$	$49.03 \pm 1.27^b$
G/ZnONPs2.5%	$2.03 \pm 1.98^b$	$46.83 \pm 0.33^d$	$46.83 \pm 0.33^c$
G/ $\beta$ G10%/ZnONPs2.5%	$2.01 \pm 1.21^{bc}$	$47.55 \pm 2.21^{cd}$	$49.07 \pm 0.73^b$
G/ $\beta$ G20%/ZnONPs2.5%	$1.85 \pm 4.72^d$	$49.14 \pm 0.52^{cd}$	$49.51 \pm 1.14^b$
G/ZnONPs5%	$1.70 \pm 1.09^e$	$53.06 \pm 1.45^{ab}$	$52.06 \pm 1.45^a$
G/ $\beta$ G10%/ZnONPs5%	$1.62 \pm 3.22^{ef}$	$53.08 \pm 1.75^a$	$52.06 \pm 0.82^a$
G/ $\beta$ G20%/ZnONPs5%	$1.58 \pm 3.66^e$	$53.56 \pm 1.05^a$	$53.08 \pm 1.75^a$

## 2.5 Attività antimicrobica

Nel capitolo precedente è stata fatta una panoramica sull'effetto antimicrobico di BG estratti da diverse fonti, evidenziando come questo aspetto, insieme ad eventuali trattamenti fisici e chimici, influenzi il risultato dei test effettuati. Le prove riportate prevedevano l'utilizzo di BG in soluzione acquosa sia per i test di diluizione che per quelli di diffusione.

Nell'articolo di Azari et al [31] è stata valutata, invece, l'attività antimicrobica di film composti da gelatina, BG e ZnO NPs. Per la prova sono stati utilizzati campioni di film con un diametro di 12 mm, posti sulla superficie di piastre Petri contenenti Mueller-Hinton agar sul quale era stato precedentemente disperso l'inoculo standard ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL). Le Petri sono poi state incubate a 37 °C per 24 ore, al termine delle quali è stato valutato il diametro dell'alone di inibizione intorno al disco. I risultati sono mostrati in Tabella 2.5.

**Tabella 2.5:** Risultato prova antimicrobica [31]

Samples	Inhibitory zone (mm)			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimorium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
G/ZnONPs2.5%	13.5 ± 1.04 <sup>c</sup>	13.0 ± 1.74 <sup>b</sup>	15.0 ± 1.13 <sup>d</sup>	13.0 ± 1.25 <sup>d</sup>
G/βG10%/ZnONPs2.5%	13.0 ± 1.20 <sup>d</sup>	12.0 ± 1.55 <sup>c</sup>	16.0 ± 1.23 <sup>c</sup>	12.0 ± 1.36 <sup>e</sup>
G/βG20%/ZnONPs2.5%	13.0 ± 2.01 <sup>d</sup>	12.0 ± 2.05 <sup>c</sup>	15.7 ± 1.48 <sup>c</sup>	12.2 ± 1.19 <sup>f</sup>
G/ZnONPs5%	16.2 ± 1.13 <sup>a</sup>	16.2 ± 1.90 <sup>a</sup>	18.0 ± 1.53 <sup>a</sup>	15.7 ± 1.34 <sup>a</sup>
G/βG10%/ZnONPs5%	14.0 ± 2.10 <sup>b</sup>	13.0 ± 1.48 <sup>b</sup>	16.7 ± 1.81 <sup>b</sup>	13.7 ± 1.78 <sup>c</sup>
G/βG20%/ZnONPs5%	14.2 ± 1.32 <sup>b</sup>	13.2 ± 1.72 <sup>b</sup>	17.0 ± 2.10 <sup>b</sup>	15.0 ± 1.52 <sup>b</sup>

Come si poteva immaginare, il diametro della zona di inibizione cresce all'aumentare della concentrazione di ZnO NPs, oggetto di studio per le più recenti medicazioni avanzate e noto per la sua efficacia nei confronti di batteri patogeni resistenti [46]. L'azione antimicrobica può essere spiegata tramite due meccanismi: il primo prevede il rilascio di ioni  $Zn^{2+}$  a partire da ZnO NPs, che penetrano nella membrana cellulare e reagiscono con il contenuto citoplasmatico, portando alla morte del batterio; nel secondo meccanismo vengono prodotte specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano il DNA del batterio [31]. L'aggiunta di BG tende, invece, a far diminuire la zona di inibizione per quasi tutti i ceppi batterici testati, senza grosse differenze nell'utilizzo di una concentrazione in BG maggiore o minore.

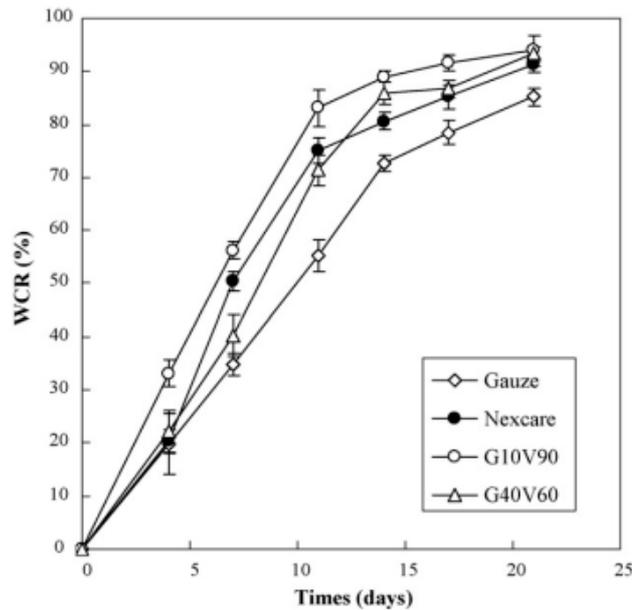
## 2.6 Wound healing

La capacità dei BG di favorire il processo di riepitelizzazione e chiusura della ferita è stata testata *in vivo* su cavie animali, solitamente topi diabetici geneticamente modificati, chiamati *db/db mice*, in cui il recettore della leptina è stato soppresso, causandone l'obesità. Nello studio di Huang et al. [32], su ogni cavia sono state effettuate quattro ferite di area pari a 4 cm<sup>2</sup> l'una, due delle quali coperte da film a diversa composizione, una trattata con un prodotto commerciale (Nexcare) e l'ultima solo con una garza di cotone. Il grado di guarigione, espresso in termini di rapporto di contrazione della ferita, o *wound contraction ratio* (WCR) è stato calcolato come:

$$WCR (\%) = \left( \frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100$$

dove  $A_0$  e  $A_t$  sono rispettivamente l'estensione iniziale della ferita e l'area misurata dopo un certo intervallo di tempo  $t$ .

In Figura 2.10 sono presentati i valori di WCR in funzione del tempo per le diverse medicazioni.



**Figura 2.10:** Percentuali di contrazione della ferita in funzione del tempo ottenute per le diverse medicazioni [32]

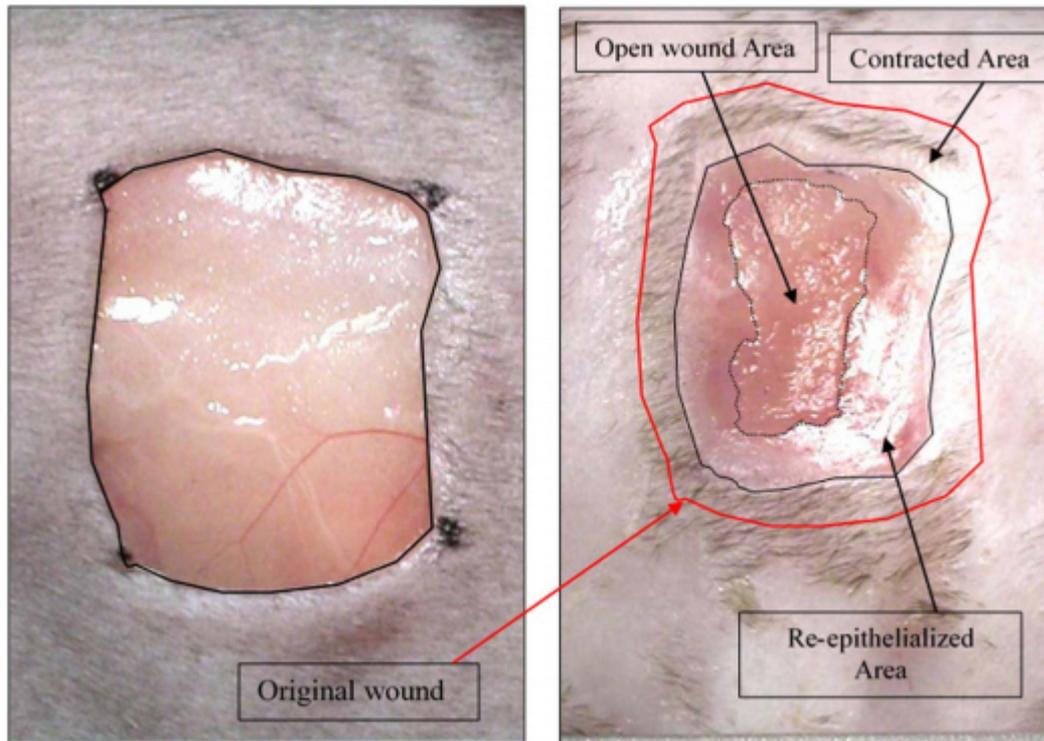
Si può osservare come il film contenente un quantitativo di BG pari a circa il 7% (G10V90) sia il più efficace, anche rispetto al dressing commerciale, con un rapporto di riduzione della ferita pari a circa il 50% dopo solo una settimana e a più del 90% dopo circa 14 giorni. Il film contenente circa il 50% (G40V60) di BG invece sembra essere più vantaggioso di Nexcare sul lungo periodo, dopo due settimane di utilizzo, ma un po' meno performante rispetto al film a minor contenuto di BG. La capacità di guarigione della ferita è dunque correlata alla presenza di BG e al loro rilascio, che favorisce la produzione di fibroblasti, ma un quantitativo troppo elevato potrebbe influire sulla velocità di migrazione dei fibroblasti stessi, rallentando in un primo momento la velocità di riepitelizzazione della ferita. È necessario quindi individuare la percentuale adatta di BG in modo tale da ottimizzare sia la proliferazione che lo spostamento dei fibroblasti [32].

Grip et al. [47] hanno sviluppato tramite elettrospinning un dressing composto da nanofibre di idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) e ossido di polietilene (PEO) a cui sono stati aggiunti BG a concentrazione crescente, ottenendo quattro film rispettivamente denominati "No $\beta$ G", "Low $\beta$ G", "Medium $\beta$ G" e "High $\beta$ G". I quattro film sono stati testati in vivo su topi db/db a cui era stata effettuata un'incisione di 1 cm<sup>2</sup> e sono state studiate le caratteristiche di contrazione della ferita e riepitelizzazione calcolate come:

$$\text{Contrazione della ferita (\%)} = \left[ \frac{A_0 - (R_{Gt} + A_{Gt})}{A_0} \right] \times 100$$

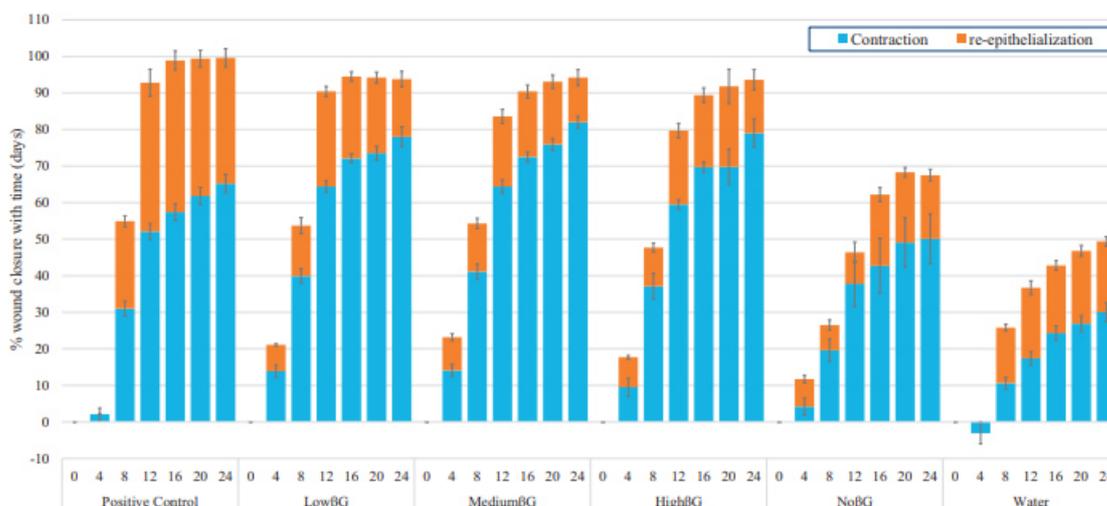
$$\text{Riepitelizzazione (\%)} = \left( \frac{C_{Gt} - A_{Gt}}{A_0} \right) \times 100$$

con  $A_0$  e  $A_{Gt}$  che indicano rispettivamente l'area iniziale della ferita (Original Wound) e quella misurata dopo un certo lasso di tempo (Open Wound Area), mentre  $R_{Gt}$  e  $C_{Gt}$  rappresentano l'area di riepitelizzazione (Re-epithelialized Area) e l'area contratta (Contracted Area) della ferita al tempo  $t$ , come mostrato in Figura 2.11



**Figura 2.11:** Ferita in fase di guarigione. [48]

In Figura 2.12 sono mostrati i diversi contributi di riduzione e riepitelizzazione della ferita dei quattro dressing sviluppati, a confronto con i risultati ottenuti dai gruppi di topi trattati con controllo positivo e negativo, rispettivamente soluzione di fattori di crescita e acqua per preparazioni iniettabili. In tutti e sei i gruppi sottoposti al test, la ferita è stata coperta con un film in poliuretano per evitare la dispersione della medicazione, in particolar modo dei dressing in nanofibre che si trasformano in gel a contatto con la ferita.



**Figura 2.12:** Contributi di contrazione e riepitelizzazione [47]

I dressing composti da nanofibre mostrano una velocità di contrazione della ferita superiore sia al controllo positivo che al controllo negativo, in cui addirittura si registra un’iniziale espansione della ferita: ciò sembra essere dovuto all’ambiente ottimale creato dalla struttura della medicazione stessa, indipendentemente dalla presenza dei BG. Dal dodicesimo giorno in poi si evidenzia invece un avanzamento più rapido nel processo di chiusura della ferita nei gruppi trattati con BG, con valori paragonabili a quelli del controllo positivo. Ancora una volta, non sembrano esserci grosse differenze nei dressing con diverse concentrazioni di BG in termini di percentuale finale di chiusura della ferita, ma si osserva come nei film a minor contenuto di BG questo processo sia più veloce.

## 2.7 Rapporto costo/efficienza

La sperimentazione *in vivo* dei BG sull’uomo per la cura di ferite croniche ha portato alla luce risultati interessanti non solo dal punto di vista dell’efficienza, ma anche per quanto riguarda l’aspetto economico. I test finora effettuati non sono relativi all’utilizzo di vere e proprie medicazioni avanzate, come hydrogel o film, ma all’uso combinato di un gel a base di metilcellulosa e BG solubili, i cui effetti sono stati comparati a quelli del gel di metilcellulosa, usato come medicazione standard [49].

