# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

Tesi di Laurea Magistrale



# OSSIDO DI CALCIO MICRO- E NANOMETRICO COME AGENTE ANTIMICROBICO

# Relatrici

prof. ssa Barbara Onida

prof. ssa Silvia Maria Ronchetti

prof. ssa Francesca Bosco

Candidato

Michele Montemurro

# **INDICE**

INTRODUZIONE	1
1. MATERIALI ANTIMICROBICI	2
1.1 Microrganismi patogeni	2
1.2 Antimicrobici e antibiotico-resistenza	5
1.3 Nanoparticelle antimicrobiche	10
1.3.1 Biossido di Titanio (TiO <sub>2</sub> )	12
1.3.2 Ossido di Zinco (ZnO)	13
1.3.3 Altri ossidi metallici	15
1.4 Ossido di Calcio (CaO)	16
1.4.1 Struttura e proprietà	16
1.4.2 Attività antimicrobica	16
2. MATERIALI E METODI	19
2.1 Campioni Ossido di Calcio	19
2.1.1 CaO ottenuto per precipitazione	19
2.1.2 CaO ottenuto per sintesi sol-gel	20
2.1.3 CaO commerciale	21
2.2 Caratterizzazione ossido	21
2.2.1 Diffrattometria a raggi X	21
2.2.2 Microscopia a Scansione Elettronica (SEM)	21
2.2.3 Analisi termogravimetrica	22
2.2.4 Analisi di fisisorbimento di azoto	22
2.3 Prove per la valutazione dell'attività antimicrobica	23
2.3.1 Allestimenti preliminari	23
2.3.2 Preparazione sospensioni	24
2.3.3 Metodo micro-diluizione in brodo	
2.3.4 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato	26
2.3.5 Metodo micro-diluizione in brodo con terreno modificato	26
3. RISULTATI	29
3.1 CaO ottenuto per precipitazione	29
3.2 CaO ottenuto per sintesi sol-gel	34
3.3 CaO commerciale	38
3.2 Valutazione attività antimicrobica	39
3.2.1 Metodo brodo micro-diluizione con terreno modificato	
3.2.2 Metodo brodo micro-diluizione	42

3.2.3 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato	51
4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	52
5. BIBLIOGRAFIA	54
RINGRAZIAMENTI	59

# **ACRONIMI**

AMR Resistenza antimicrobica

BET Modello Brauner-Emmet-Teler

CaO NPs Nanoparticelle di CaO

SEM Microscopio a scansione elettronica

Gram (+) Gram positivo

Gram (-) Gram negativo

MBC Minima concentrazione battericida

MHA Mueller Hinton Agar

MHB Mueller Hinton Broth

MIC Minima concentrazione inibente

PBS Tampone fosfato salino

ROS Specie reattive dell'ossigeno

SSA Area superficiale specifica

TGA Analisi termogravimetrica

UFC Unità formanti colonie

### INTRODUZIONE

I microrganismi patogeni, come batteri, virus e funghi, sono quegli agenti in grado di provocare una malattia nell'essere umano. Il loro impatto sulla società è storicamente notevole. La ricerca si è sempre mossa nella direzione di prevenire l'emergere e la diffusione di malattie infettive. La più importante è stata la ricerca e lo sviluppo di farmaci antimicrobici, sostanze chimiche che inibiscono la crescita dei microrganismi o ne provocano la morte. Si classificano in antibiotici, antivirali e fungicidi, a seconda del microrganismo prevalentemente colpito [1]. I farmaci hanno radicalmente ridotto l'impatto delle malattie infettive. Tuttavia, negli ultimi anni è emerso il problema della resistenza antimicrobica (AMR), ossia dell'evoluzione da parte di microrganismi patogeni di meccanismi protettivi contro i farmaci [2]. Batteri, funghi e virus evolvono, rispettivamente, resistenza antibiotica, antimicotica e antivirale. La resistenza antibiotica, che si esplica con varie modalità, è un problema emerso sin dall'introduzione dei primi antibiotici. Batteri resistenti a molteplici antibiotici sono emersi negli anni Sessanta [3]. Le infezioni da batteri antibiotico-resistenti rappresentano un carico notevole sui sistemi sanitari di tutto il mondo [4].

Una delle strategie per affrontare l'AMR è la ricerca su nanoparticelle con attività antimicrobica [5]. Le nanoparticelle possono avere diverse proprietà fisiche, chimiche e morfologiche, regolabili modificando i parametri di sintesi. Proprietà diverse determinano i meccanismi di attività antimicrobica. I materiali utilizzati sono principalmente metalli ed ossidi metallici; i più importanti sono TiO<sub>2</sub> e ZnO, materiali fotocatalitici [6]–[8]. Altri ossidi studiati ed utilizzati sono Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub> e MgO [9], [10].

L'ossido di calcio, CaO, è un materiale ceramico semiconduttore con struttura cristallina cubica. La sua attività antimicrobica è emersa già su slurry ceramici micrometrici [11], [12]. A partire dal 2013, sono emersi diversi studi che attribuiscono alle nanoparticelle una importante attività antimicrobica su vari microrganismi, compresi batteri Gram(+) e Gram(-) [13]–[15].

L'obiettivo della tesi è sintetizzare e caratterizzare campioni di particelle sub-micrometriche o nanometriche, valutandone le proprietà antimicrobiche. Il primo capitolo offre una panoramica generale su come si colloca l'uso di CaO nell'ottica della ricerca su nuovi materiali antimicrobici. Si offre una prima descrizione introduttiva sui patogeni e sui farmaci esistenti per combattere le infezioni. Si affronta l'antibiotico-resistenza, prima di inquadrare in questo contesto l'uso di nanoparticelle con attività antimicrobica. Infine, si colloca in questo contesto l'ossido di calcio, con particolare attenzione sulla letteratura scientifica preesistente. Nel secondo capitolo si entra nel dettaglio sulle procedure utilizzate per sintesi, caratterizzazione e test di attività antimicrobica delle particelle di CaO, sia di natura commerciale che di sintesi. Le vie di sintesi sono state o per calcinazione di idrossido oppure per sol-gel. Le caratterizzazioni fisico-chimiche condotte sulle particelle sono state la diffrattometria a raggi X, il fisisorbimento di azoto, l'analisi termogravimetrica e la microscopia elettronica a scansione ad emissione di campo. Per quanto concerne le prove antimicrobiche, esse sono state effettuate su batteri surrogati *Staphilococcus epidermidis* Gram(+) e *Escherichia coli* Gram(-).L'attività antimicrobica è stata valutata applicando il metodo della microdiluizione in brodo e il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato.

Vengono descritti i risultati delle prove nel terzo capitolo, illustrando in dettaglio i dati ricavati dalla sintesi, caratterizzazione e test antimicrobici sulle particelle. Nel quarto ed ultimo capitolo, si traggono le conclusioni del lavoro di tesi, descrivendo inoltre quali possano essere gli sviluppi futuri.

# 1. MATERIALI ANTIMICROBICI

# 1.1 Microrganismi patogeni

Per agente patogeno in biologia si intende, nell'accezione più ampia del termine, un qualsiasi organismo o agente in grado di provocare una malattia nell'organismo umano. Il termine deriva dal greco, combinazione di due termini: πάθος, pathos, "sofferenza", e -γενής, -genēs, "generatore di". Quando un agente patogeno infetta e si moltiplica nei tessuti di un organismo vivente, con conseguente reazione da parte di quest'ultimo, si verifica un'infezione. Qualora l'infezione comporti l'insorgere di una malattia nell'organismo coinvolto, si descrive quest'ultima con il termine "malattia infettiva". Le malattie infettive possono essere provocate da una vasta gamma di possibili agenti patogeni [1], come batteri, funghi o virus. Molti agenti patogeni sono a rigore dei microrganismi, ossia degli organismi con dimensioni microscopiche, inferiori ai  $100 \mu m$  [16].

Nel corso del Novecento e dei primi anni Duemila, grazie agli enormi progressi della microbiologia, sono state identificate e scoperte oltre 1400 specie differenti di agenti patogeni, dei quali circa un terzo è in grado di trasmettersi fra due individui, senza bisogno di *host* intermedi come cibo o altri *carrier*. Di seguito si descrivono brevemente le principali classi di microrganismi patogeni, con cenni alle malattie da essi provocati.

#### Batteri

Il termine batterio deriva dal greco "βακτήριον", bakterion, "bastone". Il nome deriva dal fatto che i primi batteri scoperti avevano una forma che richiamava l'aspetto di un bastoncello [17]. I batteri sono microrganismi unicellulari che dal punto di vista tassonomico costituiscono il dominio Bacteria. Essi sono organismi procariotici, al contrario dei funghi (organismi eucariotici) o dei virus (non categorizzati né come eucarioti né come procarioti). La cellula eucariotica e quella procariotica differiscono fra di loro per varie caratteristiche. La differenza più importante è legata al materiale genetico. Nelle cellule procariote, il materiale genetico (nucleoide) è libero nel citoplasma. Al contrario, nelle cellule eucariote il materiale genetico è contenuto in un nucleo, delimitato da una membrana nucleare. Le cellule procariotiche hanno organizzazione meno complessa. Sono assenti inoltre molti organelli cellulari.

Generalmente, le cellule procariotiche sono di dimensioni inferiori a quelle eucariotiche [18]. Le cellule procariotiche hanno dimensioni comprese fra 0,2 e 2 µm, con poche eccezioni. Le cellule eucariotiche hanno invece dimensioni dell'ordine di decine di micrometri. In generale, la velocità della crescita batterica è più rapida degli organismi eucariotici. Dal punto di vista morfologico, le cellule batteriche hanno diverse forme. Le più comuni sono quella sferica e quella bastoncellare, che prendono i nomi rispettivamente di "cocco" e "bacillo". Vi sono batteri per i quali, dopo la divisione cellulare, le singole cellule rimangono appaiate fra loro. Si possono quindi formale "diplococchi" o "diplobacilli" nel caso di coppie di cellule, oppure "streptococchi" o "streptobacilli" per catenelle di cellule[18]. Nel caso di cocchi che formano grappoli di forma e dimensioni irregolari, si parla di "stafilococchi". Esistono poi forme meno comuni, come i vibrioni oppure gli spirilli. Il DNA batterico, è presente sottoforma di molecola circolare all'interno del citoplasma. Il citoplasma è costituito dall'insieme del liquido intracellulare (citosol), una complessa miscela di sostanze disciolte in acqua di natura gelatinosa, e del materiale biologico presente, come il DNA batterico o i ribosomi [18]. Il contenuto cellulare è poi racchiuso dalla membrana plasmatica, entità che delimita la cellula. La membrana plasmatica separa quindi la cellula dall'ambiente esterno e regola gli scambi cellulari con quest'ultimo. Essendo una membrana semipermeabile, essa è in grado controllare l'ingresso e l'uscita di ioni, nutrienti e svariate altre sostanze[18]. Molti dei processi metabolici, come la respirazione cellulare, si svolgono nella membrana, in assenza di quegli organelli preposti a funzioni specifiche come nelle cellule eucariotiche. Infine, la membrana cellulare è preposta alla trasduzione di segnali cellulari che permettono l'adeguata risposta a stimoli esterni da parte delle cellule batteriche. Quasi tutti i batteri sono caratterizzati dalla presenza della parete cellulare, una struttura protettiva di superficie che circonda e racchiude la membrana citoplasmatica. La parete cellulare impartisce la forma della cellula e imprime una certa rigidezza, nonché protegge da eccessive pressioni osmotiche [19].