Nello studio di Elg et al. [49] un campione di 300 pazienti è stato suddiviso in due gruppi, il primo è stato sottoposto alle cure standard, mentre il secondo ha ricevuto l’aggiunta del gel di BG. Il trattamento ha avuto la durata di 24 settimane e i due gruppi non avevano grosse differenze in termini di età media dei pazienti, estensione e tipo di ferita, principalmente ulcere, ustioni e ferite post-operatorie. Al termine delle 24 settimane solo 280 pazienti hanno concluso il test, 136 nel gruppo “standard” e 144 in quello “BG”, e di questi rispettivamente il 75% e il 96% sono risultati completamente guariti dalla lesione. È stata inoltre registrata una velocità di guarigione più elevata nel gruppo trattato con BG, con una media di 7,2 settimane necessarie alla chiusura della ferita, contro le 10,7 settimane utili in media per le cure standard. Ciò si traduce non solo in un maggior benessere del paziente, ma anche in un costo inferiore delle cure: è stato calcolato infatti che la spesa totale dei trattamenti ammonta a £685 e £576 a paziente rispettivamente per il gruppo con le cure standard e con l’aggiunta di BG. Nella stima dei costi rientrano, oltre al lavoro del

personale medico e infermieristico, anche il prezzo di un tubetto di gel (£1,80 per 8g di gel di metilcellulosa e £20 per 4g di gel di BG) assumendo un uso singolo per tubetto. In Tabella 12 sono riassunti i dati relativi alla percentuale e alla velocità di guarigione dei pazienti nei due gruppi e i costi inerenti alle cure necessarie.

Le lesioni ulcerose richiedono tempi di guarigione e costi per i trattamenti più elevati in entrambi i gruppi in analisi, ma anche in questo caso la cura con BG sembra essere la più conveniente anche in termini di percentuale di guariti dopo le 24 settimane di studio.

**Tabella 2.6:** Confronto relativo a efficienza e costi tra cure standard e cure sperimentali con BG [49]

	Healed n, %	Treatment weeks/patient	Cost/patient £*	Incremental cost £/patient	ICER† £/additional week healed
<b>Observed outcomes at 24 weeks, all wound types, baseline costs of care estimates</b>					
Beta-glucan gel	138/144 (96%)	7.2	£576	-£109	Dominant†
Standard care	102/136 (75%)	10.7	£685		
<b>Observed outcomes at 24 weeks, ulcer type wounds only, baseline cost of care estimates</b>					
Beta-glucan gel	65/71 (92%)	10.4	£839	-£388	Dominant†
Standard care	28/61 (46%)	17.6	£1,227		
*Including nursing, dressings, prescriptions for pain and antimicrobials, and any wound procedures; ICER—incremental cost-effectiveness ratio; †Dominant means reduced time to complete healing at a lower total cost of care					

## Capitolo 3: Materiali e metodi

### 3.1 Materiali

Acetato di zinco diidrato, idrossido di potassio, etanolo, glicerolo, idrossido di sodio, acido cloridrico, Mueller Hinton Broth e Mueller Hinton Agar sono stati acquistati presso “Sigma Aldrich”. I  $\beta$ -glucani in polvere con una purezza pari a 70% sono stati forniti da “ACEF S.p.a”.

### 3.2 Sintesi e caratterizzazione dell’ossido di zinco

#### 3.2.1 Sintesi per precipitazione

L’ossido di zinco nanostrutturato ( $nZnO$ ) è stato ottenuto partendo da 14,75g di acetato di zinco diidrato ( $(CH_3COO)_2Zn \cdot 2H_2O$ ) e 7,4g di idrossido di potassio (KOH), disciolti rispettivamente in 60 ml e 32 ml di etanolo, seguendo una procedura precedentemente descritta da Mitra et al. [50] La miscela delle due soluzioni è stata tenuta sotto agitazione continua ad una temperatura costante di 60 °C, grazie all’utilizzo di un bagno d’olio che permette di ottenere una distribuzione uniforme della temperatura, monitorata attraverso una sonda. L’operazione è avvenuta con riflusso di etanolo mediante l’utilizzo di un condensatore collegato alla beuta con la miscela, che impedisce all’etanolo di evaporare e assicura un volume costante per tutto il tempo necessario alla reazione. Dopo 72 ore, al termine della reazione, il precipitato è separato dal surnatante mediante centrifugazione a 4000 rpm per 20 minuti, e successivamente lavato con etanolo e centrifugato per tre volte. Infine, il precipitato è stato fatto asciugare in stufa a 60 °C per 24 ore. Successivamente è stato ridotto in polvere tramite l’utilizzo di pestello e mortaio, ottenendo 4,08g di prodotto, conservato all’interno di una Falcon.

#### 3.2.2 Metodi per la caratterizzazione dell’ossido di zinco

##### 3.2.2.1 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X è una tecnica usata per studiare la struttura cristallina dei materiali. Un campione del materiale finemente polverizzato è stato posto nell’apposito supporto e analizzato per angoli compresi tra 10° e 80°. Per effettuare la prova sono state impostate le condizioni utili di esercizio dello strumento PANalytical X’Pert Pro (Cu  $K\alpha$  radiation) diffractometer, pari a 40 kV e 40 mA. Al termine dell’analisi è stato ottenuto uno spettro grazie al quale, osservando la posizione e l’intensità dei picchi, si può determinare la sostanza esaminata e la relativa struttura cristallina.

##### 3.2.2.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

Il fisisorbimento è un fenomeno di adsorbimento che avviene sulla superficie di un solido, detto adsorbente, che entra in contatto con un fluido, detto adsorbato, che si lega debolmente alla superficie del solido. Sfruttando il fisisorbimento di un gas, come azoto o argon, è possibile quantificare la superficie specifica e la distribuzione della dimensione dei pori del materiale. La prima fase dell’operazione prevede il riscaldamento e il degasaggio del

campione a 70 °C per circa 4 ore, in modo tale da permettere il desorbimento di eventuali specie adsorbite sulla superficie; successivamente si abbassa la temperatura a 77 K, punto di ebollizione dell'azoto, e si misura il volume del gas adsorbito sulla superficie. La variazione del volume adsorbito con la pressione parziale di equilibrio è descritta dall'isoterma di adsorbimento (Figura 3.1). Utilizzando il modello di Brunauer-Emmett-Teller (BET) è stata calcolata l'area superficiale specifica del materiale. La distribuzione dei pori è stata ottenuta con il modello Barret-Joyner-Helenda (BJH). Per l'analisi è stato usato lo strumento ASAP2020 Plus (Micromeritics).

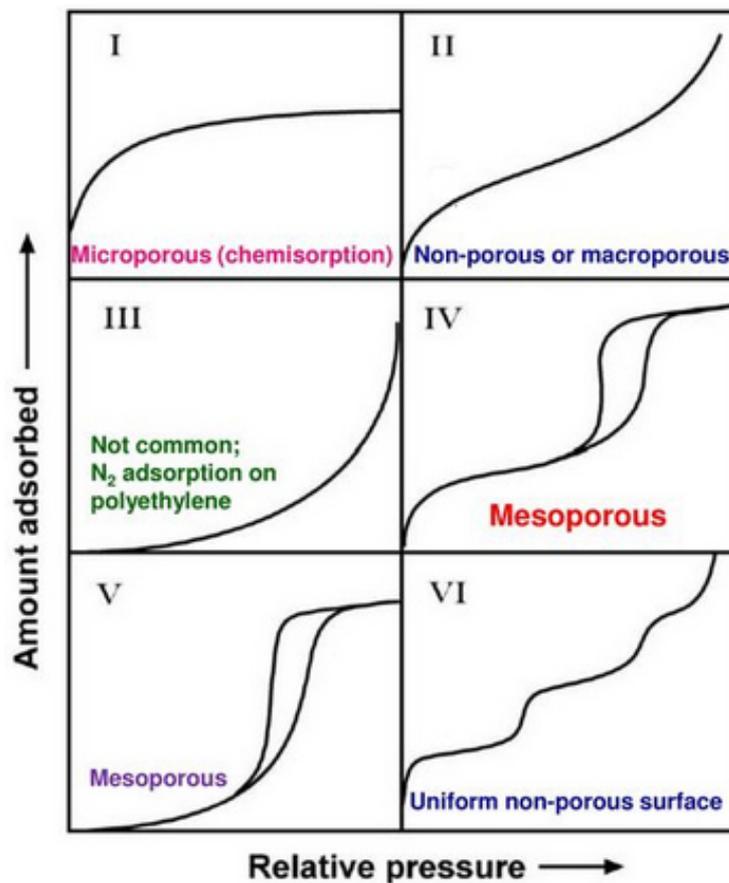


Figura 3.1: Isotherme di assorbimento secondo la classificazione IUPAC

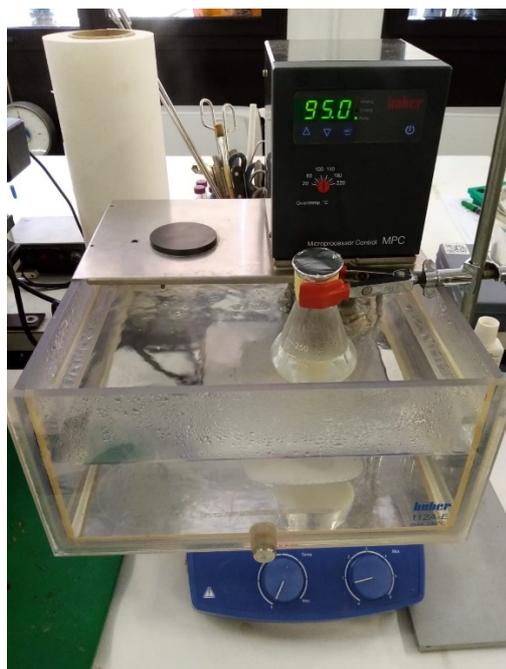
### 3.3 Sintesi e caratterizzazione dei film compositi

#### 3.3.1 Formulazione dei film

Per la realizzazione dei film di BG è stato fatto riferimento alla procedura di Sagnelli et al. [29], apportando alcune modifiche e testando diverse condizioni. Per prima cosa è stata preparata una soluzione acquosa al 2% in peso di BG commerciali ottenuti tramite estrazione da *S. cerevisiae* e forniti da ACEF S.p.a. Sono stati usati BG, con una purezza pari a 70% e la restante parte formata da altri componenti del lievito. Il pH della soluzione è pari a 4, ma sono state effettuate prove utilizzando anche una soluzione neutralizzata con NaOH 1,5 M. Per incentivare la solubilizzazione dei BG, la soluzione è stata denaturata in un bagno termostatico usando lo strumento Huber 112A-E (Figura 3.2), testando temperature e tempi diversi:

- 70°C per 20 minuti;
- 70°C per 1 ora;
- 95°C per 20 minuti;
- 95°C per 40 minuti;
- 95°C per 1 ora.

Inoltre, l'efficacia della denaturazione è stata valutata confrontando i film ottenuti con quelli prodotti a partire da una soluzione non denaturata.



**Figura 3.2:** Bagno termostatico in funzione

Successivamente è stato aggiunto glicerolo, usato come plastificante, sperimentando due concentrazioni, il 25% e il 50% rispetto al peso secco dei BG. In seguito, i film sono stati colati in stampi di alluminio e silicone ed in piastre Petri, usando due diversi rapporti Volume/Area, pari a 0,135 cm e 0,2 cm. Infine, i film sono stati fatti essiccare in stufa a 65 °C per circa 3 ore o a temperatura ambiente fino a completa asciugatura.

Per ottenere i film nanocompositi di BG e nZnO (BGZ), è stata seguita una procedura analoga alla precedente aggiungendo, alla sospensione di BG denaturata, una sospensione acquosa di nZnO, sonicata per un'ora nel bagno ad ultrasuoni Elmasonic S 60 H. La concentrazione di tale sospensione è stata scelta in modo tale da ottenere film compositi con quantità di nZnO pari al 2%, 4% e 6% in peso rispetto al peso secco dei BG presenti, denominati rispettivamente BGZ-2, BGZ-4 e BGZ-6. In Tabella 3.1 sono riassunte le condizioni di esercizio sperimentate.

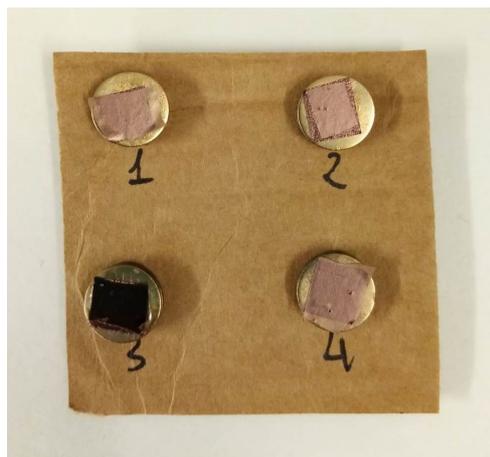
**Tabella 3.1:** Condizioni di esercizio sperimentate

Stampo	Alluminio Silicone Petri
pH	4 7
Denaturazione	70 °C/20 minuti 70 °C/1 ora 95 °C/20 minuti 95 °C/40 minuti 95 °C/1 ora -
Glicerolo	25% 50%
Volume/Area	0,135 cm 0,2 cm
Asciugatura	65 °C Temperatura ambiente

### 3.3.2 Caratterizzazione dei film

#### 3.3.2.1 Microscopia a Scansione Elettronica

La microscopia a scansione elettronica (SEM) permette di ottenere immagini ad elevata risoluzione per analizzare la morfologia del materiale. In questo tipo di microscopia si impiega l'interazione tra il fascio di elettroni generato dall'apparecchiatura e gli atomi che compongono il campione in esame, che dovrà essere opportunamente metallizzato (come mostrato in Figura 3.3) in modo tale da renderlo conduttivo. Nel nostro caso sono state ottenute immagini tramite diversi ingrandimenti pari a 250, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000, 25000 e 50000 X.



**Figura 3.3:** Film metallizzati ai fini della SEM

### 3.3.2.2 Diffrazione a raggi X

Anche per i film è stata utilizzata questa tecnica di caratterizzazione per valutare la cristallinità del film nanocomposito. Il procedimento utilizzato è analogo a quello già descritto per nZnO (paragrafo 3.2.2.1), con la differenza che in questo caso il campione testato non si presenta come una polvere ma come un ritaglio di film da adagiare sull'apposito supporto.

### 3.3.2.3 ATR-FTIR

La spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR) fornisce informazioni sulla struttura chimica del composto, rilevando la presenza dei diversi gruppi funzionali capaci di assorbire solo radiazioni a determinate frequenze, ovvero a quelle corrispondenti ai modi vibrazionali dei legami chimici. Durante l'analisi il campione è in contatto con un cristallo che permette la riflessione totale della radiazione all'interno del campione. Il risultato dell'analisi è uno spettro vibrazionale (curva di assorbimento vs. numero d'onda) i cui picchi di assorbimento possono essere ricondotti alla presenza di legami e gruppi funzionali caratteristici.