L'architettura della parete cellulare permette di discriminare fra due gruppi fondamentali di batteri, chiamati Gram-positivi e Gram-negativi in relazione alla diversa risposta rispetto alla colorazione di Gram, essa rappresenta il più comune metodo di colorazione usato per l'osservazione di microrganismi al microscopio ottico. Dopo la colorazione, i batteri Gram(+) appaiono di colore bluvioletto, mentre i batteri Gram(-) appaiono di colore rosso-rosa.

I batteri Gram(+) presentano una parete cellulare di spessore compreso fra 30 e 100 nm costituita da peptidoglicani (o mureina). Il peptidoglicano è un complesso polimero formato da amminoacidi e amminozuccheri. I batteri Gram(-) presentano una parete cellulare di struttura più complessa, di spessore molto inferiore, dell'ordine di pochi nanometri. L'esistenza di una parete cellulare di struttura e composizione chimica peculiare introduce un importante effetto barriera contro composti chimici potenzialmente dannosi per la cellula, come per esempio gli antibiotici. I batteri Gram(-) sono quindi generalmente più resistenti dei batteri Gram(+), nonché in grado di colonizzare ambienti ostili [18].

La classificazione in Gram(+) e Gram(-) è solo uno degli esempi di variabilità morfologica o strutturale fra i batteri. Questa grande variabilità si traduce in elevata capacità di adattamento e sopravvivenza per ciascuna specie batterica, in funzione delle esigenze. Di conseguenza, i batteri sono in grado di colonizzare quasi tutti gli habitat terrestri. Possono essere presenti fino a un miliardo di batteri in pochi grammi di terreno. Sono abbondanti anche nelle acque del pianeta. Alcuni batteri sono in grado di sopravvivere a condizioni estreme, come radioattività o valori di pH estremi, permettendo la loro sopravvivenza in ambienti come scorie radioattive o fonti geotermali. Essi sono in grado di vivere anche all'interno di organismi come piante, animali ed esseri umani [20]. [21].

Nel corpo umano, così come nelle piante e negli animali, vivono diverse centinaia di specie di batteri diversi. Essi sono collocati nelle vie aeree, sulla pelle, ma soprattutto nel tratto gastro-intestinale. L'insieme di questi microrganismi costituisce il microbiota.[22]

Le specie batteriche patogene per l'organismo umano sono un centinaio, una piccola frazione delle specie batteriche esistenti. Nonostante ciò, le infezioni batteriche sono responsabili di malattie in alcuni casi molto severe e dalla elevata contagiosità [22]. Ad esempio, la peste, causata dal batterio *Yersinia pestis*, ha colpito con ripetuti focolai epidemici fra il VI secolo d.C. ed il XIX secolo, con tassi di mortalità superiori al 30 %. Fra il 1347 ed il 1352, durante l'epidemia di peste nera, circa un terzo della popolazione europea venne colpito fatalmente dalla malattia. Oggi vengono registrati solo 600 casi all'anno, concentrati in pochi paesi [23]. Un altro esempio è la tubercolosi, una malattia che generalmente colpisce i polmoni. In circa il 90% delle infezioni, la malattia non si manifesta. Nel restante 10 % invece questa progredisce lentamente, risultando mortale nella metà dei casi se non trattata. Nel XVIII e XIX secolo la tubercolosi ha raggiunto il suo picco di contagiosità in Europa, arrivando ad essere causa di un quarto di tutte le morti. Grazie ai progressi nell'igiene e nella sanità pubblica, comprese le campagne di vaccinazione, la mortalità della tubercolosi si è ridotta di oltre il 90% negli anni Cinquanta del Novecento. Nei paesi in via di sviluppo rimane una malattia diffusa e con forte impatto sociale, causando 1,5 milioni di morti nel solo anno 2020 [24].

Un ultimo esempio degno di nota per attualità ed impatto sociale sono le polmoniti, infiammazioni degli alveoli polmonari. Causate sia da agenti batterici che da agenti virali, le polmoniti colpiscono 450 milioni di persone ogni anno, risultando responsabili di circa 4 milioni di morti ogni anno. Il più comune batterio patogeno responsabile è lo *Streptococcus pneumoniae*; altri batteri sono *Staphilococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* ed *Escherichia coli*. Le polmoniti colpiscono in particolare soggetti immunocompromessi, come bambini o anziani, risultando una delle principali complicazioni che possono sorgere per pazienti ospedalizzati nei paesi occidentali ed una delle principali cause di mortalità infantile nei paesi in via di sviluppo [25].

#### Virus

Dalla scoperta del primo virus nel 1898, sono state identificate e descritte in dettaglio oltre 9000 specie diverse, distribuite in quasi tutti gli ecosistemi del pianeta [26]. I virus sono elementi infettivi di dimensioni sub-micrometriche, i quali sono in grado di replicarsi soltanto all'interno delle cellule di un organismo vivente. Esistono in due fasi diverse, una extra-cellulare e l'altra intracellulare. Nella fase extra-cellulare, i virus si presentano sotto forma di una particella nucleoproteica detta virione. Essa è costituita da un involucro proteico, detto capside, che racchiude l'acido nucleico virale, il quale codifica l'informazione genetica. L'insieme dell'acido nucleico virale e del capside prende il nome di nucleocapside; in alcuni casi, quest'ultimo è ulteriormente rivestito da un ulteriore involucro, il pericapside o *envelope*. I virioni possono avere strutture molto variabili; le loro dimensioni sono comprese fra i 20 ed i 400 nm. Il virione non è in grado di riprodursi, ma solo di permanere nell'ambiente extracellulare e di infettare cellule ospiti. Nella fase intracellulare, l'elemento genetico usufruisce del metabolismo energetico e degli apparati biosintetici della cellula ospite per la riproduzione. I virioni così prodotti possono infettare altre cellule [18] [27] [26].

I virus che infettano gli esseri umani si trasmettono normalmente per via orizzontale, ossia da individuo a individuo. Le modalità di trasmissione possibili sono diverse: scambio di fluidi corporei, consumo di cibo o di acqua contaminati, inalazione di aerosol contenenti virioni o tramite organismi vettori, i quali fungono da carrier del virus. Generalmente, ciascun virus si trasmette attraverso solo uno o al più due di queste modalità. Si distinguono così i virus respiratori, i virus enterici, ecc. Più rara è la trasmissione per via verticale, cioè da madre a feto, per cui una madre infetta dà alla luce un bambino già infetto anch'esso [28]. La gravità delle infezioni virali negli umani varia notevolmente fra i virus patogeni [29]. Un esempio estremo della possibile minaccia rappresentata dalle infezioni è il vaiolo, malattia virale che ha colpito con ripetute ondate epidemiche tutto il pianeta negli ultimi due millenni. Nonostante sia stata eradicata con successo nel 1977 attraverso una campagna mondiale di vaccinazione, si stima che nel solo Novecento essa abbia mietuto 300 milioni di vittime [30]. Molti virus causano malattie molto meno severe, in alcuni casi asintomatiche. È il caso del comune raffreddore, causato da una varietà di virus, fra cui i coronavirus o i virus dell'influenza. Ad oggi, il principale fattore di rischio è rappresentato dai virus emergenti, i quali generalmente emergono per mutazioni di agenti virali preesistenti e non pericolosi per l'uomo [29]. L'esempio più attuale in questo senso è il SARS-CoV-2, un coronavirus emerso nel dicembre 2019 e responsabile della pandemia di COVID-19. Dal primo caso confermato, del 31 dicembre 2019, ad ottobre 2022, si sono verificati oltre 600 milioni di casi confermati ed almeno 6 milioni di vittime [31].

I virus vengono classificati principalmente in due modi: o con approccio tassonomico o con la classificazione di Baltimore. La classificazione tassonomica, di stampo linneano, raggruppa i virus tenendo conto delle loro affinità evolutive [32]. Tuttavia, il genoma relativamente piccolo e il rapido tasso di mutazione rende questa classificazione complicata. Viene comunemente utilizzata la classificazione di Baltimore, la quale discrimina i virus a seconda dei meccanismi di produzione dell'RNA messaggero (mRNA). Il genoma virale può essere a singolo o doppio filamento, costituito da RNA o DNA e richiedere o meno l'impiego della retrotrascrittasi [33]. Questa classificazione divide i virus in sette grandi gruppi.

#### Funghi

I funghi costituiscono un regno a sé stante di organismi eucarioti. Originariamente considerati parte del regno delle piante, successive analisi filogenetiche hanno portato a questa nuova classificazione. Pur condividendo somiglianze con le piante in termini di morfologia, habitat e la non-motilità, i funghi presentano delle proprietà che giustificano tale distinzione. Per esempio, al contrario delle piante, i funghi sono organismi eterotrofi e non fotosintetici. Inoltre, dal punto di vista strutturale, le pareti cellulari dei funghi sono formate principalmente da chitina, un polimero della N-acetilglucosammina, anziché da cellulosa [34]. La maggior parte dei funghi cresce con modalità filamentosa, formando una struttura tridimensionale che prende il nome di micelio, visibile a occhio

nudo, costituito da ife. Le ife sono delle strutture cilindriche, di diametro compreso fra 2 e 10 μm sono e possono presentare o meno dei setti. [37]

I funghi possono riprodursi per via sessuata o asessuata. In entrambi i casi, si verifica solitamente la produzione di spore. Le spore sono cellule riproduttive, le quali possono essere facilmente trasportate dall'aria, percorrendo anche lunghe distanze. Esse sono infatti di dimensioni micrometriche, generalmente inferiori ai  $5 \mu m$  [35].

Dal punto di vista infettivologico, le malattie causate da funghi vengono chiamate micosi. Esistono oltre 300 specie di funghi considerati patogeni per l'organismo umano. Le infezioni vengono classificate a seconda della parte del corpo colpita: possono essere superficiali, sottocutanee o sistemiche. I sintomi e la gravità della malattia sono molto diversi per i diversi funghi. Le infezioni cutanee, come la dermatofitosi, causano generalmente irritazioni cutanee o modificazioni della pelle. Nel caso di infezioni sistemiche, i sintomi sono più significativi e la malattia più severa. Possono insorgere infatti polmoniti o meningiti. Fra le infezioni sistemiche più diffuse e pericolose vi sono l'aspergillosi, la polmonite pneumocistica e la candidosi sistemica. Le micosi si verificano generalmente o per inalazione di spore presenti nell'aria oppure per contatto diretto col fungo, attraverso un taglio o una ferita. La malattia insorge generalmente in soggetti immunocompromessi, come gli anziani, i bambini, i pazienti sotto cura antibiotica o chemioterapica [36]. I funghi possono a volte vivere nell'organismo senza causare sintomi, fino a che il sistema immunitario dell'individuo infetto non si indebolisce a sufficienza. Le micosi vengono in questo senso a volte chiamate "infezioni opportuniste". Si stima che, mediamente ogni anno, circa 300 milioni di persone si ammalino a causa di micosi. Fra il 2017 ed il 2020, si è stimato che mediamente ogni anno muoiano circa 1,7 milioni di persone a causa di micosi. Le infezioni da funghi rappresentano una delle principali cause di mortalità infantile [37]. I funghi vengono classificati secondo tassonomia di natura linneana. Sono state descritte oltre 140,000 specie di funghi, ma si stima che esistano fra 2,2 e 3,8 milioni di specie distinte di funghi, in gran parte ancora sconosciute [38].

Le malattie infettive, indipendentemente dall'agente patogeno che le provoca, hanno un impatto forte ed imprevedibile sulla specie umana. Complessivamente, circa un quarto dei decessi nel 2011 è stato causato da malattie infettive. Nonostante il sistema immunitario sia in grado di proteggere l'organismo in molti casi, alcuni microrganismi riescono ad evadere questo sistema di difese. Uno degli aspetti fondamentali dei patogeni è l'elevatissima adattabilità, il che gli fornisce un vantaggio nel proteggersi dalle pressioni distruttive esterne, compresa la risposta immunitaria. L'evoluzione degli agenti patogeni è quindi fortemente dinamica nel tempo. Questo impone un continuo impegno nel prevenire la diffusione di malattie infettive e, in caso di contagio, sviluppare cure efficaci e sicure. In questa direzione vanno per esempio misure per garantire asepsi durante le procedure mediche, la vaccinazione e la sorveglianza alimentare, o misure restrittive come la quarantena o l'isolamento. I progressi più significativi nelle strategie di protezione sono comunque la ricerca e lo sviluppo di farmaci antimicrobici [39].

#### 1.2 Antimicrobici e antibiotico-resistenza

Un antimicrobico è una sostanza chimica in grado di inibire la crescita dei microorganismi o di ucciderli. Essi possono essere di origine naturale o sintetica. Più comunemente vengono classificati in funzione della loro selettività di azione, ossia di quale tipo di microorganismo attaccano in modo preponderante. Possiamo così distinguere fra: gli antibiotici, i quali colpiscono prevalentemente i batteri; gli antivirali, che colpiscono prevalentemente i virus; e i fungicidi, che colpiscono prevalentemente i funghi [39].

# Antibiotici

Esistono già nell'antica Roma testimonianze dell'uso di muffe, per applicazione topica, come cura di malattie infettive, per le loro proprietà antibiotiche. Tuttavia, fino alla fine dell'Ottocento questo tipo di cure rimangono un approccio di tipo empirico. Con i progressi della microbiologia nell'Ottocento

e primo Novecento, lo studio sugli antibiotici verte su un approccio più rigorosamente scientifico. La scoperta della penicillina, ottenuta dalle muffe del genere *Penicillium*, da parte di Alexander Fleming nel 1928 rappresenta una pietra miliare, aprendo la strada allo studio ed alla sintesi di antibiotici. Già nel 1931 entra in commercio il Prontosil, il primo antibiotico utilizzato con successo su umani, a base di molecole sulfamidiche. I decenni successivi rappresentano "l'età d'oro" degli antibiotici. Diversi microrganismi presenti in natura sono stati fonte di nuovi antibiotici, entrati poi in commercio, come la vancomicina. La progressiva scoperta di nuove molecole e classi di antibiotici ha permesso di riuscire ad agire su batteri penicillina-resistenti. In particolare, l'attenzione si è orientata prima sui batteri Gram(+) resistenti ai comuni antibiotici, come enterococchi o alcuni ceppi di *Staphilococcus aureus*. Verso la fine del XX secolo, la ricerca si è orientata su antibiotici efficaci contro i batteri Gram(-), naturalmente più resistenti. Inoltre, è aumentata la sensibilità verso la sintesi di molecole con effetti collaterali avversi meno importanti. La ricerca in questo senso è andata a rilento a partire dagli anni '70. 12 classi di antibiotici sono state lanciate con successo sul mercato fra il 1935 ed il 1968; invece, fra il 1969 ed il 2003 ne sono entrate in commercio solo due [40].

Gli antibiotici possono essere batteriostatici, ossia inibire la crescita batterica, oppure battericidi, ossia uccidere i microrganismi target. In generale, i meccanismi di azione degli antibiotici differiscono per le varie classi di antibiotici. A loro volta, diversi meccanismi di azione sono alla base dell'attività batteriostatica o battericida. Diverse classi di antibiotici inibiscono la sintesi proteica o di acido folico, il che si associa solitamente ad attività batteriostatica. Alcuni antibiotici inibiscono la sintesi della parete cellulare o la replicazione del DNA, con conseguente attività battericida. Infine, altri antibiotici inibiscono l'RNA-polimerasi, con conseguente attività sia batteriostatica che battericida, o si legano alla membrana citoplasmatica, con attività battericida. L'attività dell'antibiotico è in realtà influenzata da molti fattori. Uno stesso antibiotico potrebbe essere batteriostatico per un batterio e battericida per un altro. Diversi ceppi batterici di una stessa specie possono rispondere in modo diverso. Inoltre, se più antibiotici vengono somministrati in concomitanza, i loro effetti possono essere sinergici, additivi o antagonisti [41].

#### Antivirali

Nella comunità scientifica, fino agli anni '50 del Novecento permaneva forte scetticismo sulla possibilità di realizzare dei farmaci antivirali efficaci, con tossicità selettiva. La prima scoperta in questo senso arriva nel 1959, con la sintesi e la descrizione dell'idoxuridina, molecola dalla dimostrata azione inibitoria su virus con grandi DNA, come il virus herpes simplex. Essendo la molecola citotossica, il suo utilizzo è limitato ad applicazione topica; la sua scoperta rimane il primo esempio di antivirale. Negli anni '60 la ricerca di antivirali efficaci e sicuri si è dispiegata su tre fronti principali: herpes virus, poliomielite e vaiolo. Sul primo fronte, è arrivata la scoperta della trifluorotrimidina nel 1964; sugli altri due fronti, la ricerca ha dato riscontri positivi, ma ha poi perso slancio grazie all'efficacia dei vaccini contro queste due malattie. Nel 1972, con la scoperta dell'acicloguanosina, nota come aciclovir, viene formulato il primo antivirale con effetti collaterali pressoché assenti, combinati ad elevata efficacia e selettività. Negli anni Ottanta, con il progresso tecnologico relativo al sequenziamento genomico, la comprensione dei virus e delle loro caratteristiche è aumentata. Contemporaneamente, è emersa come un'emergenza mondiale l'epidemia da HIV. I due sviluppi hanno dato forte slancio alla ricerca sugli antivirali. Ad oggi, ne esistono 37 in commercio, mirati principalmente ad epatiti B e C, influenza A e virus herpes [42]. I farmaci antivirali agiscono secondo svariati meccanismi di azione, entrando in azione in stadi diversi del ciclo di vita virale. Alcuni inibiscono l'interazione fra virione e cellula; altri impediscono il rilascio del materiale genetico virale o la sua replicazione; infine, alcuni impediscono l'integrazione del materiale genetico virale con quello cellulare [43].

#### Fungicidi

Al contrario di batteri o virus, i funghi sono organismi eucariotici, come gli esseri umani. Poiché vi sono delle affinità in termini di morfologia e struttura delle cellule, è più difficile produrre degli

antimicotici che non interferiscano con le cellule umane. Di conseguenza, è maggiore il rischio di effetti collaterali avversi. Inoltre, fino alla fine del Novecento le infezioni micotiche erano oggetto di minori attenzioni. Nel 1983, la FDA americana si riferì a queste infezioni con il nome di "malattie orfane", cioè di malattie troppo rare per stimolare l'interesse di istituzioni di sanità pubblica o ricercatori. Solo verso la fine del secolo l'interesse verso le micosi è cresciuto, così come ha trovato slancio la ricerca di nuovi farmaci antimicotici [44].

La ricerca è cominciata in modo esteso fra gli anni Cinquanta e gli anni Settanta del Novecento. Sono state scoperte in questi anni una serie di molecole che possono fungere da antimicotici, agendo con meccanismi diversi. I polieni antimicotici sono una classe di molecole che interagiscono con l'ergosterolo, presente nella membrana cellulare dei funghi. Questo ne provoca la rottura, con conseguente morte cellulare. Gli azoli sono invece in grado di inibire la sintesi di ergosterolo; sono stati i primi farmaci a poter essere somministrati per via orale per combattere micosi sistemiche. Infine, altre molecole come le allilammine agiscono sempre sulla sintesi dell'ergosterolo, ma in step più avanzati, inibendo l'attività dell'enzima squalene monoossigenasi [45].

Nel complesso, lo sviluppo e la produzione di farmaci antimicrobici ha rappresentato un progresso scientifico estremamente importante. Questi farmaci hanno permesso di evitare milioni di decessi, garantendo importanti progressi per l'umanità. Tuttavia, i progressi fatti sono minacciati dal fenomeno della resistenza antimicrobica. Per resistenza antimicrobica si intende il fenomeno per il quale i microrganismi patogeni sviluppano meccanismi protettivi nei confronti degli antimicrobici, privando questi ultimi di efficacia. Per selezione naturale, gli organismi che meglio si adattano all'ambiente circostante sono quelli che riescono a sopravvivere e riprodursi. Di conseguenza, nel corso del tempo, i microrganismi in grado di sopravvivere a ripetuti attacchi di un antimicrobico cresceranno in prevalenza. Nel lungo termine, il processo comporterà l'instaurarsi di resistenza antimicrobica. Il fenomeno è quindi naturalmente presente in natura [2].

Vi sono tuttavia una serie di fattori che rendono la resistenza antimicrobica un problema allarmante; in generale, sono riconducibili all'uso eccessivo e spesso non necessario di agenti antimicrobici. Nell'industria agroalimentare, gli antibiotici vengono aggiunti al mangime animale sia come integratori alimentari sia come misura preventiva per ridurre il rischio infettivo. Pur riuscendo nell'intento di aumentare la resa di prodotti derivati da animali, il risultato è l'affermarsi di microrganismi farmaco-resistenti [2]. Nell'industria farmaceutica, lo smaltimento non appropriato di farmaci inutilizzati o scaduti può esporre microorganismi ad antimicrobici, scatenando l'evoluzione della resistenza antimicrobica.

In ambito clinico, tuttavia, si registrano tassi di utilizzo di antimicrobici eccessivi. In parte, questo fenomeno è dovuto all'iniziativa del paziente, che tenta un'autoterapia assumendo impropriamente farmaci. Il fenomeno è particolarmente acuto nei paesi in via di sviluppo, nei quali l'accesso ai farmaci è spesso poco rigidamente regolamentato ed ottenere cure mediche è spesso costoso o difficile [2]. Inoltre, la scarsa familiarità dell'opinione pubblica con la resistenza antimicrobica rende difficile limitare i tentativi di autoterapia, con conseguente aumento rapido della resistenza antimicrobica. D'altronde, anche fra il personale sanitario esiste il fenomeno di prescrizione spesso eccessiva di antimicrobici. Istituzioni internazionali come l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) raccomandano l'introduzione di normative per regolamentare questi aspetti [46].

Il fenomeno della resistenza antimicrobica si articola poi in diversi aspetti, a seconda del microrganismo coinvolto. I virus sviluppano meccanismi di resistenza antivirale; i funghi sviluppano meccanismi di resistenza antimicotica; i batteri sviluppano resistenza antibiotica [2].

Le terapie antimicotiche sono caratterizzate da bassa efficacia di base, peggiorata da diagnosi spesso tardive o erronee. Negli Stati Uniti, fra il 1980 ed il 1997, la mortalità da micosi sistemica è più che triplicata. Fra le cause dell'incremento così importante di mortalità, la principale è l'insorgere della resistenza antimicotica [47]. Alcuni funghi sono in grado di formare dei biofilm, in modo simile ai batteri, i quali sono resistenti a molti antimicotici convenzionali e spesso richiedono terapia chirurgica [47]. Molti antimicotici, già relativamente rari, stimolano facilmente fenomeni di resistenza

antimicotica; è il caso degli azoli o delle allilammine. *Candida auris*, uno dei funghi più comunemente responsabili di micosi sistemiche, è resistente a quasi tutti gli antimicotici in commercio [47].