Nel nostro caso è stato analizzato la porzione di spettro con numero d'onda compreso tra  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $450\text{ cm}^{-1}$ , utilizzando lo strumento NICOLET iS50 FT-IR.

### 3.2.2.4 Analisi termica

Sono state effettuate due tipi di analisi termica, in atmosfera inerte di Argon:

- Analisi termogravimetrica (TGA) in cui la massa del campione è misurata al variare della temperatura di esercizio. Questo tipo di test da informazioni sui fenomeni fisici e chimici dipendenti dalla temperatura che coinvolgono i campioni testati, come transizioni di fase, decomposizione termica o reazioni di adsorbimento/assorbimento.
- Calorimetria a scansione differenziale (DSC), tecnica in cui si misura la quantità di calore necessaria a far aumentare la temperatura del campione e del riferimento, in funzione ancora una volta della temperatura stessa. Questa analisi è utile quando nel campione avviene un passaggio di fase nel range di temperatura testato: in questo modo è possibile calcolare la differenza di portata di calore, tra il campione e il riferimento, necessaria ad avere quell'innalzamento di temperatura stabilito.

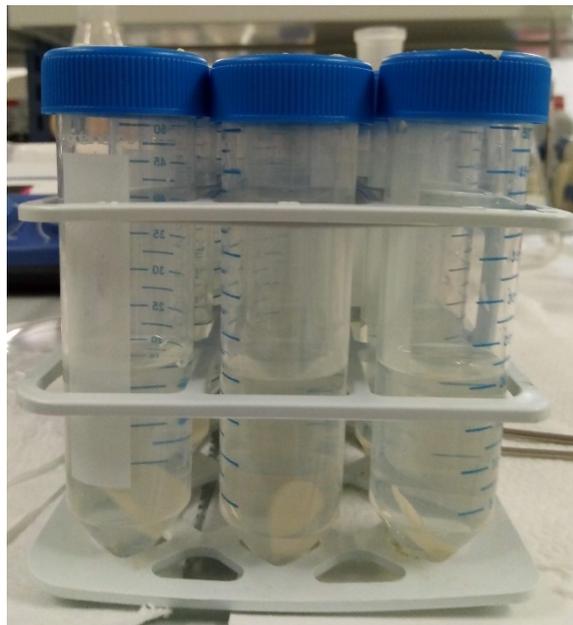
Per entrambe le misure è stato usato lo strumento STA PT 1600 nell'intervallo di temperatura 25-800 °C, con una velocità di riscaldamento pari a 2,52-10 °C/min. All'inizio dell'operazione è stato collocato un campione di film all'interno di un crogiolo in allumina, mentre per il riferimento è stato utilizzato un crogiolo vuoto. L'analisi è stata eseguita per tutti e quattro i tipi di film.

### 3.3 Test di swelling

La prova di rigonfiamento, o swelling, permette di valutare la capacità assorbente di un film immerso in un solvente. Dischi di film di diametro pari a 20 mm sono stati prima essiccati in stufa a 65 °C per circa 1h, fino alla stabilizzazione del peso, e successivamente immersi in Falcon contenenti 20 mL di acqua a pH pari a 3, 5, 7, 9 e 11 (come mostrato in Figura 3.4). Ogni 30 minuti i campioni sono stati prelevati dalle Falcon e pesati eliminando l'eccesso d'acqua. Il procedimento è stato ripetuto fino alla stabilizzazione del peso. L'esperimento è stato condotto in triplice copia utilizzando i film ottenuti con BG alle due purezze testate. I dati raccolti sono stati poi elaborati per ottenere i valori di "swelling ratio", come descritto nel capitolo precedente, utilizzando la seguente formula:

$$\text{Swelling ratio} = \frac{W_w}{W_d}$$

con  $W_d$  e  $W_w$  che rappresentano rispettivamente il peso del campione secco e del campione immerso in acqua, dopo averne eliminato l'eccesso.



**Figura 3.4:** Prova di swelling

### 3.4 Valutazione dell'attività antimicrobica

Le prove antimicrobiche sono volte a verificare la l'attività antibatterica dello nZnO e dei film BGZ contro *S. epidermidis* (LMG 10474), un batterio (Gram +) ed *E. coli* (LMG 08063), un batterio (Gram -). Per i test con nZnO, sono stati utilizzati il metodo "Broth micro-dilution" effettuato in piastre multiwell da 96 pozzetti precedentemente descritto

nella sezione 1.2.1, e il Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, detto anche metodo della goccia. Per i film nanocompositi BGZ è stato invece utilizzato il metodo EUCAST disk diffusion, descritto in Sez. 1.2.1., a cui sono state apportate delle modifiche. In tutti i metodi menzionati si è fatto uso di terreno di coltura Muller Hinton Agar (MHA) e brodo di coltura Muller Hinton Broth (MHB).

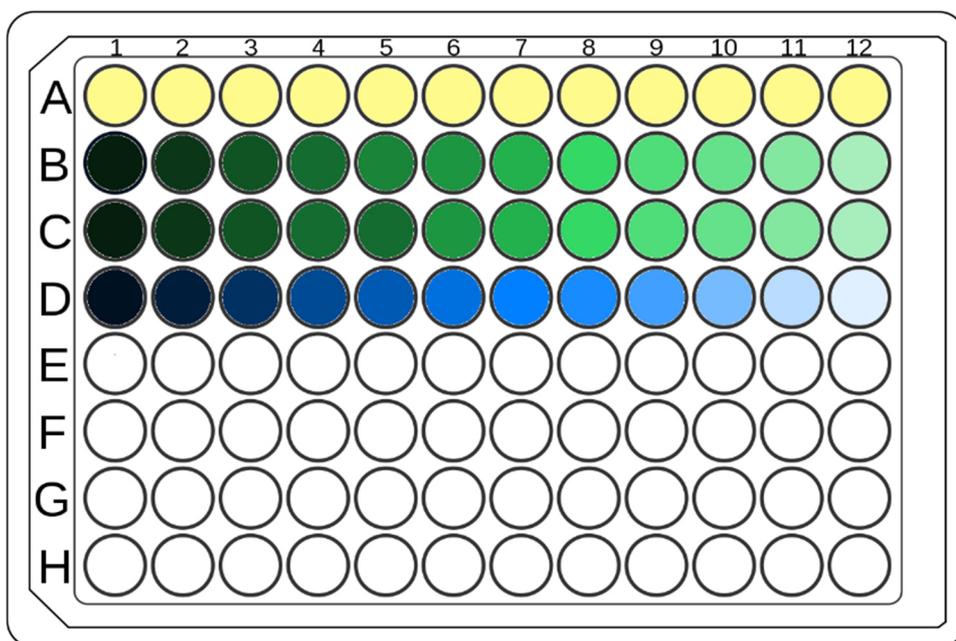
### **3.4.1 Metodo “Broth micro-dilution” in piastre multiwell da 96 pozzetti**

Questo metodo prevede l'utilizzo di due piastre multiwell composte da 8 file con 12 pozzetti per fila, in totale 96, in cui viene fatta crescere la coltura batterica in condizioni diverse, cioè a diverse concentrazioni di nZnO, per individuare il valore di MIC.

1. **Preparazione dell'inoculo standardizzato.** Sono state prelevate tre colonie da una coltura batterica cresciuta per 18-24 ore a 37°C su un terreno solido MHA e sono state disperse in 5 mL di soluzione sterile di NaCl 0,85% w/v, ottenendo una dispersione contenente  $10^8$  CFU/mL. La dispersione è stata poi diluita 1:1000 in terreno MHB, ottenendo un inoculo con una concentrazione di  $10^5$  CFU/mL.
2. **Preparazione delle sospensioni di nZnO.** Sono state preparate dodici sospensioni di nZnO in acqua sterile a pH 6. Le concentrazioni sono state scelte in modo tale da ottenere, nei pozzetti della piastra multiwell, le concentrazioni di ossido elencate in Tabella 3.2. Prima della prova, le sospensioni sono state sottoposte a sonicazione in un bagno ad ultrasuoni per 1 ora alla frequenza di 35 Hz e ulteriormente miscelate con l'ausilio di un vortex prima di essere usate nel test antimicrobico.
3. **Allestimento della prova.** La Figura 3.5 mostra schematicamente l'allestimento della piastra multiwell. La riga A della piastra (pozzetti in giallo) è stata riempita con il controllo biotico, costituito dall'inoculo, in volume pari al 10% del volume totale contenuto nel pozzetto, e dal terreno di coltura. La riga D (pozzetti blu) contiene invece il controllo abiotico, ovvero le sole sospensioni di nZnO e il terreno di coltura. Le righe B e C (pozzetti verdi) ospitano infine le sospensioni nZnO (con concentrazione crescente dalla colonna 1 alla colonna 12), l'inoculo in volume pari al 10% totale, ed il MHB. In Tabella 3.3, sono elencate le quantità di inoculo, nZnO e MHB per ogni fila nelle due prove effettuate. La prova è stata ripetuta utilizzando un volume di inoculo pari al 50% del totale per valutare l'impatto di un maggior rapporto inoculo/nZnO sull'attività antimicrobica dell'ossido.
4. **Controllo della torbidità.** Dopo aver tenuto la piastra in incubazione per 12 ore a 37 °C in agitazione a 150 rpm, è stato fatto il confronto della torbidità dei pozzetti fra quelli contenenti i campioni di nZnO a diversa concentrazione e i due controlli per individuare la MIC. Per l'identificazione della MBC, volumi di 10 µL sono stati prelevati dai pozzetti con concentrazioni di nZnO superiori alla MIC, sono stati depositati su un terreno MHA in piastre Petri e successivamente incubate a 37° per 24h.
5. **Valutazione della MBC.** Al termine del periodo di incubazione, le piastre sono state controllate per valutare la concentrazione a cui corrisponde l'assenza di colonie batteriche.

**Tabella 3.2:** Concentrazioni di nZnO per il metodo della piastra multiwell

Colonna	Concentrazione ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	20000
2	17500
3	15000
4	7500
5	3750
6	1920
7	960
8	480
9	240
10	120
11	60
12	30



**Figura 3.5:** Schema di allestimento della prova nelle piastre multiwell da 96 pozzetti: in giallo il controllo biotico, in blu il controllo abiotico e in verde il campione contenente lo zinco

**Tabella 3.3:** Volumi di inoculo, nZnO e MHB per ogni fila nelle due prove effettuate

Fila	Prova con 10 µL di inoculo	Prova con 50 µL di inoculo
A	100 µL di MHB 10 µL di inoculo	50 µL di MHB 50 µL di inoculo
B/C	50 µL di MHB 2x 50 µL nZnO 10 µL di inoculo	25 µL di MHB 2x 25 µL nZnO 50 µL di inoculo
D	50 µL di MHB 2x 50 µL nZnO 10 µL di MHB	25 µL di MHB 2x 25 µL nZnO 50 µL di MHB

### 3.4.2 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia

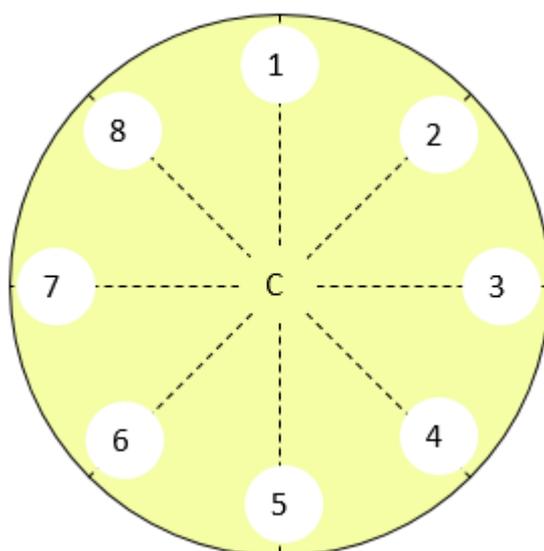
Per la realizzazione del test è stata adottata la seguente procedura:

1. **Preparazione dell'inoculo standardizzato.** Sono state prelevate tre colonie da una coltura batterica cresciuta su terreno solido per 18-24 ore, e successivamente disperse in 5mL di soluzione di NaCl 0,85% w/v. In seguito, la dispersione ottenuta, contenente  $10^8$  CFU/mL, è stata diluita 1:100 in MHB, in modo tale da avere una concentrazione pari a  $10^6$  CFU/mL
2. **Preparazione delle sospensioni di nZnO.** Sono state preparate sedici sospensioni, a diversa concentrazione, di nZnO in acqua sterile a pH 6. Prima di essere usate nel test antimicrobico, le sospensioni sono state sottoposte a sonicazione in un bagno ad ultrasuoni per 1 ora alla frequenza di 35 Hz e successivamente miscelate con l'aiuto di un vortex. In Tabella 3.4 sono riportate le concentrazioni di nZnO testate: per *E.coli* sono state utilizzate tutte le concentrazioni, mentre per *S. epidermidis* sono state usate le concentrazioni dalla terza in poi.
3. **Allestimento della prova.** 100 µL di inoculo standard ( $10^6$  CFU/mL) sono stati depositati sulla piastra. Quindi, gocce di sospensione di nZnO di volume pari a 20 µL, sono state depositate in corrispondenza di specifici punti presi a raggiera rispetto al centro (come mostrato in Figura 3.6), sul quale è infine stata fatta colare una goccia d'acqua da usare come controllo negativo. Le Petri sono state incubate a 37°C per 12 ore.
4. **Valutazione dell'estensione della zona di inibizione intorno alla goccia.** Le piastre sono state poste sul piano di lavoro e il diametro di inibizione è stato misurato con l'ausilio di un righello.

L'esperimento è condotto in duplice copia.

**Tabella 3.4:** Concentrazioni di nZnO per il metodo della goccia

Campione	Concentrazione (µg/mL)
1	40000
2	35000
3	20000
4	17500
5	15000
6	10000
7	7500
8	6000
9	5000
10	3750
11	1920
12	960
13	480
14	240
15	120
16	60



**Figura 3.6:** Schema di allestimento della prova antimicrobica con il “metodo della goccia”. C = controllo

### **3.4.3 Metodo Kirby-Bauer della diffusione del disco**

Per questo test è stata utilizzata una variante del Metodo Kirby-Bauer della diffusione del disco, in cui sono stati usati dei dischetti dal diametro di 2 cm, ottenuti a partire dai film compositi di BG a diversa purezza e a diverso contenuto di nZnO. In particolare, sono stati testati i campioni BGZ-2, BGZ-4 e BGZ-6.

La procedura osservata è la seguente:

- 1. Preparazione dell'inoculo standardizzato.** Il procedimento è analogo a quello descritto nel paragrafo 3.5.2 per il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato.
- 2. Applicazione dei dischi sulla superficie delle Petri.** Ogni Petri contiene due campioni di BGZ, un campione contenente solo BG e un dischetto in carta filtro, usato come controllo. Le Petri sono state incubate a 37°C per 24h
- 3. Misura dell'estensione dell'alone di inibizione.** Le piastre sono state poste sul piano di lavoro ed è stato misurato il diametro dell'alone di inibizione utilizzando un righello.

Ciascun esperimento è stato ripetuto almeno tre volte.