La resistenza antivirale è un fenomeno osservato già a partire dagli anni Ottanta, solo una decina di anni dopo la commercializzazione dei primi farmaci antivirali. Ceppi di virus di influenza A resistenti ad amantadina e rimantadina hanno mostrato conseguenze cliniche già nel 1987 [48]. Il problema è emerso in particolar modo in Cina, dove questi farmaci sono vendibili senza prescrizione medica [48]. Per quanto riguarda l'HIV, a causa della grande popolazione virale nel singolo individuo e del rapido tasso di mutazione del virus, vi sono varianti resistenti ai farmaci, spesso prima ancora di essere esposte all'antivirale stesso. Altri virus che vengono trattati con farmaci antivirali, come herpes simplex o varicella zoster, hanno anch'essi progressivamente sviluppato resistenza antivirale a molti dei farmaci a disposizione per uso umano [48].

Il problema dell'antibiotico-resistenza è storicamente noto sin dalla scoperta e messa in commercio degli antibiotici. Negli anni Quaranta del Novecento, prima ancora della distribuzione su larga scala di penicillina, sono stati riscontrati ceppi sia di *E. coli*, batterio Gram(-), sia *S. aureus*, batterio Gram(+), resistenti alla penicillina [3]. Nel 1959 vengono per la prima volta identificati ceppi di batteri di *Shigella dysenteriae* che presentano multiresistenza antibiotica. Negli anni Sessanta è emerso lo *Staphilococcus aureus* meticillina-resistente, caratterizzato da resistenza molteplice contro diversi antibiotici. Negli anni successivi è emersa una situazione analoga per ceppi di altri batteri, come *Haemophilis influenzae* o *Neisseria gonhorroeae* [3]. Negli anni Ottanta e Novanta, l'introduzione sul mercato di fluorochinoni o cefalosporine ha rappresentato una soluzione temporanea al problema. Sono emersi batteri resistenti anche a questi antibiotici nel giro di pochi anni [3].

I meccanismi alla base dell'antibiotico-resistenza dipendono dallo specifico batterio e dalla sua interazione con gli antibiotici. La comprensione di questi meccanismi è la "conditio sine qua non" per affrontare il problema dell'antibiotico-resistenza. Le principali modalità con cui si esplica la resistenza antibiotica sono le seguenti:

- Inattivazione del farmaco. In questo caso, il batterio è in grado di sintetizzare degli enzimi che sono in grado di inattivare l'antibiotico. È il caso dei batteri in grado di produrre β-lattamasi, enzimi che impartiscono resistenza alla penicillina o alle cefalosporine. Lo *Staphilococcus aureus* meticillina-resistente è un esempio in questo senso. In alcuni casi, l'inattivazione avviene per modificazione chimica del farmaco per effetto di enzimi transferasi.
- Alterazione del sito di legame, con conseguente perdita di funzionalità antibiotica da parte della molecola.
- Riduzione dell'accumulo di antibiotico. Questo può avvenire a sua volta con due diverse strategie: l'aumento dell'attività delle pompe di efflusso o la riduzione della permeabilità membranale. Nel primo caso, l'antibiotico viene espulso dalla cellula abbastanza velocemente da minimizzare o evitare del tutto il danneggiamento. Nel secondo caso, la minore permeabilità, dovuta di solito a modificazioni delle porine, molecole transmembranose, riduce la quantità di farmaco effettivamente in grado di interagire con le cellule batteriche [49].

Parallelamente, nel corso degli anni, il numero di nuovi antibiotici approvati dalle istituzioni di farmacovigilanza è diminuito considerevolmente. Fra il 1983 ed il 1987, la FDA statunitense ha approvato l'uso di 16 nuovi antibiotici. Nello stesso arco temporale, fra il 2008 ed il 2012, ne sono stati approvati solo due. L'ultima scoperta di un nuovo agente antibiotico risale al 1987 [50].

In parte, la causa di questo declino è legata all'antibiotico-resistenza. Il costo per una casa farmaceutica per sviluppare un nuovo antibiotico oscilla fra gli 800 ed i 900 milioni di dollari. I tempi richiesti mediamente oscillano fra i 10 ed i 15 anni [51]. Inoltre, è elevato il rischio che il nuovo farmaco diventi obsoleto nell'arco di pochi anni, proprio a causa dell'emergere dell'antibiotico-resistenza. Di conseguenza, le case farmaceutiche investono sempre meno nella ricerca e nello

sviluppo di antibiotici. Ad esacerbare il problema, in alcuni casi, sono le rigide legislazioni esistenti o gli eventuali controlli dei prezzi imposti dai governi sui nuovi farmaci [51].

Escherichia coli è uno dei batteri più diffusi nel tratto gastro-intestinale degli umani e degli animali a sangue caldo in generale. Nonostante questo, è uno dei principali batteri patogeni, responsabile di gastroenteriti, infezioni alle vie urinarie, meningiti o intossicazioni alimentari. E. coli è resistente a penicilline e cefalosporine; diversi ceppi hanno mostrato resistenza anche ai fluorochinoni ed ai carbapenemi, classe di antibiotici spesso riservata a batteri con resistenza multi-antibiotica. Fra i batteri Gram(-), E. coli rappresenta la maggioranza delle infezioni nei paesi europei, nonché la causa più frequente di infezioni nosocomiali. Nel 2011, un focolaio epidemico nell'Europa centrale ha colpito oltre 4000 persone, con oltre 900 casi di sindrome emolitico-uremica [52].

Staphilococcus aureus è un batterio Gram(+) che causa infezioni di varia gravità, da infezioni della pelle e dei tessuti molli fino a infezioni pleuropolmonari o endocarditi. Le infezioni possono essere durature e contagiose; inoltre, *S. aureus* ha dimostrato un'elevata capacità di sviluppare resistenza agli antibiotici. Già nel 1961 era stato identificato un ceppo di *S. aureus* meticillina-resistente (MRSA). Nel 1997 è stato poi identificato un ceppo resistente alla vancomicina. Le infezioni da MRSA sono difficili da trattare, richiedendo l'uso prolungato di antibiotici, spesso contribuendo al fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

Klebsiella pneumoniae è un batterio Gram(-) responsabile di infezioni nosocomiali e non, le quali causano polmoniti, ascessi o colpiscono le vie urinarie. Il batterio non si diffonde nell'aria, per cui è necessario contatto diretto perché avvenga il contagio fra individui. Come per i batteri Gram(-) in generale, anche per K. pneumoniae i carbapenemi rappresentano l'ultima linea di difesa dalle infezioni. L'evolversi ed il diffondersi di ceppi resistenti ai carbapenemi rappresenta una problematica rilevante a livello di salute pubblica [49].

Streptococcus pneumoniae è un batterio Gram(+) naturalmente presente nelle vie respiratorie superiori. Tuttavia, in opportune condizioni, di solito in individui immunocompromessi, il batterio colonizza anche le vie aeree inferiori. L'infezione causa polmonite, prevalentemente nei bambini e negli anziani. L'infezione può causare anche meningiti; inoltre, possono insorgere complicazioni come la sepsi, che può risultare mortale. Alcuni ceppi batterici hanno sviluppato resistenza alla penicillina negli anni Novanta; negli Stati Uniti, fra il 1999 ed il 2000 il 63% delle infezioni da S. pneumoniae è stata causata da ceppi altamente resistenti alla penicillina; di questi, molti risultavano resistenti anche ad altri antibiotici, come eritromicina [53].

Acinetobacter baumanii è un batterio Gram(-), responsabile frequente di infezioni nosocomiali. I diversi tipi di infezioni comprendono polmoniti, meningiti o infezioni alle vie urinarie. Le infezioni sono di natura opportunistica, colpendo pazienti fragili; quasi tutti i campioni batterici di A. baumanii provengono da strutture sanitarie. Il batterio è in grado di resistere a lungo sulle superfici, permettendo il contagio anche per contatto con oggetti contaminati. A. baumanii ha sviluppato resistenza ad ampio spettro a molteplici antibiotici, compresi carbapenemi o minociclina. La ricerca di antibiotici efficaci su questo batterio è una priorità delle istituzioni preposte alla salute pubblica [49].

L'impatto sul sistema sanitario delle infezioni antibiotico-resistenti è molto forte. Nel solo 2019, 4,9 milioni di decessi sono stati associati ad infezioni antibiotico-resistenti in tutto il mondo. Quasi l'80% di queste infezioni sono infezioni delle vie respiratorie inferiori, intra-addominali o setticemie. In ordine decrescente, i batteri sopracitati rappresentano i principali responsabili di decessi da infezioni associate ad antibiotico-resistenza. Complessivamente, i ceppi antibiotico-resistenti di questi cinque batteri sono responsabili o corresponsabili di 3,3 milioni di decessi annuali.

Tutti i batteri sopracitati sono stati identificati dall'OMS come patogeni. Al momento, solo per *S. pneumoniae* è disponibile un vaccino [4].

Il problema dell'antibiotico-resistenza richiede soluzioni su più fronti. L'OMS stabilisce di limitare il più possibile l'esposizione agli antimicrobici, nonché affinare gli strumenti diagnostici per ridurre rischi di utilizzo improprio di questi farmaci. Al tempo stesso, è necessaria la ricerca di nuovi antimicrobici; tuttavia, il problema è la crescente saturazione e la difficoltà di sintetizzare nuove molecole efficaci. Il problema è particolarmente acuto per gli antibiotici. La biotecnologia può quindi

intervenire, fornendo strategie per affrontare infezioni da microrganismi resistenti a molteplici antimicrobici. Fra le possibili soluzioni di interesse scientifico, una delle più promettenti e rilevanti è l'utilizzo di nanoparticelle con attività antimicrobica [54].

# 1.3 Nanoparticelle antimicrobiche

I materiali nanostrutturati sono materiali costituiti da unità di dimensioni sub-micrometriche o nanometriche in almeno una direzione. Questi materiali esibiscono proprietà size-dependent, ossia che sono funzione non solo della chimica del materiale ma anche delle dimensioni. I nanomateriali vengono comunemente classificati in funzione di quante delle loro dimensioni nello spazio sono sotto i 100 nm. Distinguiamo fra materiali 3D, 2D, 1D e 0D. I nanomateriali tridimensionali (3D) non sono confinati in nessuna delle tre dimensioni sotto i 100 nm, ma sono costituiti da unità strutturali (come grani cristallini) di taglia nanometrica. I materiali 2D, nanofilm, presentano uno spessore inferiore ai 100 nm. I materiali 1D, nano-fili o nanowires, hanno una sola dimensione più estesa dei 100 nm. Infine, i materiali 0D sono le nanoparticelle, materiali le cui dimensioni nello spazio sono tutte inferiori ai 100 nm [55].