## Capitolo 4: Risultati

### 4.1 Metodi per la caratterizzazione dell'ossido di zinco

#### 4.1.1 Diffrazione a raggi X

In Figura 4.1 è mostrato lo spettro XRD del campione testato. Sono presenti picchi in corrispondenza degli angoli  $31.67^\circ$ ,  $34.31^\circ$ ,  $36.14^\circ$ ,  $47.40^\circ$ ,  $56.52^\circ$ ,  $62.73^\circ$ ,  $66.28^\circ$ ,  $67.91^\circ$ ,  $69.03^\circ$ , e  $72.48^\circ$ , tipici dell'ossido di zinco con struttura di tipo wurtzite.

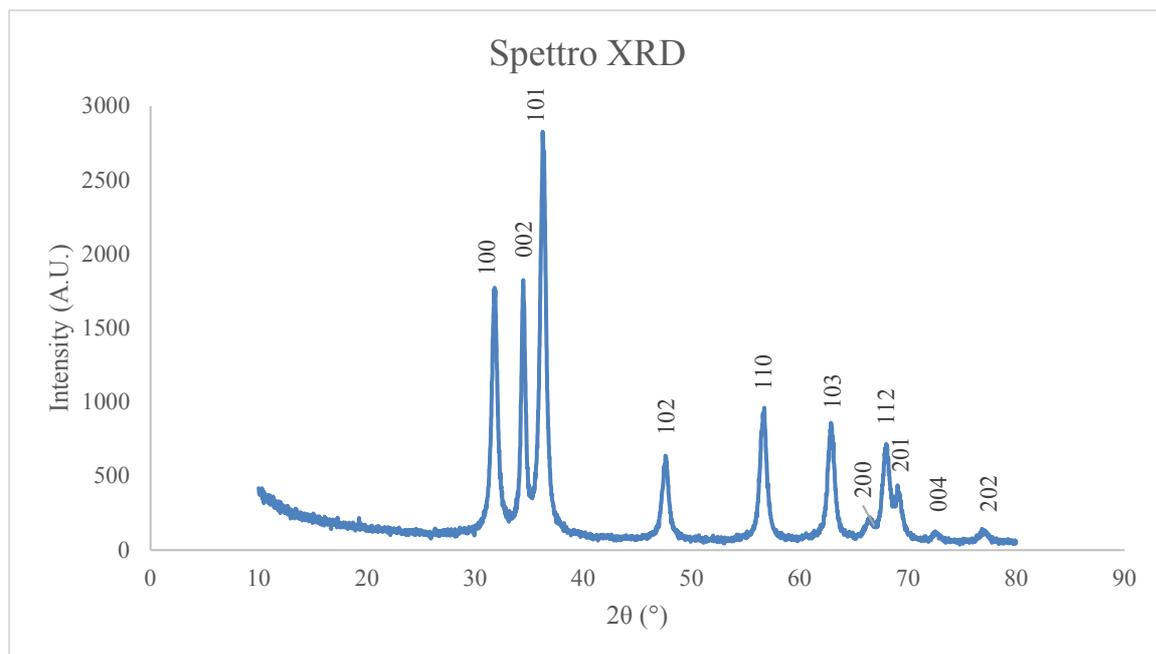
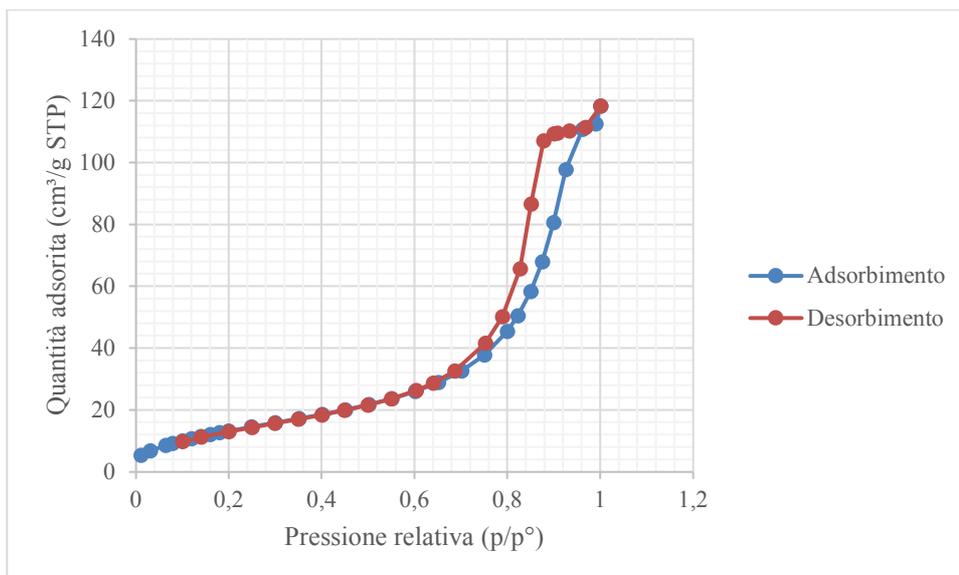


Figura 4.1: Spettro XRD dell'ossido di zinco

#### 4.1.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

In Figura 4.2 è presentata l'isoterma di fisisorbimento di azoto. Confrontando il grafico ottenuto con le isoterme della classificazione IUPAC (Figura 3.1) l'isoterma risulta di tipo IV con coppia di isteresi, da qui si evince che l'ossido di zinco analizzato è un solido mesoporoso. L'area superficiale calcolata tramite il modello BET risulta pari a  $53,4 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Il volume poroso specifico è pari a  $0,105 \text{ cm}^3/\text{g}$  e utilizzando il modello BJH è stato possibile ricavare la distribuzione porosimetrica, dalla quale è stato ottenuto un diametro medio dei pori pari a  $12,6 \text{ nm}$ .



**Figura 4.2:** Isotherme di adsorbimento e desorbimento di azoto (77 K) dell'ossido di zinco

## 4.2 Sintesi e caratterizzazione dei film compositi

### 4.2.1 Formulazione dei film

In Tabella 4.1 sono riassunte le condizioni ottimali che hanno portato ad ottenere i film compositi migliori.

**Tabella 4.1:** Condizioni ottimali di realizzazione dei film

Condizioni ottimali	
Stampo	Petri
pH	4
Denaturazione	95 °C/40 minuti
Glicerolo	25%
Volume/Area	0,2 cm
Asciugatura	65°C

Lo stampo in silicone si è rivelato essere il peggiore poiché, anche dopo diverse ore, il film non si asciuga del tutto, ma acquista una consistenza simile a quella di un gel, per cui risulta impossibile estrarre i campioni integri. Tra lo stampo in alluminio e le Petri in plastica, la scelta finale è ricaduta sulla seconda opzione poiché, sebbene lo stampo in alluminio offra una maggiore resistenza alle alte temperature e consenta l'asciugatura dei film in tempi più brevi rispetto alle Petri, nel lungo periodo tende a perdere lo strato antiaderente, rendendo più difficile estrarre il film.

La scelta di non neutralizzare il pH acido della soluzione di partenza è stata dettata dall'assenza di sostanziali differenze, tra le due soluzioni, nella rimozione del film dallo stampo. Mantenendo il pH naturale della soluzione, inoltre, si semplifica la procedura.

Durante le diverse prove è emerso che lo step di denaturazione è fondamentale: senza questo passaggio si formano delle crepe sulla superficie del film, ancor prima della completa asciugatura, per cui diventa infattibile separare interamente il film dallo stampo. Un problema analogo si ha utilizzando una temperatura di denaturazione di 70 °C o una temperatura di 95°C per 20 minuti: in questi casi i film sono stati estratti parzialmente o, una volta estratti, hanno manifestato poca resistenza alle sollecitazioni. Non sono state notate, invece, particolari differenze tra i film ottenuti partendo da soluzioni denaturate 40 minuti o 1h, per cui si è scelto di optare per un tempo di denaturazione minore, in modo tale da velocizzare il procedimento e ridurre il consumo energetico totale.

L'aggiunta di una quantità di glicerolo pari al 50% rispetto al peso secco dei  $\beta$ -glucani non ha prodotto vantaggi significativi nella realizzazione dei film, perciò in questo caso è stata seguita l'indicazione riportata nello studio di Novak et al. [30], che suggerisce di utilizzare una concentrazione di glicerolo pari al 25% in peso secco rispetto al contenuto di  $\beta$ -glucani. Il rapporto Volume/Area pari a 0,2 cm è stato scelto come valore ottimale poiché i film ottenuti mostravano una maggiore robustezza rispetto a quelli con un rapporto più basso pari a 0,135 cm.

Infine è stata scartata l'asciugatura a temperatura ambiente, a favore di quella in stufa, poiché dopo 72h i film apparivano ancora umidi.

In Figura 4.3 è mostrato un esempio di film ottenuto con le condizioni ottimali



**Figura 4.3:** Esempio di film ottenuto con le condizioni ottimali

## 4.2.2 Caratterizzazione dei film

### 4.2.2.1 Microscopia a Scansione Elettronica

Le immagini SEM sono state ottenute per tutti e quattro i campioni analizzati, denominati BG, BGZ-2, BGZ-4 e BGZ-6. In Figura 4.4 sono mostrate quelle relative all'ingrandimento di 5000x. Come si può notare, tutti e quattro i campioni presentano una superficie compatta e non porosa, quindi si può supporre che i film non siano particolarmente permeabili ai gas [28]. La superficie ha inoltre un aspetto granulare, in cui si nota la presenza di strutture globulari disperse nella matrice. Nello studio di Azari et al. [31], in cui sono stati formulati

film composti da gelatina, BG e ZnO NPs, queste strutture globulari sono state definite “pellet”. Questa irregolarità microscopica, riscontrata in diversi studi, è stata attribuita ad una disomogeneità nella sospensione di partenza [30, 31]. Nel nostro caso, invece, sembra essere una caratteristica casuale e non correlata alla composizione del film, perciò sono necessari ulteriori approfondimenti.

Non è invece possibile distinguere chiaramente la presenza di nZnO, neanche osservando le immagini ottenute con ingrandimenti più alti, probabilmente a causa della bassissima concentrazione utilizzata.

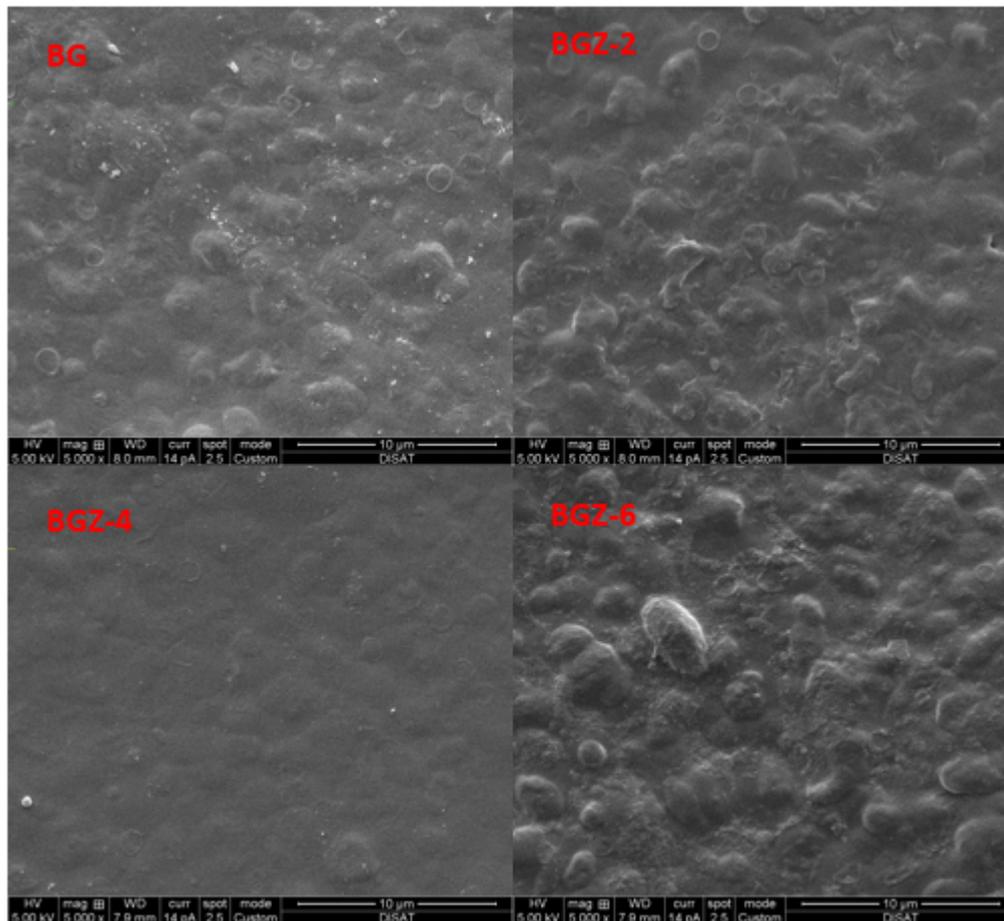
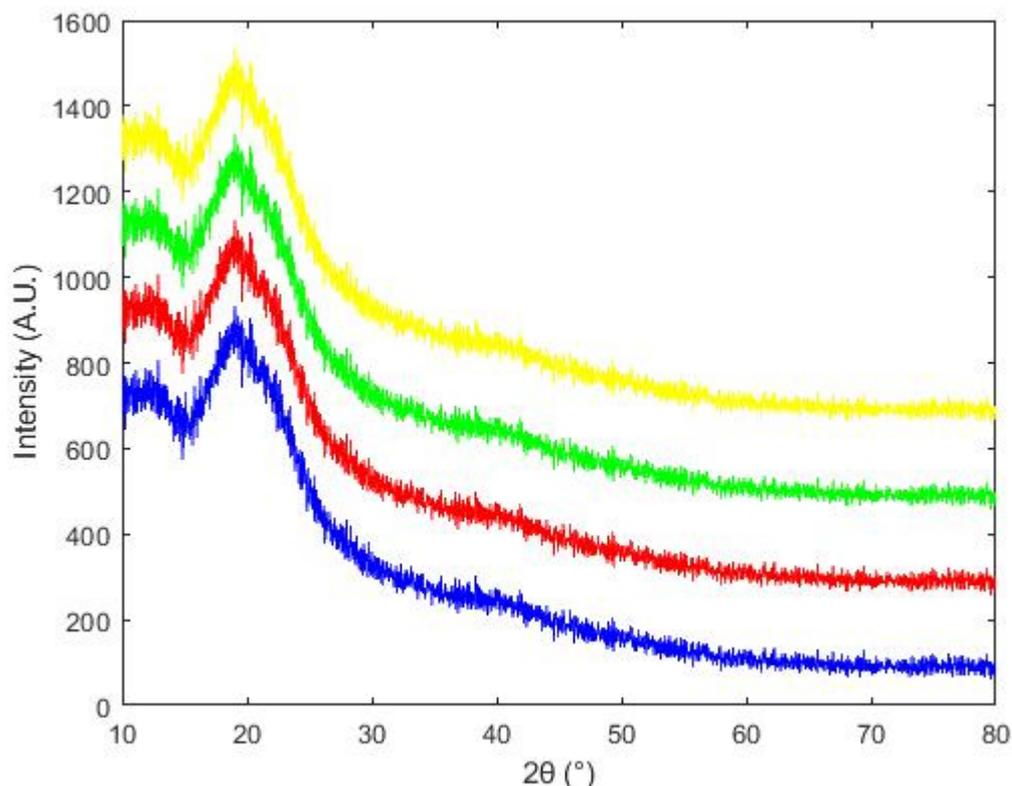


Figura 4.4: Immagine SEM ottenuta con ingrandimento 5000x

#### 4.2.2.2 Diffrazione a raggi X

Gli spettri XRD ottenuti per i quattro film sono mostrati in Figura 4.5: il film BG è rappresentato in blu, BGZ-2 in rosso, BGZ-4 in verde e BGZ-6 in giallo.

In tutti e quattro gli spettri si possono individuare due ampi picchi, in corrispondenza dei  $20^\circ$  e dei  $40^\circ$ , uno più pronunciato e l'altro meno visibile, caratteristici dei  $\beta$ -glucani, in accordo con la letteratura [28, 30, 31]. Non è visibile, invece, alcun segno che indichi la presenza di nZnO. Inoltre, data l'assenza di picchi definiti, si può concludere che il materiale sia di tipo amorfo.

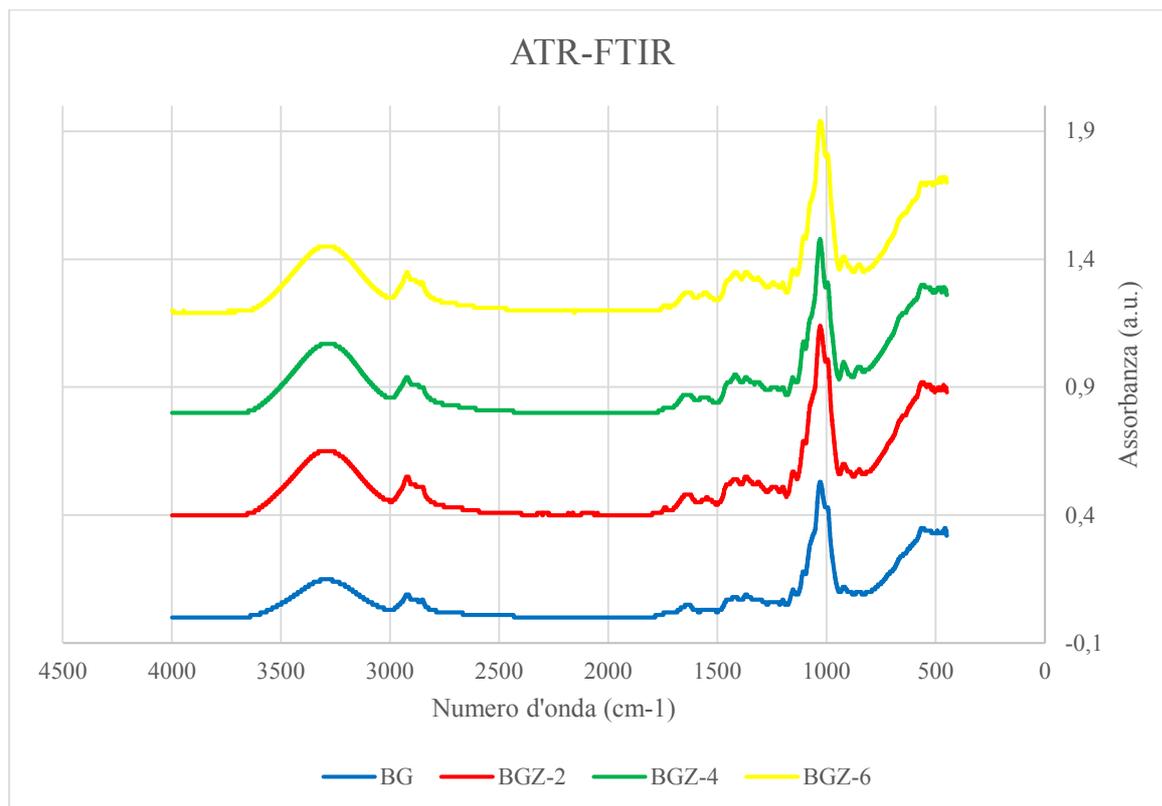


**Figura 4.5:** Spettri XRD. Blu = BG; Rosso = BGZ-2; Verde = BGZ-4; Giallo = BGZ-6

#### 4.2.2.3 ATR-FTIR

Per i quattro film testati sono stati ottenuti degli spettri ATR-FTIR molto simili tra loro, mostrati in Figura 4.6 e analizzati usando la tabella di riferimento fornita da Sigma Aldrich [51].

Nella prima parte del grafico è possibile osservare una banda larga nell'intervallo  $3330-3250\text{ cm}^{-1}$  tipica del gruppo  $-\text{OH}$  impegnato in legami idrogeno [51]. Le due bande successive a  $2921\text{ cm}^{-1}$  e  $2866\text{ cm}^{-1}$  indicano la presenza di un gruppo  $-\text{CH}_2$  [30], mentre le bande a  $1637\text{ cm}^{-1}$  e  $1536\text{ cm}^{-1}$  denotano l'esistenza di gruppi  $-\text{NH}$  e  $-\text{NO}$  [51] nel film, probabilmente a causa della presenza di altri componenti del lievito nella polvere di  $\beta$ -glucani di partenza [30]. Le bande a  $1419\text{ cm}^{-1}$  e  $1369\text{ cm}^{-1}$ , invece, sono indice della deformazione dell'angolo di legame (bending) del gruppo  $-\text{CH}_2$  [52]. Il picco a  $1154\text{ cm}^{-1}$ , seguito da quello ben visibile a  $1130\text{ cm}^{-1}$ , sono caratteristici dei polisaccaridi, in particolar modo dello stiramento dei gruppi  $-\text{COC}-$ ,  $-\text{CO}$  e  $\text{C-C}$  [30]. Infine, i picchi a  $993\text{ cm}^{-1}$  e  $923\text{ cm}^{-1}$  rappresentano rispettivamente i legami  $\beta$  e  $\alpha$ , così come il picco intorno a  $561\text{ cm}^{-1}$  [30].



**Figura 4.6:** Spettro ATR-FTIR per il film BGZ-2

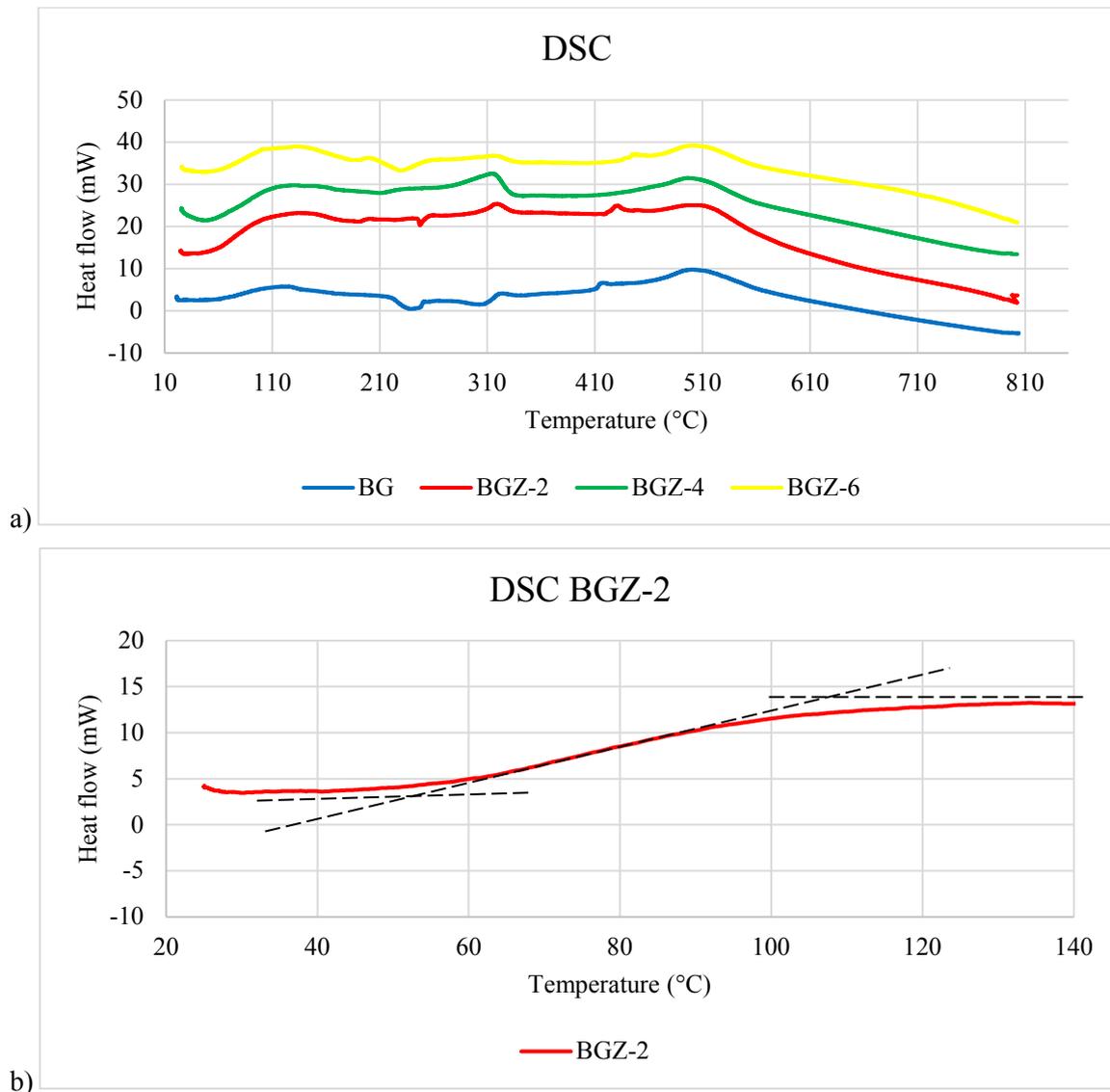
#### 4.2.2.4 Analisi termica

Le proprietà termiche dei film sono state studiate tramite calorimetria a scansione differenziale (DSC) e analisi termogravimetrica (TGA) in atmosfera inerte di Argon. I risultati sono mostrati in Figura 4.7a e 4.8.

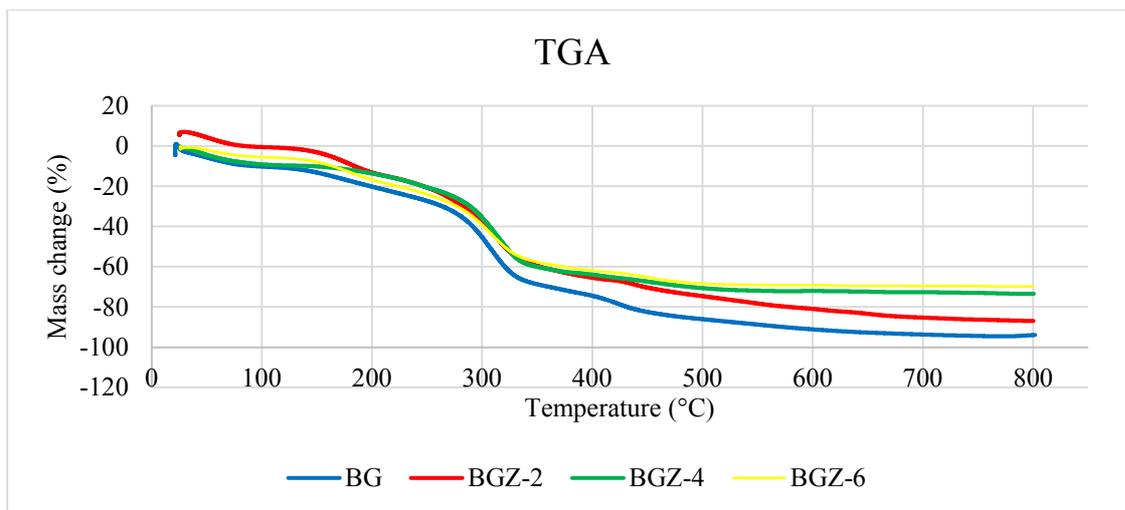
Nella prima parte del grafico DSC (Figura 4.7a) si può notare un cambio di pendenza abbastanza pronunciato per i film BGZ-2, BGZ-4 e BGZ-6, mentre è appena visibile nella curva del film BG. In questo intervallo di temperatura è possibile individuare la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ), ossia la temperatura al di sotto della quale un solido amorfo diventa più rigido e fragile, comportandosi come un solido vetroso. Graficamente si può determinare questa temperatura “tracciando due linee che proseguono idealmente la linea di base prima e dopo la transizione e la tangente al punto di massima pendenza della curva” [53]. In Figura 4.7b è mostrato un esempio di estrapolazione grafica della  $T_g$  nel caso del film BGZ-2, pari a circa 80 °C. Ripetendo l’operazione anche per i film BGZ-4 e BGZ-6 è possibile individuare valori analoghi di  $T_g$ , data la pendenza simile. Per il film di BG, invece, il valore di  $T_g$  è spostato a temperature più alte, intorno ai 90 °C.

Dalla TGA (Figura 4.8) si ottiene una curva di decomposizione termica. Come si può notare, i film BG, BGZ-2, BGZ-4 e BGZ-6 hanno un andamento piuttosto simile, caratterizzato da una prima riduzione di peso nell’intervallo 100-200 °C, dovuta all’evaporazione dell’acqua. In corrispondenza di questo intervallo di temperatura, si osserva anche un ampio picco nelle curve della DSC, equivalente al calore di evaporazione dell’acqua. Si può notare una seconda perdita di peso, pari a circa il 25% della massa, tra i 270 e i 350 °C, accompagnata da un altro picco nelle curve della DSC, causata dall’evaporazione del glicerolo. Una più lenta perdita di massa si registra tra i 350 ed i 500 gradi, oltre i quali la massa residua tende a stabilizzarsi fino agli 800 °C. Qui, la curva mostra una variazione complessiva di massa

del 94% nel film BG, pari a 87% nel film BGZ-2 e circa il 70% per i film BGZ-4 e BGZ-6, probabilmente proprio a causa della presenza di nZnO che non si decompone alle temperature di esercizio e stabilizza termicamente la struttura, portando ad un aumento del residuo carbonioso [54]. Anche in questo caso si osserva un picco nelle curve della DSC intorno a 500 °C dovuto alla degradazione termica del materiale. Considerando i grafici ottenuti, si può concludere che aggiungendo nZnO al film di BG si riduce la Tg e si osserva una minore riduzione della massa e un andamento della TGA meno ripido già a partire dai 350 °C. Inoltre, superati i 500 °C, la perdita di massa si stabilizza più velocemente nei film BGZ.