Le nanoparticelle con attività antimicrobica vengono realizzate generalmente in metalli o ossidi metallici. Esse rappresentano un approccio tecnologicamente innovativo e promettente dal punto di vista scientifico. Vi sono diversi vantaggi nel percorrere questa direzione. È possibile regolare le proprietà delle NPs in modo da massimizzarne l'efficacia, a seconda delle esigenze. Inoltre, sulla base dei meccanismi di azione riportati in letteratura, i microrganismi sviluppano raramente resistenza alle nanoparticelle. Le NPs rappresentano degli agenti antimicrobici a basso costo, efficienti e di preparazione relativamente semplice. È possibile ingegnerizzare le nanoparticelle giocando sulle proprietà fisico-chimiche e morfologiche, in modo da adattarle all'ambiente di impiego. In questo modo è possibile creare degli agenti microbici efficaci, che possono essere attivati da condizioni fisico-chimiche specifiche, come pH o temperatura [5]. L'ingegnerizzazione può essere finalizzata anche a ridurre e minimizzare gli effetti collaterali sull'organismo. Infine, al momento vi sono pochi microrganismi che presentano resistenza nei confronti delle nanoparticelle. Permangono comunque delle criticità nell'impiego di nanoparticelle. Le NPs sono generalmente stabili e possono accumularsi nell'ambiente, diffondendosi per via aerea o acquatica [5]. Poiché esse potrebbero avere effetti imprevedibili su microrganismi non obiettivo dell'attività antimicrobica, con potenziali effetti citotossici, sono necessari test comprensivi e rigorosi per approvarne l'uso. Inoltre, il potenziale delle NPs è legato all'area superficiale, la quale diminuisce in caso di agglomerazione o aggregazione, spesso associate a scarsa solubilità e causa di precipitazione o sedimentazione [5].

Vi sono molteplici fattori che influenzano l'efficienza delle NPs nella loro attività antimicrobica [5]:

- Taglia ed area superficiale specifica (SSA): NP con taglia piccola (< 30 nm) riescono a penetrare nelle cellule batteriche, specie se possiedono potenziale zeta positivo. Le membrane batteriche, infatti, sono generalmente cariche negativamente. Di conseguenza, particelle con carica superficiale positiva sono elettrostaticamente attratte dalla membrana. L'interazione nanoparticella-membrana che ne risulta è di conseguenza potenzialmente più efficace nell'attività antimicrobica. In generale, taglie più piccole sono correlate a SSA maggiori. A parità di volume, aumentano così i siti attivi che possono interagire con le cellule batteriche, rendendo più intense le interazioni.
- Forma e morfologia delle NPs: modificando i parametri di sintesi, come i precursori, le procedure o le temperature, è possibile ottenere morfologie diverse. Ciascuna morfologia si associa a specifiche proprietà fisico-chimiche, le quali si riverberano sull'attività antimicrobica. Fra le morfologie possibili vi sono: sfere, core-shell, nanotubi, nanorods o hollow nanoparticles (nanoparticelle cave).
- Attività fotocatalitica: i ROS (Reactive Oxygen Species) sono specie reattive e fortemente ossidanti. Questi radicali, interagendo con componenti cellulari, disturbano fortemente il funzionamento della cellula, provocandone potenzialmente la morte. La loro formazione

- avviene generalmente sulla superficie delle NP a contatto con un mezzo acquoso. È un meccanismo proposto per molti ossidi metallici, come ZnO [8] o lo stesso CaO [11] È considerato il principale meccanismo di attività per molte nanoparticelle di ossidi metallici, nonché il meccanismo più studiato [56].
- <u>Carica superficiale:</u> la maggior parte dei batteri presenta carica superficiale negativa sulla superficie della membrana più esterna, in virtù della presenza di gruppi carbossilici, fosfati ed amminici. In generale, NPs con potenziale zeta negativo risentono di fenomeni di repulsione elettrostatica, rendendo meno semplice l'interazione con i batteri e inficiandone l'attività antibatterica. Studi effettuati su nanoparticelle di Ag mostrano come, a parità di altri parametri, l'attività antimicrobica sia maggiore per NP negativamente cariche in superficie, rispetto a particelle neutre. Particelle cariche negativamente sono ancora meno efficienti [57].
- <u>Dispersione delle NPs:</u> la dispersione delle NPs si correla con la loro capacità di entrare in contatto con le cellule batteriche, in particolare con le membrane. Tanto più questo contatto è stretto, quanto più le NP sono in grado di perturbare l'equilibrio omeostatico delle cellule batteriche, potenzialmente uccidendole o inibendone la crescita. In uno studio condotto su nanoparticelle di CaO [58], è emerso che concentrazioni molto elevate hanno effetto deleterio. Questo avviene perché a concentrazioni elevate i fenomeni di sedimentazione ed agglomerazione diventano significativi, riducendo l'efficacia dell'attività antimicrobica.
- pH del mezzo: il pH del mezzo influenza l'attività antimicrobica del materiale. La correlazione fra pH ed attività antimicrobica è però poco chiara. È possibile che il pH possa influenzare altri parametri del sistema, biologici e non. Per esempio, la superficie delle NP viene alterata a seconda del pH del mezzo in cui sono disperse. Nel caso degli ossidi metallici, questo avviene perché, in mezzo acquoso o esposti all'umidità dell'aria, essi si rivestono di gruppi -OH superficiali. Le nanoparticelle in mezzo acquoso, a seconda del pH, si caricano positivamente o negativamente. In ambiente acido i gruppi ossidrili in superficie si protonano, formando gruppi -OH<sup>2+</sup>, con conseguente formazione di una carica superficiale positiva. Viceversa, in ambiente basico, i gruppi ossidrili si deprotonano, creando un eccesso di carica negativa. Queste alterazioni si riflettono di conseguenza sull'attività antimicrobica, in quanto la carica superficiale è correlata all'attività antimicrobica, come descritto poco prima.

L'attività antimicrobica delle nanoparticelle si esplica attraverso diversi meccanismi, influenzati dai fattori sopracitati. La ricerca sui meccanismi di azione possibili è ancora relativamente acerba. I principali meccanismi di attività antimicrobica sono i seguenti [59]:

• Generazione di Reative Oxygen Species (ROS): è il principale meccanismo di attività antimicrobica proposto per le nanoparticelle [56]. I ROS (Reactive Oxygen Species) sono specie ioniche altamente reattive, fra cui O²-•, OH• e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Per effetto fotocatalitico, quando il materiale assorbe un fotone con energia sufficiente (cioè pari o superiore al band-gap), un elettrone e-CB viene promosso dalla banda di valenza a quella di conduzione, lasciando una lacuna in banda di valenza h<sup>+</sup>VB. Le coppie elettrone-lacuna diffondono verso la superficie, dove possono reagire con le molecole circostanti. In particolare, le lacune reagiscono con molecole di acqua, strappando un protone H<sup>+</sup> e formando il radicale OH•. Gli elettroni riducono invece l'ossigeno, formando il radicale O²-•. Quest'ultimo, reagendo con i protoni H+ nell'intorno chimico, forma il radicale HO2•. Questo radicale infine può reagire con gli elettroni in banda di conduzione e-CB e con i protoni H<sup>+</sup>, formando il perossido H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le reazioni che si possono verificare, schematizzate, sono le seguenti:

$$h^{+}_{VB} + H_{2}O \rightarrow OH^{\bullet} + H^{+} (1)$$

$$e^{-}_{CB} + O^{2-} \rightarrow O^{2-} \bullet (2)$$

$$O^{2-}_{\bullet} + H^{+} \rightarrow HO_{2} \bullet (3)$$

$$HO_2 \bullet + H^+ + e^- CB \rightarrow H_2O_2$$
 (4)

Quest'ultimo è in grado di penetrare nella cellula batterica [56]. Quando le nanoparticelle penetrano nella cellula batterica, i radicali generati vanno a causare danni alle biomolecole, come gli enzimi respiratori, fino a provocare la morte cellulare. Questo meccanismo dipende dal tasso di generazione di ROS, funzione a sua volta della SSA, della diffusibilità e dalla natura elettrofila delle nanoparticelle.

- <u>Danneggiamento della membrana:</u> le nanoparticelle cationiche, cioè con potenziale zeta positivo, sono attratte elettrostaticamente dalla membrana esterna. Per i batteri Gram(-) la densità superficiale di carica negativa è maggiore, rendendo più intensa l'attrazione elettrostatica. Le nanoparticelle tendono ad accumularsi in corrispondenza della membrana. Le interazioni fra nanoparticelle e membrana indeboliscono le interazioni interne alla membrana stessa, rendendola più disorganizzata e quindi più permeabile. Questo favorisce l'ingresso delle NP all'interno della cellula, favorendo la rottura della membrana, con conseguente perdita di materiale organico. Inoltre, all'interno della membrana avvengono le reazioni collegate alla respirazione cellulare, le quali producono l'energia necessaria alla cellula. Le nanoparticelle perturbano l'insieme di queste reazioni, potenzialmente provocando la morte cellulare.
- Perturbazione dell'equilibrio omeostatico di ioni metallici: la concentrazione degli ioni metallici è un parametro fondamentale per garantire l'omeostasi cellulare, poiché gli ioni regolano funzioni metaboliche, assistendo coenzimi, catalizzatori o cofattori. Gli ioni metallici possono essere rilasciati per adsorbimento, dissoluzione o idrolisi. Interferendo con il metabolismo cellulare, essi causano la morte cellulare. Al tempo stesso, gli ioni possono interagire con la membrana, introducendo dei difetti che la rendono più permeabile e la danneggiano.
- <u>Disfunzioni in proteine ed enzimi:</u> gli ioni metallici possono interagire direttamente con proteine o enzimi catalizzando l'ossidazione delle catene laterali degli amminoacidi. Il risultato è l'inattivazione della proteina; per un enzima, questo implica la perdita di attività catalitica, con conseguente degradazione della proteina stessa. Inoltre, le nanoparticelle possono interagire con zolfo o fosforo, presenti nelle proteine e nel DNA rispettivamente. Il danneggiamento del DNA porta all'apoptosi cellulare. Per esempio, vi sono evidenze scientifiche che nanoparticelle di ossido di ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) sono in grado di inibire l'espressione del gene che conferisce resistenza alla tetraciclina in *S. aureus*, rendendo l'azione combinata antibiotico-NP più efficace [60].

I materiali utilizzati per preparare le nanoparticelle rappresentano un parametro molto importante nella loro attività antimicrobica. Materiali diversi presentano meccanismi di azione differenti. Per esempio, le nanoparticelle di argento agiscono principalmente danneggiando la membrana esterna e, in misura minore, perturbando e disturbando il metabolismo cellulare. Nel caso dell'ossido di zinco invece si verificano il rilascio di ioni metallici, il danneggiamento della struttura della membrana, l'inglobamento di NP nelle cellule batteriche e la carica superficiale delle nanoparticelle. Diversi ossidi metallici in forma nanometrica hanno dimostrato attività antimicrobica, in misura variabile [5]. I più studiati sono il biossido di titanio e l'ossido di zinco.

#### 1.3.1 Biossido di Titanio (TiO<sub>2</sub>)

Il biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>) è un composto inorganico e biocompatibile utilizzato in vari ambiti industriali: come filtro solare in cosmesi, colorante per vernici o pigmento bianco per gli alimenti. Uno dei primi studi sulle nanoparticelle risale al 1985, prima ricerca mirata alla fotocatalisi del materiale. Da allora, la possibilità del TiO<sub>2</sub> di generare ROS se irraggiato da UV in mezzo acquoso, i quali possono provocare la morte cellulare, lo ha reso un importante agente antimicrobico. Il biossido di titanio è un semiconduttore, il cui band-gap è di 3,23 eV per il rutilo e 3,06 eV per l'anatasio.

Quando TiO<sub>2</sub> assorbe un fotone con energia pari o superiore al band gap, alcuni elettroni vengono promossi alla banda di conduzione, lasciando delle lacune in banda di valenza. Questi elettroni possono poi interagire con molecole di ossigeno ed acqua, formando i ROS. Dal punto di vista cristallografico, il biossido di titanio esiste in tre forme distinte: anatasio, rutilo e brookite. I primi due polimorfi hanno struttura tetragonale, mentre l'ultima ha un reticolo cristallino ortorombico. La sintesi delle nanoparticelle può seguire diverse strade: le più comuni sono la sintesi sol-gel o metodi idrotermali. Stanno inoltre emergendo metodi di sintesi "green" e metodi basati su microonde. La modifica e la regolazione dei parametri permettono di ottenere specifiche proprietà fisico-chimiche, compresa la fase cristallina, impattando sull'attività antimicrobica del prodotto finale. La ricerca in generale si muove nella direzione di migliorare l'efficienza di generazione dei ROS. Un'altra problematica da affrontare è la tendenza all'agglomerazione delle nanoparticelle di titania disperse in soluzioni acquose. Oltre a ridurre la SSA, può verificarsi sedimentazione che riduce la concentrazione e rende meno semplice controllare il dosaggio. Altri aspetti riguardano tecniche per modificare il band gap, portandolo a valori più compatibili con fotoni nel visibile e tentativi di tradurre i promettenti risultati *in vitro* su applicazioni *in vivo* [7].

Il principale meccanismo di azione del biossido di titanio è la generazione dei ROS, ma sono stati proposti una serie di meccanismi concomitanti, in base alle caratteristiche fisico-chimiche delle nanoparticelle testate. Su 100 studi condotti sul meccanismo di azione del TiO<sub>2</sub>, i ROS erano coinvolti in 25 studi, mentre la permeabilizzazione della membrana in 22 ed il contatto fisico in 18 studi. 9 studi si sono invece concentrati sull'effetto sul DNA e sulle proteine, notando significativa decrescita nei coenzimi della catena respiratoria, con modificazione della membrana cellulare e sul DNA.

La caratterizzazione chimico-fisica delle nanoparticelle avviene con diverse tecniche di analisi. Tipicamente si ricorre a microscopia a scansione (SEM) o a trasmissione (TEM) e diffrazione ai raggi X per la caratterizzazione strutturale e morfologica. Esse sono utili per rilevare la presenza di fasi cristalline, come anatasio e rutilo. La caratterizzazione chimica viene invece condotta con spettroscopia Raman o ad infrarossi (FTIR). La spettroscopia ad infrarossi è utilizzata per rilevare gruppi funzionali di natura organica, a volte introdotti per funzionalizzare le nanoparticelle.

Il biossido di titanio è stato utilizzato con successo sia su batteri Gram(+) che su batteri Gram(-) come materiale antimicrobico *in vivo*. Fra i batteri Gram(+) vi sono *Bacillus cereus*, *Staphilococcus epidermidis* ed MRSA. Su quest'ultimo, in particolare, TiO<sub>2</sub> ha mostrato efficacia seconda solo ad antibiotici come ertapenemi o ampicilline. Sono state condotte diverse prove per valutare la MIC, la minima concentrazione inibente, su *E. coli* e su *S. aureus*, spesso usati come surrogati rispettivamente di batteri Gram(-) e Gram(+). In letteratura sono riportati valori di MIC compresi fra 0,04 e 2 mg/mL per *Escherichia coli* e fra 0,05 ed 1,5 mg/ml per *Staphilococcus aureus*.

La caratterizzazione dell'attività antimicrobica è stata fatta secondo il metodo diffusione in agar. Questo metodo consiste nell'uso di terreno solido (agar) su piastra, nel quale vengono scavati pozzetti. Questi ultimi vengono riempiti con sospensioni dell'agente antimicrobico che si testa (in questo caso, NPs). Essa è stata effettuata in diverse condizioni e con diverse concentrazioni. A causa però della bassa diffusibilità delle NP nell'agar, questa tecnica di caratterizzazione non permette di stimare l'attività antimicrobica. Le zone di inibizione riportate hanno diametri compresi fra 4 e 30 mm; in generale, queste prove vengono svolte in parallelo a prove di determinazione della MIC.

# 1.3.2 Ossido di Zinco (ZnO)

L'ossido di zinco è un materiale inorganico utilizzato in varie applicazioni. Come il biossido di titanio, con cui condivide molte proprietà, si utilizza come filtro solare nella cosmesi. Nell'industria elettronica, si utilizza per dispositivi optoelettronici o sensori. Nell'ambito biomedicale, ZnO trova impiego come materiale antimicrobico, spesso nel campo del wound dressing. ZnO è un semiconduttore di tipo n, con un band gap di 3,37 eV. Esibisce quindi proprietà fotocatalitiche quando irradiato da raggi UV. In forma nanostrutturata ZnO ha tossicità selettiva verso i batteri. Per effetto dell'irraggiamento e dell'assorbimento di fotoni UV, si formano coppie elettroni-lacune; gli elettroni

eccitati e promossi possono interagire con ossigeno o acqua, formando i ROS. Questi ultimi, come per il biossido di titanio, sono considerati il principale meccanismo di attività antimicrobica.

Dal punto di vista cristallografico, ZnO è caratterizzato da polimorfismo. Esistono tre differenti strutture cristalline: wurzite, zinco-blenda e salgemma. La wurzite, una struttura cristallina esagonale, è costituita da une cella elementare in cui ogni ione ossigeno tetraedrico è coordinato da quattro ioni zinco ed ogni ione zinco è tetraedicamente coordinato da quattro ioni ossigeno. È la struttura termodinamicamente stabile a temperatura ambiente. La zinco-blenda è invece metastabile in condizioni standard. La struttura cubica (salgemma) si forma per trasformazione da wurzite ad elevate pressioni.

L'attività fotocatalitica dello ZnO è limitata dalla rapida ricombinazione delle coppie elettronelacuna, dallo scarso assorbimento nel visibile e dalla fotocorrosione che si verifica in ambiente acquosa. La ricerca si muove quindi nella direzione di superare questi problemi: gli obiettivi sono la soppressione della ricombinazione elettrone-lacuna, l'estensione dell'edge di assorbimento al visibile e l'incremento della resistenza a corrosione.

La sintesi di nanostrutture di ZnO può seguire diverse strade. I possibili percorsi possono essere classificati in vie allo stato solido, vie allo stato liquido e vie allo stato vapore.

Le sintesi allo stato solido sono essenzialmente sintesi top-down basate sulla macinazione di polveri precursori fino a portare il materiale alla nanoscala. Si utilizzano composti inorganici come ZnCl<sub>2</sub>, miscelati ad un altro reagente come KOH ed addizionate ad un diluente come NaCl, che separa le nanoparticelle impedendone la crescita. Si utilizzano mulini a sfere, le quali possono essere in zirconia o acciaio. Durante o dopo la macinazione si effettua il trattamento termico di calcinazione. Le sintesi allo stato liquido sono metodi di precipitazione in mezzo acquoso, secondo vari metodi, che differiscono per precursori e condizioni di sintesi. La via più semplice è la co-precipitazione, in mezzo acquoso o organico. È una via scalabile, versatile e a basso costo, ma che offre la possibilità di regolare le proprietà finali dell'ossido di zinco modificando i parametri di sintesi. I precursori sono sali metallici, generalmente fatti reagire con un idrossido di un metallo alcalino. Si ottengono così nanoparticelle di ZnO. Una prima variante della sintesi per co-precipitazione è la biosintesi, ossia una sintesi in cui alcuni reagenti sono di origine organica; generalmente questi ultimi sono estratti di piante. Questi estratti contengono sostanze in grado reagire con precursori inorganici dello ZnO, oltre a stabilizzare le nanoparticelle. Un esempio di reazione di precipitazione per ZnO è riportato [8]:

$$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O + 2NaOH \rightarrow Zn(OH)_2 + 2NaNO_3 + 6H_2O$$

$$Zn(OH)_2 \xrightarrow{calcinazione} ZnO + H_2O_{(g)}$$

Un'altra variante è ricorrere a processi idro-termali o solvo-termali, sfruttando le temperature medioalte raggiungibili in autoclave. Un approccio leggermente diverso è il processo sol-gel, adatto per ottenere morfologie variabili. Il processo è basato sull'idrolisi di un alcossido metallico in mezzo acquoso, con formazione di un reticolo Me-O-Me.

Le sintesi in fase vapore sono sintesi come la physical vapour deposition (PVD), chemical vapour deposition (CVD) o l'epitassia (MBE). Sono sintesi che restituiscono strutture generalmente 1D e non nanoparticelle.

I meccanismi di azione dell'ossido di zinco non sono ancora del tutto chiari. Sono stati proposti: la generazione di ROS, il diretto contatto con la membrana cellulare, il danno al DNA e il rilascio di ioni metallici. Il contatto diretto con la membrana interferisce con la catena di trasporti degli elettroni, disturbando la respirazione cellulare. Il punto di zero charge (PZC) dello ZnO è 9,4, il che implica che la superficie sia carica positivamente in ambienti acidi, neutri o leggermente basici. Di conseguenza, si instaurano interazioni elettrostatiche con le membrane batteriche. Nanoparticelle di piccola taglia (<10 nm) sono in grado di penetrare nel citoplasma, inducendo danni nel DNA e la

conseguente apoptosi cellulare. Anche lo ione Zn<sup>2+</sup> è in grado di introdursi nel citoplasma, interagendo con gli organelli, causando disattivazione di proteine ed inibizione di enzimi.

L'attività antimicrobica delle nanoparticelle di ZnO, analogamente a quella del biossido di titanio, è stata testata valutando la MIC e l'alone di inibizione per metodo della diffusione in agar. I valori di MIC determinati per  $E.\ coli$  e per  $S.\ aureus$  sono compresi nel range, rispettivamente, di 15-1250 µg/ml e di 5-200 µg/ml. Come per TiO<sub>2</sub>, l'efficacia del materiale è maggiore per batteri Gram(+) che per batteri Gram(-), a riprova della loro intrinseca resistenza.

Per quanto riguarda la misura degli aloni di inibizione, i valori di diametro misurati oscillano fra i 10 ed i 25 mm. In generale, anche in questo caso i batteri Gram(-) mostrano maggiore resistenza rispetto ai batteri Gram(+) [8].

#### 1.3.3 Altri ossidi metallici

L'ossido di ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) è utilizzato in biosensori, come conservante per i cibi, nella drug delivery e come agente antimicrobico. Le sue proprietà magnetiche e la biocompatibilità lo rendono un ossido metallico di interesse biomedicale. I processi di sintesi comprendono la via sol-gel, la coprecipitazione, trattamenti idro-termali e le microemulsioni. Il meccanismo principale di attività antimicrobica è la generazione di ROS. Diversi studi hanno confermato l'attività antimicrobica di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nei confronti di diversi batteri, fra cui *S. aureus, S. epidermidis* ed *E. coli*. Inoltre, l'ossido ottenuto per sintesi green, con estratti di pianta fra i precursori, possiede un'attività antimicrobica ancora maggiore [9].