**Figura 4.7:** a) Grafico della DSC, b) Estrapolazione grafica della Tg per il film BGZ-2

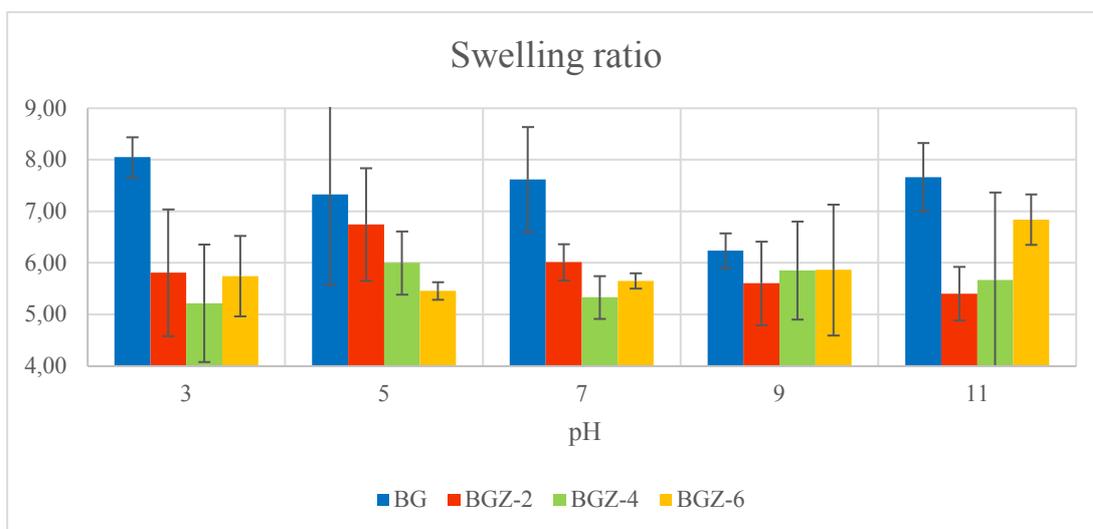


**Figura 4.8:** Grafico della TGA

### 4.3 Swelling

In Figura 4.9 sono mostrati i risultati della prova di rigonfiamento, espressi in termini di “swelling ratio”, come riportato nel paragrafo 3.3. I dati ottenuti fanno riferimento alla misura del peso del film dopo la prima mezz’ora di immersione in acqua. Questo passaggio ha indebolito molto il film, impedendone l’eccessivo maneggiamento e una seconda immersione.

Come si può notare, non è possibile osservare un andamento costante al variare del pH o della concentrazione di nZnO, ma in generale l’aggiunta di nZnO porta ad una diminuzione della capacità di assorbimento dell’acqua e di rigonfiamento del film. La causa di questa tendenza potrebbe essere attribuita al riempimento degli spazi vuoti nella struttura di BG da parte delle nanoparticelle di nZnO, riducendo la mobilità della matrice e impedendole di espandersi maggiormente [30]. I valori ottenuti sono comunque più elevati di quelli riportati in letteratura per film composti da BG [32, 42]; inoltre, sono anche migliori rispetto a quelli di un idrocolloide commerciale [39], dressing usato nella medicazione di ferite in presenza di essudato, proprio in virtù delle sue capacità assorbenti.



**Figura 4.9:** Risultati della prova di swelling

## 4.4 Valutazione dell'attività antimicrobica

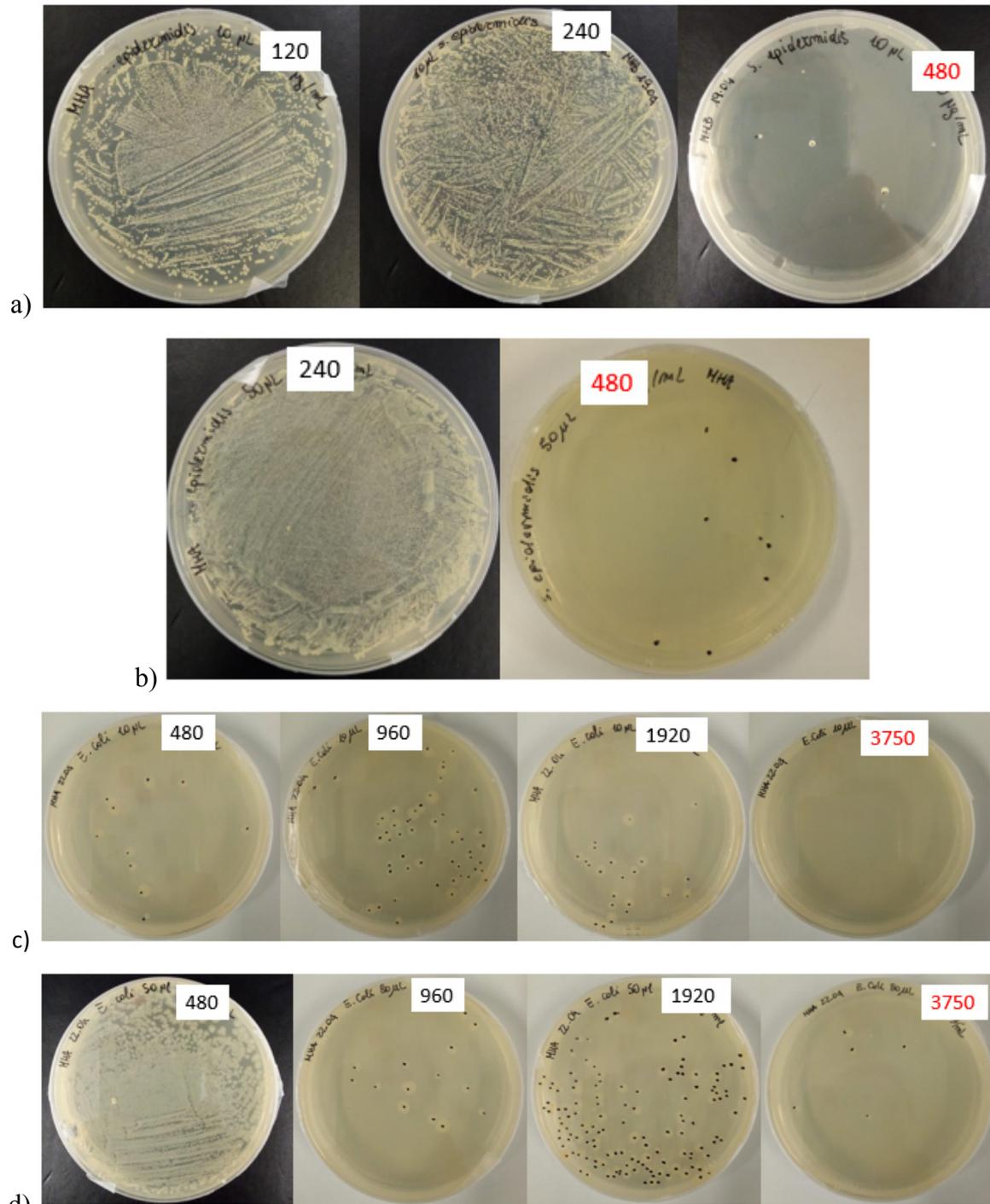
### 4.4.1 Metodo di micro-diluizione in piastre multiwell da 96 pozzetti

Trascorse le 12 ore di incubazione su un terreno MHB a 37 °C e con agitazione costante di 150 rpm, è stata effettuata l'analisi di torbidità dei pozzetti per valutare la MIC, corrispondente alla concentrazione del pozzetto in cui non è visibile crescita microbica ad occhio nudo. Per *S. epidermidis* non è stata osservata crescita microbica a partire da concentrazioni di nZnO di 120 µg/mL, mentre nella piastra contenente *E. coli* è stata considerata come MIC la concentrazione di nZnO pari a 480 µg/mL. In seguito, a partire dalla MIC, sono stati prelevati 10 µL di liquido colturale dai pozzetti contenenti inoculo e nZnO, e sono stati dispersi su piastre Petri per identificare la MBC. La procedura è stata ripetuta per tutte le concentrazioni di nZnO superiori alla MIC. In Figura 4.10 si possono osservare le piastre inoculate. Nelle piastre corrispondenti al valore di MIC e per concentrazioni pari a 240 µg/mL per *S. epidermidis* e pari a 960 µg/mL e 1920 µg/mL per *E.coli*, si nota ancora una cospicua crescita microbica. I valori di MBC risultano pari a 480 µg/mL e 3750 µg/mL, rispettivamente per *S. epidermidis* ed *E.coli*. Questi risultati sono riassunti in Tabella 4.2.

**Tabella 4.2:** Risultati metodo di micro-diluizione in piastre multiwell da 96 pozzetti

<b>Inoculo 10 µL</b>			
<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>	
MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
120	480	480	3750
<b>Inoculo 50 µL</b>			
<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>	
MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
120	480	480	3750

Come si può notare, i valori di MIC e MBC sono maggiori nel caso di *E. coli*, poiché essendo un batterio Gram (-), è generalmente più resistente all'azione di nZnO [30] ma sono indipendenti dalla quantità di inoculo testata (10 µL e 50 µL).

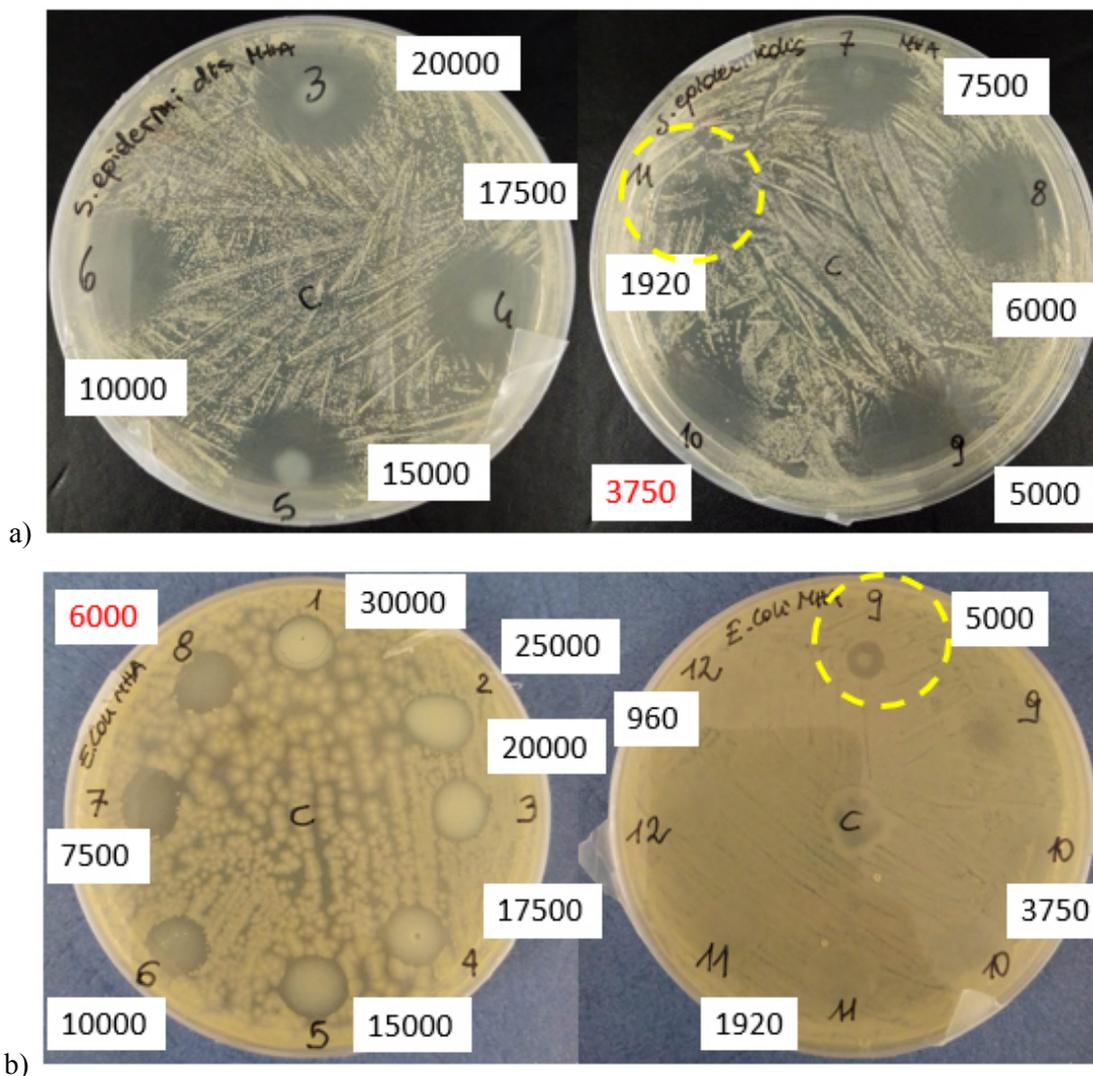


**Figura 4.10:** Colture di a) *S. epidermidis* relative alla piastra multiwell con un inoculo di 10  $\mu\text{L}$ , b) *S. epidermidis* relative alla piastra multiwell con un inoculo di 50  $\mu\text{L}$ , c) *E. coli* relative alla piastra multiwell con un inoculo di 10  $\mu\text{L}$ , d) *E. coli* relative piastra multiwell con un inoculo di 50  $\mu\text{L}$ . In rosso i valori di MBC

#### 4.4.2 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia

In questo metodo, le Petri contenenti l'inoculo disperso su un terreno solido MHA, sul quale sono state fatte colare gocce di nZnO in sospensione acquosa, sono state incubate a 37 °C per 12 ore. I risultati della prova sono stati ricavati misurando il diametro della zona di

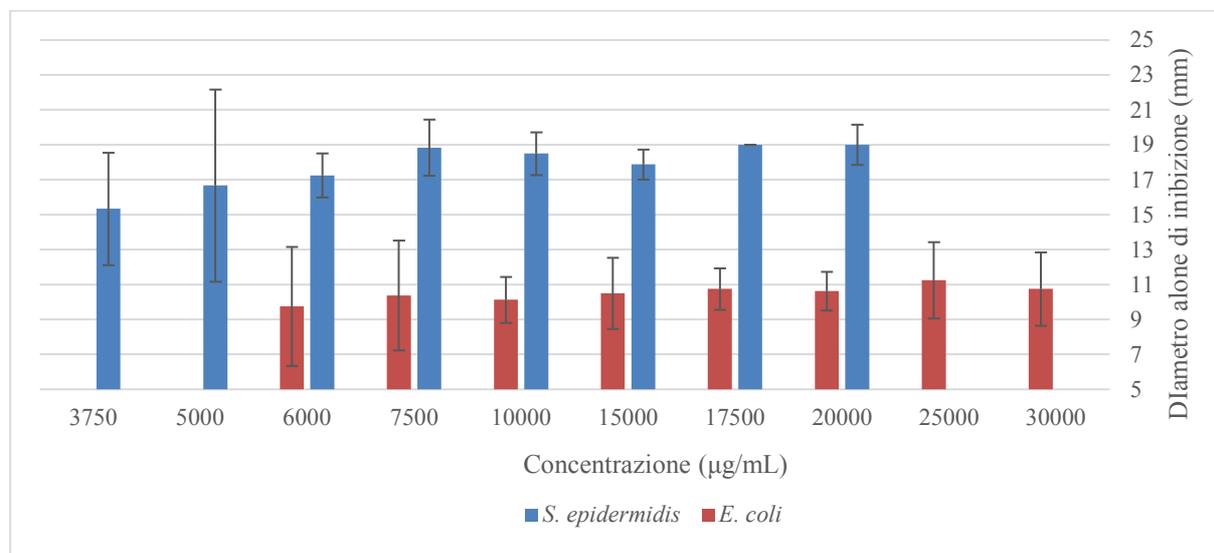
inibizione intorno alla goccia con l'ausilio di un righello. Dalla Figura 4.11 si può osservare che i valori di MIC, rispettivamente per *S. epidermidis* ed *E. coli*, sono pari a 3750  $\mu\text{g/mL}$  e 6000  $\mu\text{g/mL}$ . Per concentrazioni inferiori alla MIC, rispettivamente la 1920  $\mu\text{g/mL}$  per *S. epidermidis* e 5000  $\mu\text{g/mL}$  per *E. coli*, si può notare una parziale inibizione, caratterizzata dalla presenza di un alone chiaro in prossimità del punto in cui è stata depositata la goccia, ma con all'interno delle colonie batteriche ben visibili, che di fatto impediscono di delineare adeguatamente la reale zona di inibizione.