L'ossido di alluminio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), è di colore bianco e caratterizzato da esteso polimorfismo. La sintesi delle nanoparticelle può avvenire per via sol-gel, idrotermale o per ablazione laser. Quest'ultima è più ampiamente utilizzata perché rapida ed in grado di restituire prodotti altamente puri. Anche le nanoparticelle di allumina agiscono principalmente tramite la generazione di ROS. Gli studi sul materiale bulk, cioè non nanometrico, mostrano minore o assente attività antimicrobica. Per le NPs invece l'attività è più forte, a riprova del *size effect* caratteristico per i nanomateriali. L'effetto di inibizione della crescita è stato osservato su *E. coli* per uno ampio spettro di concentrazioni (10 – 1000 μg/mL) [9].

L'ossido di silicio, ossia la silice (SiO<sub>2</sub>), è un materiale con attività antimicrobica solo per SSA elevate. La non-tossicità rende la silice un buon candidato come agente antimicrobici, anche in applicazioni agroalimentari. In particolare, essa è in grado di agire sui biofilm batterici. Per biofilm [61] si intende un aggregato di microrganismi inglobati all'interno di una matrice polimerica extracellulare, spesso adesa ad una superficie. Generalmente, i biofilm sono più resistenti ad antibiotici, il che può rappresentare un problema, specie per batteri già in parte antibiotico-resistenti [62]. Comunemente, la silice viene utilizzata in combinazione con altri materiali antimicrobici. Generalmente, si utilizzano nanocompositi di silice in cui la seconda fase è un metallo, come Ag, Cu o Au. I compositi così descritti mostrano una buona attività antibiotica contro una vasta gamma di batteri, compresi *E. coli* e *S. aureus* [10].

L'ossido di magnesio è un altro candidato oggetto di studio per l'attività antimicrobica. I due meccanismi che vengono proposti sono l'incremento del pH, verso valori alcalini e la generazione di ROS. I primi studi riportano l'attività antimicrobica su *S. aureus* e su *E. coli*. Viene proposta la presenza di super-ossidi sulla superficie delle NP di MgO. Un altro meccanismo proposto è quello del danneggiamento della membrana cellulare, per adesione elettrostatica e conseguente morte cellulare. Le nanoparticelle di MgO sembrano essere attive anche quando utilizzate in compositi. Risultano essere un'opzione relativamente poco costosa, ampiamente disponibile e biocompatibile [10].

#### 1.4 Ossido di Calcio (CaO)

# 1.4.1 Struttura e proprietà

L'ossido di calcio, noto comunemente come "calce viva", è un materiale bianco, utilizzato sin dall'età medievale come materiale legante. È un solido ionico, stabile anche ad elevate temperature. Trova applicazioni in diversi settori, dalla catalisi allo smaltimento dei rifiuti, fino al drug delivery. Come altri ossidi alcalino terrosi nanometrici, le CaO NPs sono un interessante candidato come adsorbitori di composti tossici, fra cui idrocarburi clorurati, composti organo-fosforici o HCl. Le acque reflue di impianti industriali sono solitamente ricche di composti altamente inquinanti, i quali devono essere eliminati in modo sicuro. Le nanoparticelle o nanostrutture di CaO risultano inoltre essere di particolare interesse per la cattura e lo storage di CO<sub>2</sub>. Infatti, CaO è caratterizzato da una elevata capacità di adsorbimento, combinata ad un costo basso ed all'abbondanza di precursori [15].

L'ossido di calcio ha struttura cristallina cubica, tipo salgemma. Appartiene al gruppo spaziale Fm3m ed ha costante reticolare a = 4,799 Å. Nel bulk, il numero di coordinazione è 6 sia per gli ioni calcio che per gli anioni ossigeno [63]. È un ossido metallico semiconduttore con band gap elevato, pari a 3,48 eV.

La sintesi dell'ossido di calcio sotto forma di nanoparticelle avviene seguendo diverse strade. È possibile procedere per precipitazione, decomposizione termica, assistita da microonde o sol-gel [15].

#### 1.4.2 Attività antimicrobica

I primi studi sull'attività antimicrobica dell'ossido di calcio risalgono agli anni Novanta del Novecento. Sono stati testati in questo caso slurry ceramici, realizzati con polveri con taglia media di 2,7 μm [11], [12].

In un primo studio del 1995 [12], sono state testate una serie di polveri ceramiche micrometriche, fra cui CaO e ZnO, valutandone l'attività antimicrobica e l'azione batteriostatica o battericida. I microrganismi su cui sono state effettuate le prove antimicrobiche sono *Staphilococcus aureus* ed *Escherichia coli*.

La valutazione dell'attività antimicrobica è stata fatta attraverso la misura della conducibilità all'interno del pozzetto contenente la polvere, l'inoculo batterico ed il terreno. Il principio alla base di questa tecnica è che la conducibilità vari nel tempo e che essa sia correlata alla crescita batterica. Misurando la variazione di conducibilità nel tempo, è possibile esprimere il Detection Time, ossia il tempo necessario per il quale la variazione della conducibilità superi un valore soglia. Questo valore soglia, scelto arbitrariamente, rappresenta un valore che corrisponde ad una crescita batterica sufficientemente apprezzabile. In questo test, CaO ha mostrato importante attività antimicrobica su entrambi i batteri. Per *E. coli* si è determinata una minima concentrazione battericida (MBC) pari 5,4 mg/ml di CaO, un ordine di grandezza inferiore a quella determinata per ZnO a parità di condizioni (45,5 mg/ml). Per *S. aureus* invece i valori di MIC sono compresi fra 25 e 50 mg/ml; in questo caso, molto più alti rispetto a ZnO. Inoltre, si ha conferma di azione battericida su entrambi i microrganismi. Sempre in questo studio viene ipotizzato il meccanismo d'azione delle polveri CaO: una combinazione dell'effetto del pH e della generazione di ROS. Entrambi questi meccanismi si ipotizza siano attivi in prossimità dell'interfaccia liquido-solido, cioè nei dintorni della superficie delle particelle [12].

Un secondo studio, risalente al 2003 [11], viene ripetuto con layout della prova sostanzialmente identico, nonché sugli stessi microrganismi. In questo caso, l'obiettivo è la determinazione di valori di MIC e di MBC per CaO e ZnO, testati a parità di condizioni. Poiché la turbidimetria viene considerata inadatta a fornire un risultato quantitativo, ci si avvale del modello di Michaelis-Menten. Tracciando la curva della conducibilità in funzione del tempo per le varie concentrazioni testate, è possibile misurare il ritardo nel raggiungimento di una soglia arbitraria di variazione della conducibilità. Correlando quel ritardo con la cinetica della crescita batterica e dell'inibizione, è possibile esprimere MIC ed MBC. I valori di MIC e di MBC sono per entrambi i materiali dell'ordine di pochi mg/ml per entrambi i microrganismi. I valori di MIC e di MBC sono entrambi minori per *E*.

coli e per S. aureus. Di nuovo, CaO mostra attività antimicrobica più intensa su batteri Gram(-) piuttosto che su Gram(+). Inoltre, nello studio non si osserva alcuna attività antimicrobica dello ione calcio [11].

La ricerca sull'attività antimicrobica delle nanoparticelle di ossido di calcio è invece più recente. I primi studi sono infatti datati 2013. Questi studi riportano sintesi per precipitazione, a partire da precursori inorganici. Sono studi che confermano l'attività antimicrobica del CaO anche in forma di nanoparticelle [13], [14].

In un primo studio [13], le nanoparticelle vengono sintetizzate per via acquosa ma con assistenza di microonde. I precursori sono nitrato di calcio tetraidrato ed idrossido di sodio. Due soluzioni acquose di volume 50 ml, l'una 0,5 M Ca(NO3)<sub>2</sub>· 4H<sub>2</sub>O e l'altra 0,7 M NaOH vengono miscelate fra loro. Segue il trattamento in microonde, il raffreddamento ed il successivo lavaggio. Le nanoparticelle vengono caratterizzate con diffrattometria ai raggi X (XRD) e con microscopio elettronico a trasmissione ad alta risoluzione (HRTEM). Il risultato di questa sintesi è ossido di calcio monofasico e cristallino, in forma nanoparticellare. Dallo spettro XRD si ricava, per analisi di Debye-Scherrer, una taglia media dei cristalliti di 16 nm. Il valore è coerente con le analisi all'HRTEM, per la quale la taglia media delle NP è di 18 nm. Sono state condotte poi prove di attività antibatterica su P. aeruginosa, batterio Gram(-), e S. epidermidis, batterio Gram(+). Sono state effettuate prove con metodo della diffusione in agar per varie concentrazioni, così come prove broth micro-dilution, in multiwell, ricavando i diametri degli aloni di inibizione, le MIC ed MBC. Infine, vengono riportate immagini al FESEM, con analisi EDX (Energy Dispersive X-Ray analysis, EDX), per valutare l'aspetto delle cellule batteriche. Vengono determinate MIC ed MBC dell'ordine delle centinaia di mg/ml; esse sono più elevate per P. aeruginosa, Gram(-), che per S. epidermidis, Gram(+). Le immagini al FESEM mostrano estesi danni alle cellule batteriche, con rottura della membrana. L'analisi EDX evidenzia un accumulo delle CaO-NPs sulla membrana esterna, che permette di ipotizzare l'esistenza di un meccanismo d'azione antimicrobica connesso al danneggiamento della membrana [13].

In un secondo studio [14], la sintesi avviene per precipitazione in etilen-glicole e successiva calcinazione del prodotto intermedio, ossia idrossido di calcio. Per la sintesi dell'idrossido sono state preparate due soluzioni, l'una di Ca(NO3)2· 4H2O e l'altra di NaOH. Esse sono state miscelate e successivamente sottoposte a sonicazione. Dopo la filtrazione ed il lavaggio con acqua è seguita la calcinazione. Si è valutata la correlazione fra taglia delle NPs e tre diversi fattori: temperatura del trattamento, durata del trattamento, e velocità di riscaldamento. Le NP sono state poi caratterizzate con XRD, TGA e TEM. Le particelle ottenute, sulla base dell'analisi TEM, sono sub-micrometriche, di taglia compresa fra 130 e 180 nm; l'analisi XRD restituisce uno spettro di CaO monofasico puro. Per quanto concerne come i parametri del trattamento termico influenzino la taglia, l'unica significativa variazione è legata al tempo. Vi è una proporzionalità diretta fra il tempo del trattamento e la taglia finale delle NP. Sulla base di questi risultati, i campioni sono stati calcinati a 530 °C per 5, 10 e 15 h. Le prove antimicrobiche sono state effettuate su Lactobacillus plantarum, batterio Gram(+). La prova si è effettuata inserendo la sospensione batterica in provette contenenti la sospensione di polveri. Dopo 24 h di incubazione, 1 ml è stato prelevato dopo 6 e dopo 24 h e successivamente disperso su piastra con agar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco) per successiva incubazione. Da queste prove emerge che l'attività antimicrobica aumenta all'aumentare dei tempi di calcinazione. Questo viene giustificato ipotizzando che la calcinazione più lunga, pur riducendo la taglia e quindi verosimilmente la SSA finale, aumenta la purezza, massimizzando il numero di siti attivi non contaminati [14].