**Figura 4.11:** Risultati della prova della goccia per a) *S. epidermidis* e b) *E. coli*. In rosso i valori di MIC. Cerchiate in giallo le concentrazioni di nZnO più basse della MIC per le quali si nota una parziale inibizione

In Figura 4.12, sono mostrati gli andamenti del diametro di inibizione per *S. epidermidis* ed *E. coli*, i quali rimangono piuttosto costanti ad alte concentrazioni di nZnO, per poi decrescere lentamente in prossimità della MIC. Come evidenziato precedentemente, anche i risultati di questo test dimostrano che *E. coli* è più tollerante all'azione antimicrobica di nZnO rispetto ad *S. epidermidis* e lo si può dedurre non solo da un valore più alto di MIC, ma anche da un diametro di inibizione minore. Per questo motivo sono state testate

concentrazioni di nZnO più alte, pari a 25000  $\mu\text{g/mL}$  e 30000  $\mu\text{g/mL}$ , corrispondenti alle concentrazioni 1 e 2 riportate in Tabella 3.4, solo su *E. coli*.



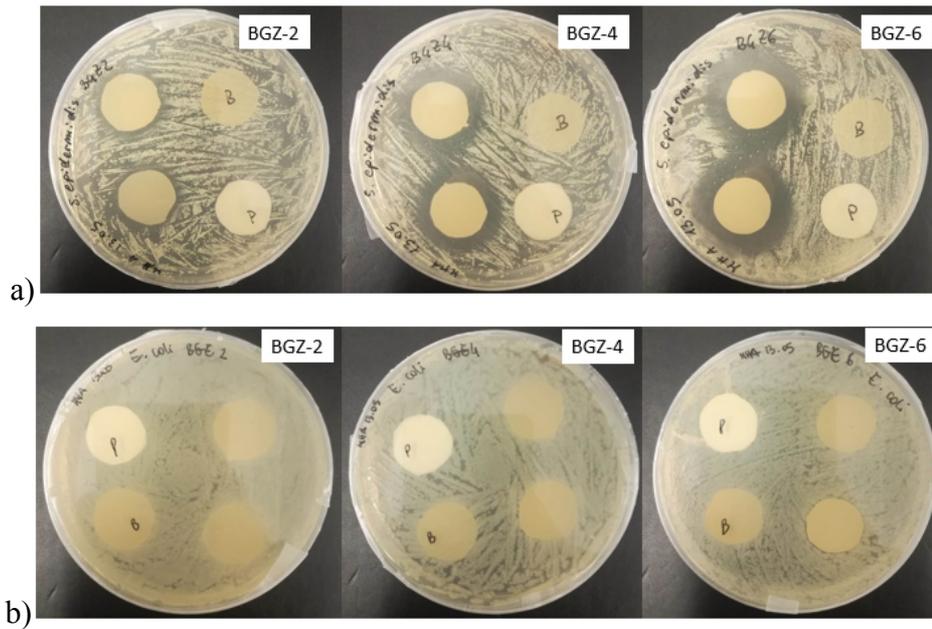
**Figura 4.12:** Andamento del diametro dell'alone di inibizione per *S. epidermidis* ed *E. coli*

#### 4.4.3 Metodo Kirby-Bauer della diffusione del disco

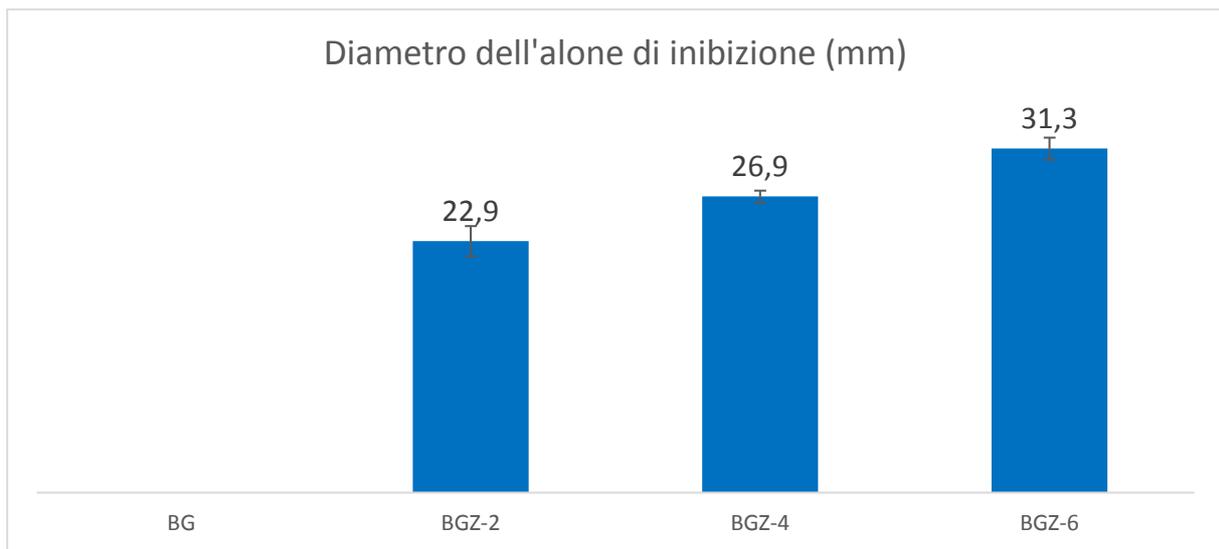
In questa prova, le Petri contenenti l'inoculo disperso su un terreno solido MHA, sul quale sono stati depositati i film BGZ, sono state incubate a 37 °C per 24 ore. È stato testato l'effetto antimicrobico dei film BGZ-2, BGZ-4 e BGZ-6, ridotti in dischi dal diametro di 20 mm, contro i batteri *S. epidermidis* ed *E. coli*. Su ogni piastra Petri è stato adagiato anche un disco di BG privo di nZnO e uno di carta filtro tal quale, usato come controllo negativo. In Figura 4.13 si possono osservare gli aloni di inibizione ottenuti.

I film BGZ risultano essere efficaci contro *S. epidermidis*, ma non contro *E. coli*, con il quale è stata osservata crescita microbica anche al di sotto del film, confermando ancora una volta la sua elevata resistenza all'azione di nZnO. Contrariamente a quanto riportato in letteratura, invece, non è stato individuato un alone di inibizione intorno ai film di soli BG. Questo fenomeno potrebbe essere giustificato da differenti ceppi batterici testati, una materia prima distinta e con caratteristiche di composizione e purezza in BG diverse, o dalle diverse condizioni sperimentali utilizzate come tempi e temperature di incubazione.

In Figura 4.14, è mostrato l'andamento crescente degli aloni di inibizione ottenuti alle varie concentrazioni di nZnO nel caso di *S. epidermidis*.



**Figura 4.13:** Aloni di inibizione ottenuti su a) *S. epidermidis* e b) *E. coli*. P = carta filtro; B = BG



**Figura 4.14:** Andamento del diametro dell'alone di inibizione per *S. epidermidis*

## Capitolo 5: Conclusioni e sviluppi futuri

A seguito di un esame della letteratura scientifica, sono state evidenziate le proprietà biologiche dei BG, come la stimolazione del sistema immunitario e della riepitelizzazione della ferita e l'attività antimicrobica, al variare della fonte di estrazione dei BG. Gli studi hanno individuato in Dectin-1 il recettore chiave a cui si legano i BG per favorire non solo la stimolazione di macrofagi, ma anche la proliferazione e la migrazione di fibroblasti, cheratinociti e cellule epiteliali. È stato riscontrato che i BG non hanno effetto citotossico sulle cellule, indipendentemente dalla fonte di estrazione, ma che i BG estratti dal fungo *S. commune*, con una concentrazione pari a 20 µg/ml, risultano ottimali per favorire la mobilità dei cheratinociti. In letteratura, l'attività antimicrobica dei BG è stata valutata usando il metodo Kirby-Bauer della diffusione del disco, insieme alla variante "Oxford penicillin cup method", quantificando il potere antimicrobico dei BG in base all'alone di inibizione formatosi intorno al disco, e il metodo di micro-diluizione in piastre multiwell da 96 pozzetti, in modo da stimare i valori di MIC e MBC. Le prove sperimentali descritte in letteratura sono state condotte su BG provenienti da diverse fonti e, in alcuni casi, sottoposti a trattamenti chimici e fisici quali solfatazione, carbossimetilazione e trattamento con raggi γ: ne è emerso che il trattamento chimico o fisico incide molto di più rispetto alla diversa fonte di estrazione sull'attività antimicrobica dei BG, sia in termini di diametro di inibizione che in termini di MIC, poiché si riduce il peso molecolare e aumenta la solubilità dei BG, che in questo modo penetrano più facilmente all'interno della membrana batterica.

La ricerca bibliografica è proseguita con lo studio delle proprietà più rilevanti per una medicazione avanzata, le quali sono state comparate con quelle fornite da un film in BG: è risultato che i BG possiedono ottime proprietà meccaniche come resistenza a trazione e compressione, basso modulo elastico ed elevato allungamento a rottura, con valori in linea con quelli di un film usato per il *wound dressing*. Inoltre, è stato constatato che anche la capacità di assorbire l'acqua e la permeabilità al vapore sono ottimali per una medicazione avanzata, ottenendo così un film caratterizzato dalle qualità meccaniche di un dressing in poliuretano e dalle proprietà di assorbimento di un hydrogel o di un idrocolloide. È importante, inoltre, che una medicazione avanzata sia dotata di proprietà antimicrobiche: a tal proposito, in letteratura, sono stati formulati film di BG funzionalizzati con nanoparticelle di ZnO, un potente antimicrobico efficace anche contro i batteri patogeni più resistenti.

Durante la fase sperimentale di questo lavoro di tesi è stato usato ZnO nanostrutturato, ottenuto in laboratorio per precipitazione chimica, con struttura cristallina di tipo wurtzite, area superficiale pari a 53,4 m<sup>2</sup>/g, volume specifico di 0,105 cm<sup>3</sup>/g e diametro medio dei pori pari a 12,6 nm. Il prodotto ottenuto è stato sottoposto a prove antimicrobiche contro il batterio Gram (+) *S. epidermidis* e il batterio Gram (-) *E. coli*, sia con il metodo di micro-diluizione in piastre multiwell da 96 pozzetti, testando diverse quantità di inoculo, che con il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, denominato "metodo della goccia". Dai risultati ottenuti si può affermare che *S. epidermidis* è molto più sensibile di *E. coli* all'azione di nZnO: nel test di micro-diluizione sono stati ottenuti valori di MIC e MBC rispettivamente pari a 120 µg/mL e 480 µg/mL per *S. epidermidis* e pari a 480 µg/mL e 3750 µg/mL per *E. coli*, ma non sono state notate differenze al variare della quantità di inoculo; risultati analoghi sono stati ottenuti dagli aloni di inibizione osservati con il metodo della goccia, con valori di MIC pari a 3750 µg/mL e 6000 µg/mL rispettivamente per *S. epidermidis* ed *E. coli*.

In seguito, è stata ottimizzata la procedura di formulazione dei film di BG, funzionalizzati con nZnO e dotati di attività antimicrobica. I film sono stati successivamente caratterizzati, sottoposti a prove di swelling e a test antimicrobici. Dai risultati della caratterizzazione si può affermare che i film ottenuti sono costituiti da materiale amorfo e presentano una superficie compatta, non porosa, in cui si può individuare dalle immagini SEM la presenza di strutture globulari disperse nella matrice; nello spettro ATR-FTIR è stata individuata la banda di assorbimento del gruppo -OH impegnato in legami idrogeno, i picchi relativi ai gruppi -CH<sub>2</sub>, -CO, -CC, -COC, caratteristici dei polisaccaridi, e i picchi relativi ai legami  $\alpha$  e  $\beta$ . Dall'analisi termica tramite DSC e TGA, invece, è stato possibile osservare delle differenze tra i film funzionalizzati con nZnO e quelli composti da soli BG: l'analisi DSC rileva una temperatura di transizione di fase vetrosa minore per i film BGZ (80°C circa) rispetto al film di BG (90°C circa), L'analisi TGA ha mostrato una minore perdita di massa nei film BGZ rispetto al film di BG, dovuta probabilmente alla presenza di nZnO che non si decompone durante l'analisi e stabilizza termicamente il film, aumentando il residuo carbonioso.

La prova di swelling ha evidenziato che la presenza di nZnO porta ad una diminuzione del rigonfiamento del film e, conseguentemente, ad una minor capacità di assorbimento dell'acqua. Questo andamento potrebbe essere dovuto alla tendenza di nZnO ad occupare gli spazi vuoti della matrice di BG, ostacolando l'espansione del film.

L'attività antimicrobica dei film ottenuti è stata testata contro i batteri *S. epidermidis* ed *E. coli* usando il metodo Kirby-Bauer della diffusione del disco, posizionando all'interno della piastra Petri due campioni di film BGZ, un campione di film di BG e un dischetto di carta filtro, usato come controllo negativo. I risultati ottenuti hanno confermato la maggiore sensibilità di *S. epidermidis* all'azione di nZnO rispetto ad *E. coli*: per il batterio Gram (+), infatti, sono stati osservati aloni di inibizione dal diametro crescente all'aumentare della concentrazione di nZnO, al contrario di *E. coli*, nelle cui piastre è stata rilevata crescita anche al di sotto del film. Contrariamente a quanto riportato in letteratura, invece, non è stato possibile osservare attività antimicrobica nei film di soli BG, probabilmente a causa di condizioni sperimentali diverse da quelle degli studi di riferimento, come l'uso di ceppi batterici diversi o di una diversa composizione dei BG impiegati.

In conclusione, da questo lavoro di tesi è stato possibile ottenere film con proprietà di swelling confrontabili con quelle di dispositivi per il *wound dressing* e dotati di attività antimicrobica. In futuro si potrebbero studiare sperimentalmente le altre proprietà importanti per l'utilizzo dei film di BG come medicazione avanzata, come le proprietà meccaniche e di permeabilità al vapore. Inoltre, si potrebbe approfondire la caratterizzazione dei film di BG e nZnO utilizzando l'analisi EDS (*Energy Dispersive Spectrometry*), che permette di individuare una sostanza anche se presente in piccole quantità: in questo modo potrebbe essere possibile rilevare la presenza di nZnO in corrispondenza delle strutture globulari osservate tramite SEM e chiarire la sua influenza sull'aspetto granulare della superficie del film.

Sarebbe interessante analizzare gli effetti dei trattamenti chimici, quali ad esempio solfatazione e carbossimetilazione, anche sui BG estratti da *S. cerevisiae*, indagando come possano influenzare l'interazione della matrice di BG con nZnO e il rilascio degli ioni Zn<sup>2+</sup>, uno dei meccanismi alla base dell'attività antimicrobica studiata. Infine, si potrebbe valutare anche l'attività antifungina e antivirale sia dei film composti da soli BG che funzionalizzati con nZnO.



## Bibliografia

- [1] F. Ceccini, N. Bevilacqua, B. Giannini, M. Morassut, *The potential use of yeast lees (1-3, 1-6)-beta-glucans as functional food ingredients*, Internet Journal Of Enology And Viticulture, N. 4/1, 2016
- [2] K. F. Cutting, *The cost-effectiveness of a novel soluble beta-glucan gel*, Journal of Wound Care Vol 26, No 5, 2017
- [3] J. Gripa, R. E. Engstada, I. Skjævelanda, N. Škalko-Basnetb, A. M. Holsæterb, *Sprayable Carbopol hydrogel with soluble beta-1,3/1,6-glucan as an active ingredient for wound healing – Development and in-vivo evaluation*, European Journal of Pharmaceutical Sciences 107, 24–31, 2017
- [4] J. Majtan and M. Jesenak, *β-Glucans: Multi-Functional Modulator of Wound Healing*, Quan-Bin Han, 2018
- [5] G. D. Brown and S. Gordon, *Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity*, Immunity, Vol. 19, 311–315, 2003
- [6] G. Seo, C. Hyun, S. Coi, Y. M. Kim, M. Cho, *The wound healing effect of four types of beta-glucan*, The Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2019
- [7] A. Chamidah, Hardoko, and A. A. Prihanto, *Antibacterial activities of β-glucan (laminaran) against gram-negative and gram-positive bacteria*, AIP Conference Proceedings 2017
- [8] K. Steward, *Gram Positive vs Gram Negative*, Technology Networks, 2019
- [9] M. Balouiri, M. Sadiki, S. K. Ibsouda, *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*, Journal of Pharmaceutical Analysis 6, 71–79, 2016
- [10] Eucast, *Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Version 9.0, 2021
- [11] J. Song, H. Chen, Y. Wei, J. Liu, *Synthesis of carboxymethylated β-glucan from naked barley bran and its antibacterial activity and mechanism against Staphylococcus aureus*, Carbohydrate Polymers, 242, 2020
- [12] The Clinical and Laboratory Standards Institute, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*, Ninth Edition, 2012
- [13] The Clinical and Laboratory Standards Institute, *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents*, 1999
- [14] W. A. A. Q. I. Wan-Mohtar, L. Young, G. M. Abbott, C. Clements, L. M. Harvey, B. McNeil, *Antimicrobial Properties and Cytotoxicity of Sulfated (1,3)-B-D-Glucan from the Mycelium of the Mushroom Ganoderma lucidum*, Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016
- [15] Y. Wang, S. Yao, Y. Guan, T. Wu, J. F. Kennedy, *A novel process for preparation of (1/3)- β -D-glucan sulphate by a heterogeneous reaction and its structural elucidation*, Carbohydrate Polymers 59, 93–99, 2005
- [16] H. Yuan, P. Lan, Y. He, C. Li, X. Ma, *Effect of the Modifications on the Physicochemical and Biological Properties of β-Glucan, A Critical Review*, Molecules, 2020
- [17] R. Kaur, M. Sharma, D. J. M. Xu, D. Agyei, *Structural Features, Modification, and Functionalities of Beta-Glucan*, Fibers, 2020

- [18] J. Ding, Y. Wang, S. Xiong, S. Zhao, Q. Huang, *Optimised methodology for carboxymethylation of (1→3)-β-D-glucan from Yeast (Saccharomyces cerevisiae) and promotion of mechanical activation*, International Journal of Food Science and Technology 48, 253–259, 2013
- [19] A. A. Khan, A. Gani, F. A. Masoodi, F. Amin, I. A. Wani, F. A. Kanday, A. Gani, *Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of -d-glucan extracted from baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae), Effect of γ-irradiation*, Carbohydrate Polymers 140, 442–450, 2016
- [20] N. R. Monks, C. Lerner, A. T. Henriques, F. M. Farias, E. E. S. Schapoval, E. S. Suyenaga, A. B. da Rocha, G. Schwartzmann, B. Mothes, *Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil*, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 281, 1 – 12, 2002
- [21] S. D. V. Medeiros, S. L. Cordeiro, J. E. C. Cavalcanti, K. M. Melchuna, A. M. da Silva Lima, I. A. Filho, A. C. Medeiros, K. B. F. Rocha, E. M. Oliveira, E. D. B. Faria, G. L. Sasaki, H. A. O. Rocha, V. S. F. Sales, *Effects of Purified Saccharomyces cerevisiae (1→3)-β-Glucan on Venous Ulcer Healing*, International Journal of Molecular Sciences, 13, 8142-8158, 2012
- [22] E. R. Ghomi, S. Khalili, S. N. Khorasani, R. E. Neisiany, S. Ramakrishna, *Wound dressings: Current advances and future directions*, Journal of Applied Polymer, 2019
- [23] E. Mele, *Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings*, Journal of Materials Chemistry B, 2016
- [24] L. L. Lima, T. B. Taeta, M. M. Beppu, I. M. de Oliveira Sousa, M. A. Foglio, A. M. Moraes, *Coated electrospun bioactive wound dressings: Mechanical properties and ability to control lesion microenvironment*, Materials Science & Engineering C, 100, 493–504, 2019
- [25] G. Suarato, R. Bertorelli, A. Athanassiou, *Borrowing From Nature: Biopolymers and Biocomposites as Smart Wound Care Materials*, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Vol. 6, 137, 2018
- [26] R. Xu, H. Xia, W. He, Z. Li, J. Zhao, B. Liu, Y. Wang, Q. Lei, Y. Kong, Y. Bai, Z. Yao, R. Yan, H. Li, R. Zhan, S. Yang, G. Luo, J. Wu, *Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement*, Scientific Reports, 2015
- [27] P. Jantrawut, J. Bunrueangtha, J. Suerthong, N. Kantrong, *Fabrication and Characterization of Low Methoxyl Pectin/Gelatin/Carboxymethyl Cellulose Absorbent Hydrogel Film for Wound Dressing Applications*, Materials, 2019
- [28] J. Chang, W. Li, Q. Liu, Y. Zhou, X. Chen, Q. Lyu, *Preparation, properties, and structural characterization of β-glucan/pullulan blend films*, International Journal of Biological Macromolecules, 140, 1269–1276, 2019
- [29] D. Sagnelli, J. J. K. Kirkensgaard, C. V. L. Giosafatto, N. Ogradowicz, K. Kruczala, M. S. Mikkelsen, J. E. Maigret, D. Lourdin, K. Mortensen, A. Blennow, *All-natural bioplastics using starch-beta-glucan composites*, Carbohydrate Polymers, 172, 237–245, 2017
- [30] M. Novák, A. Synytsya, O. Gedeon, P. Slepicka, V. Procházka, A. Synytsya, J. Blahovec, A. Hejlová, J. Copíková, *Yeast (1-3),(1-6)-d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties*, Carbohydrate Polymers, 87, 2496–2504, 2012

- [31] S. S. Azari, A. Alizadeh, L. Roufegarinejad, N. Asefi, H. Hamishehkar, *Preparation and characterization of gelatin/ $\beta$ -glucan nanocomposite film incorporated with ZnO nanoparticles as an active food packaging system*, Journal of Polymers and the Environment, 2020
- [32] M. H. Huang, M. C. Yang, *Evaluation of glucan/poly (vinyl alcohol) blend wound dressing using rat models*, International Journal of Pharmaceutics, 346, 38–46, 2008
- [33] G. Gultekin, C. Atalay-Oral, S. Erkal, F. Sahin, D. Karastova, S. B. Tantekin-Ersolmaz, F. S. Guner, *Fatty acid-based polyurethane films for wound dressing applications*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008
- [34] S. M. Lee, I. K. Park, Y. S. Kim, H. J. Kim, H. Moon, S. Mueller, H. Arumugam, Y. Jeong, *Superior absorption and retention properties of foam-film silver dressing versus other commercially available silver dressing*, Biomaterials Research, 2016
- [35] J. Koehler, L. Wallmeyer, S. Hedtrich, A. M. Goepferich, F. P. Brandl, *pH-Modulating Poly (ethylene glycol)/Alginate Hydrogel Dressings for the Treatment of Chronic Wounds*, Macromolecular Bioscience, 2017
- [36] Y. Matsumoto, Y. Enomoto, S. Kimura, T. Iwata, *Highly deformable and recoverable cross-linked hydrogels of 1,3- $\alpha$ -D and 1,3- $\beta$ -D-glucans*, Carbohydrate Polymers 251, 116794, 2021
- [37] X. Liu, Y. Niu, K. C. Chen, S. Chen, *Rapid hemostatic and mild polyurethane-urea foam wound dressing for Promoting wound healing*, Materials Science and Engineering C, 71, 289–297, 2017
- [38] T. Ge, N. Xing, J. Chen, J. Zhou, G. Su, J. Shi, , *Comparison among several foam dressings in the properties of water-absorption, water-locking and air permeability*, Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2012
- [39] O. J. Lee, J. H. Kim, B. M. Moon, J. R. Chao, J. Yoon, H. W. Ju, J. M. Lee, H. J. Parj, D. W. Kim, S. J. Kim, H. S. Park, C. H. Park, *Fabrication and Characterization of Hydrocolloid Dressing with Silk Fibroin Nanoparticles for Wound Healing*, The Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society, 2016
- [40] *Neoheal Moist Wound Healing*, URL: <https://kikgel.com.pl/en/products/neoheal/#-1>
- [41] H. Park, X. Guo, J. S. Temenoff, Y. Tabata, A. I. Caplan, F. K. Kasper, A. G. Mikos, *Effect of Swelling Ratio of Injectable Hydrogel Composites on Chondrogenic Differentiation of Encapsulated Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro*, Biomacromolecules, 2009
- [42] K. Muthuramalingam, S. I. Choi, C. Hyun, Y. M. Kim, M. Cho,  *$\beta$ -Glucan-Based Wet Dressing for Cutaneous Wound Healing*, Advances In Wound Care, Vol. 8, No. 4, 2018
- [43] S. A Lim, D. E. Lee, *Comparison of Usual Applying Foam Dressing Materials in Split Thickness Skin Graft Donor Site*, Journal of Korean Burn Society, 2003
- [44] *ASTM631-15*, Standard Terminology of Building Constructions, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2015, [www.astm.org](http://www.astm.org)
- [45] S. Amjadi, S. Emaminia, S. H. Davudian, S. Pourmohammad, H. Hamishehkar, L. Roufegarinejad, *Preparation and characterization of gelatin-based nanocomposite containing chitosan nanofiber and ZnO nanoparticles*, Carbohydrate Polymers, 216, 376–384, 2019
- [46] Su-Eon Jin and Hyo-Eon Jin, *Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nano/Microparticles and Their Combinations against Pathogenic Microorganisms for Biomedical Applications: From Physicochemical Characteristic to Pharmacological Aspects*, Nanomaterials, 11, 263, 2021

- [47] J. Grip, R. E. Engstad, I. Skjæveland, N. Skalko-Basnet, J. Isaksson, P. Basnet, A. M. Holsaeter, *Beta-glucan-loaded nanofiber dressing improves wound healing in diabetic mice*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 121, 269–280, 2018
- [48] J. Grip, R. E. Engstad, I. Skjæveland, N. Skalko-Basnet, M. Holsaeter, *Sprayable Carbopol hydrogel with soluble beta-1,3/1,6-glucan as an active ingredient for wound healing – Development and in-vivo evaluation*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107, 24-31, 2017
- [49] F. Elg, J. Posnett, S. Hunt, *Cost-effectiveness of soluble beta-glucan gel in hard-to-heal wounds: an evaluation*, *Journal Of Wound Care*, Vol. 28, No. 7, 2019
- [50] S. Mitra, B. Subia, P. Patra, S. Chandra, N. Debnath, S. Das, R. Banerjee, S. C. Kundu, P. Pramanik, A. Goswami, *Porous ZnO nanorod for targeted delivery of doxorubicin: in vitro and in vivo response for therapeutic applications*, *Journal of Materials Chemistry*, 48, 2012
- [51] Sigma Aldrich, *IR Spectrum Table & Chart*, 21 Giugno 2021, <https://www.sigmaaldrich.com/IT/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>
- [52] G. Socrates, (2001), *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd
- [53] P. Stagnaro, G. Luciano, R. Utzeri, *La calorimetria differenziale a scansione e l'analisi termogravimetrica nella caratterizzazione termica dei materiali polimerici*, Istituto per lo Studio delle Macromolecole del CNR, ISMAC-CNR sede di Genova

## Ringraziamenti

Al termine di questo percorso mi sento in dovere di ringraziare tante persone.

Innanzitutto, vorrei ringraziare le professoresse Barbara Onida e Francesca Bosco, per avermi dato la possibilità di svolgere al meglio questo lavoro tesi, nonostante le difficoltà causate dalla pandemia. Ringrazio Paolo per la sua pazienza e disponibilità, per i suoi suggerimenti e per avermi aiutato in ogni aspetto di questo lavoro di tesi. Ringrazio anche la dottoressa Chiara Mollea, per la sua disponibilità e per tutti i suoi consigli, che mi hanno aiutato durante la fase sperimentale.

Grazie ai miei compagni di corso, in particolare Chiara, Martina, Margherita e Giuseppe, per aver alleggerito le infinite sessioni di studio, alleviato il dispiacere delle bocciature e festeggiato con me anche i successi più piccoli.

Grazie a Fabrizio e Martina, per aver sopportato la mia ansia e il mio pessimismo e per non essere mai stati dei semplici coinquilini, ma la mia famiglia “su al Nord”. La vostra amicizia sarà per sempre qualcosa di prezioso. Grazie anche a Laura e Giacomo per avermi dimostrato affetto fin da subito, nonostante siano appena entrati nella mia vita.

Grazie a Caterina, Francesca e Carmen, per aver sempre trovato un modo per starmi vicino e per essere la prova che non serve vedersi tutti i giorni per volersi bene, perché la vera amicizia resiste al di là del tempo e dello spazio.

Ringrazio i miei zii e i miei cugini, per essermi stati accanto con un messaggio o una telefonata, per i “pacchi da giù”, per aver letto la mia tesi e per aver percorso km per vedermi discuterla.

Grazie a mio fratello, per il modo tutto suo di volermi bene, per avermi ascoltata, capita, consolata e presa in giro a qualsiasi ora del giorno e della notte. Grazie per essere sempre stato mio complice.

Ringrazio Davide, per essermi stato accanto sempre, per aver creduto in me prima ancora che lo facessi io e per avermi sempre promesso che sarebbe andato tutto bene. Grazie perché ogni giorno ti impegni a mantenere questa promessa e perché “non esiste cosa bella dove tu non c’entri”, compreso questo traguardo finale.

Infine, vorrei ringraziare i miei genitori, perché senza di loro non sarei mai arrivata fin qui. Grazie per avermi dato la possibilità di studiare lontano da casa, grazie per tutti i vostri sacrifici, grazie per aver sempre creduto che fossi all’altezza di questa sfida e grazie per non aver mai permesso che la paura di non farcela mi schiacciasse. Questa laurea la dedico a voi.