L'ultimo studio citato [58] rappresenta un esempio di sintesi "green", cioè sintesi che minimizzino l'impatto ambientale. Generalmente si basano precursori organici. Come per altri ossidi, per queste sintesi si ricorre ad estratti di piante. In questo caso si utilizza un estratto di menta piperita, il quale viene fatto reagire con cloruro di calcio in agitazione. Il precipitato finale viene filtrato e successivamente caratterizzato con SEM, analisi EDX e spettroscopia FT-IR. Sulla base dell'analisi SEM si ottengono in questo caso NP con morfologia plate-like, esagonali ed agglomerate fra loro. La

taglia media è di 58 nm. L'analisi EDX restituisce picchi associabili a Ca, C ed O, il che fa ipotizzare la presenza di carbonato superficiale. Questa ipotesi è ulteriormente confermata dallo FT-IR, il quale evidenzia un picco attorno agli 800 cm<sup>-1</sup>, caratteristico dei legami C-O. Le prove antimicrobiche sono state condotte su E. coli. Sono state effettuate sia la prova secondo metodo della diffusione in agar che una prova secondo metodo della micro-diluizione in brodo. Le prove condotte secondo questo metodo sono state effettuate previa esposizione ai raggi solari, nonché mantenendo il sistema in agitazione. La prova in agar ha permesso di determinare, sulla base della dimensione dell'alone di inibizione e del diametro del pozzetto, un indice di attività antimicrobica. Quest'ultimo è stato utilizzato per esprimere l'attività antimicrobica in funzione di tre parametri: l'irraggiamento solare, la concentrazione dell'inoculo e la concentrazione delle NPs. La seconda prova ha permesso di stimare MIC e MBC. Per quanto concerne i parametri e la loro influenza sull'attività antimicrobica, vi è una correlazione positiva con irraggiamento e negativa con inoculo, a parità di altri parametri. In altri termini, l'indice di attività antimicrobica aumenta sempre all'aumentare del tempo di esposizione ai raggi solari e diminuisce sempre all'aumentare della concentrazione dell'inoculo batterico. La concentrazione di NPs invece si correla all'indice antimicrobico con un andamento parabolico; concentrazioni troppo alte di CaO-NP hanno effetto negativo sull'attività antimicrobica. All'aumentare della concentrazione delle NPs, aumentano le interazioni fra queste ultime. Si riduce così la SSA "netta", ossia l'area superficiale effettivamente in grado di interagire con i batteri (non impegnata nell'interazione con particelle adiacenti). La MIC stimata è invece di 25 μg/ml; la MBC è compresa fra 75 e 100 µg/ml. Dalle immagini FESEM, si nota l'invasione all'interno delle cellule batteriche delle NP, con conseguente apoptosi [58].

#### 2. MATERIALI E METODI

# 2.1 Campioni Ossido di Calcio

I campioni di ossido di calcio oggetto del lavoro di tesi sono tre. Due campioni sono stati sintetizzati in laboratorio. Il primo campione, CaO-P, è stato ottenuto per calcinazione di Ca(OH)<sub>2</sub> ottenuto per precipitazione acquosa. Il secondo campione CaO-SG è stato ottenuto per via sol-gel. Il terzo campione, CaO-C, è invece di natura commerciale. Di seguito si descrivono le procedure di sintesi; successivamente, si espongono in dettaglio la loro caratterizzazioni chimico- fisico; infine, si descrive la metodologia delle prove antimicrobiche condotte sui tre campioni. Tutti e tre i campioni di polvere sono stati utilizzati per le prove antimicrobiche, sotto forma di sospensioni.

# 2.1.1 CaO ottenuto per precipitazione

La sintesi del campione di ossido CaO-P è stata effettuata sulla base della procedura seguita da Roy *et al.* [13]. Il processo si divide in due step: precipitazione dell'idrossido di calcio e sua successiva calcinazione.

# Precipitazione Ca(OH)<sub>2</sub>

I precursori utilizzati sono nitrato di calcio tetraidrato (Ca(NO3)<sub>2</sub>· 4H<sub>2</sub>O; Sigma-Aldrich) ed idrossido di sodio (NaOH; Sigma-Aldrich). Le due soluzioni acquose sono state preparate sotto stirring a temperatura ambiente. La soluzione di nitrato di calcio è stata ottenuta solubilizzando 5,90 g di reagente in 50 ml di acqua, ottenendo una concentrazione 0,5 M. Analogamente è stata preparata la soluzione di NaOH, utilizzando 1,40 g di reagente solubilizzati in 50 ml di acqua, ottenendo una concentrazione 0,7 M. Entrambe le soluzioni sono state tenute sotto stirring fino a completa solubilizzazione e poi miscelate versando la soluzione di nitrato nella soluzione di NaOH. Il sistema è stato omogeneizzato tenendolo ulteriormente in agitazione. La miscela è stata trasferita in un becher, immerso in bagno di olio portato ad 80 °C e tenuto sotto agitazione a 600 rpm. La miscela è stata mantenuta in queste condizioni per 72 h, chiudendo con un tappo il becher per limitare l'evaporazione dell'acqua. La sospensione biancastra ottenuta è stata poi sottoposta a centrifugazione per 30 min a 4000 rpm. Il surnatante è stato rimosso e le polveri sono state lavate con acqua. Sono stati ripetuti tre cicli di centrifugazione e successivo lavaggio. Al termine della procedura, si sono inserite le polveri in stufa, lasciandole essiccare overnight a T = 80 °C.

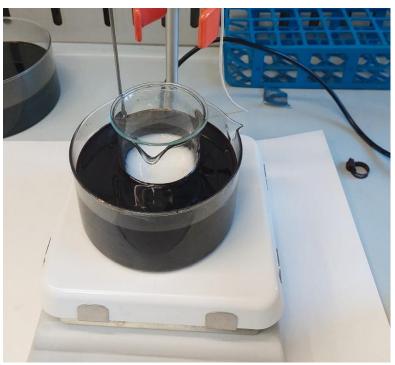


Figura 2.1. Becher contenente la soluzione dei precursori di idrossido di calcio.

#### Calcinazione del Ca(OH)<sub>2</sub>

Le polveri di idrossido di calcio sono state macinate manualmente; un'aliquota è stata temporaneamente separata per le caratterizzazioni chimiche. Successivamente, le polveri sono state collocate in navicelle di allumina e poste in forno per il trattamento termico di calcinazione. Sulla base della letteratura scientifica preesistente [64] si è effettuato il trattamento a 500 °C per 5 h in aria, con rampa di temperatura di 20 °C/min. La polvere è stata fatta raffreddare in forno, rimacinata e caratterizzata. Si effettuato un trattamento termico, mantenendo i parametri uguali allo step precedente (500 °C, 5h). Dopo la caratterizzazione, la polvere è stata ulteriormente trattata termicamente a 900 °C per 2 h.

La polvere è stata infine sottoposta ad un'ultima caratterizzazione chimico-fisica e riposta in essiccatore, all'interno di una provetta, per limitarne l'idratazione e la carbonatazione.

# 2.1.2 CaO ottenuto per sintesi sol-gel

La via di sintesi sol-gel è stata percorsa sulla base di un lavoro del 2020 [65] su compositi polimerici con nanoparticelle di CaO come fase dispersa. I parametri della sintesi sono stati poi ottimizzati sulla base di altra letteratura scientifica [66], [67], concernente la sintesi di CaO nanostrutturato. Il processo seguito è un processo Pechini modificato ed adattato, nel quale l'acido citrico funge da agente chelante per gli ioni metallici Ca<sup>2+</sup> [68].

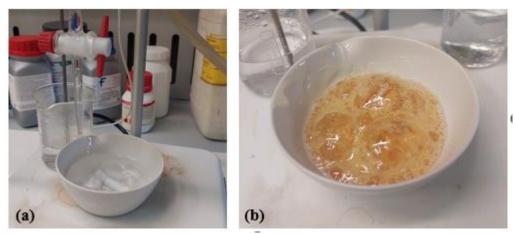


Figura 2.2. (a) Soluzione sottoposta ad aggiunta drop-wise di acido citrico. (b) Formazione del gel.

I precursori utilizzati sono stati acido citrico anidro (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>; Thermofisher Scientific) e nitrato di calcio (Ca(NO3)<sub>2</sub>· 4H<sub>2</sub>O; Sigma-Aldrich). Sono state preparate due soluzioni acquose, con concentrazione molare 1 M, solubilizzando i reagenti in acqua distillata. La soluzione di nitrato di calcio è stata tenuta su piastra riscaldante sotto stirring a 300 rpm e riscaldata fino ad 80 °C, per 5 min, in capsula La soluzione di acido citrico è stata invece omogeneizzata manualmente, a temperatura ambiente, ed aggiunta goccia a goccia alla soluzione di nitrato, tenuta sotto stirring a 300 rpm ad 80 °C. Si è utilizzata una buretta che ha permesso di stimare un volume medio di 40 μL per goccia. Una volta addizionata la soluzione di acido citrico (tempo richiesto:1h e 30 minuti), dopo ulteriori 35 minuti, la soluzione ha cominciato a gelificare, aumentando la sua viscosità ed assumendo una colorazione giallognola.

Il gel, a base di citrato di calcio tetraidrato, è stato quindi essiccato in stufa overnight a 120 °C. Successivamente, il gel essiccato è stato macinato manualmente ed una piccola aliquota è stata prelevata per effettuare le caratterizzazioni chimico-fisica. Il resto della polvere è stato ripartito in sei navicelle di allumina, per il trattamento termico in stufa. La polvere è stata portata ad 850 °C (velocità di riscaldamento di 2°C/min) in aria, e tenuta per 5 h. La polvere è stata poi fatta raffreddare fuori dal forno e macinata manualmente, per la successiva caratterizzazione chimico-fisica.

#### 2.1.3 CaO commerciale

Il campione di ossido di calcio commerciale, CaO-C, è stato acquistato dall'azienda Sigma-Aldrich. Esso è stato tenuto in essiccatore, nel suo contenitore, avvolto ulteriormente in parafilm, per preservarne la qualità.

#### 2.2 Caratterizzazione ossido

# 2.2.1 Diffrattometria a raggi X

La diffrattometria a raggi X è una tecnica di analisi non distruttiva basata sull'interazione fra il materiale ed i raggi X. I raggi X vengono generati per impatto di un fascio di elettroni ad elevata energia su un target metallico. Nell'interazione con il materiale, i raggi X vengono selettivamente diffratti ad angoli specifici. Questo accade perché l'onda elettromagnetica raggiunge il detector solo se l'interferenza è di natura costruttiva, cioè se le onde sono in fase fra loro. Questa condizione si verifica quando è soddisfatta la legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d(\sin\theta)$$

 $\lambda$  è la lunghezza d'onda, d la distanza interplanare,  $\theta$  l'angolo di incidenza dei raggi X. Dall'analisi si ricava un pattern di diffrazione che permette di ottenere diverse informazioni microstrutturali sul materiale. In particolare:

- Dalla posizione angolare dei picchi è possibile determinare le fasi presenti e la struttura cristallina del materiale;
- Dall'intensità dei picchi è possibile ricavare informazioni, sia qualitative che quantitative, sull'abbondanza relativa delle fasi presenti;
- Dal profilo dei picchi, tramite l'analisi di Debye-Scherrer, è possibile ottenere informazioni sulla taglia media dei cristalliti del materiale.

Lo strumento utilizzato nella tesi è stato il diffrattometro PANAlytical X'Pert Pro (Cu K $\alpha$  radiation), nel range 20 ° - 70 ° circa. Lo step è stato impostato a 0,02 2 $\theta$ . ICDD-PDF database ha permesso di interpretare i patterns di diffrazione.

#### 2.2.2 Microscopia a Scansione Elettronica (SEM)

La microscopia a scansione elettronica (SEM) è una tecnica di analisi microscopica che permette di raggiungere ingrandimenti non possibili con microscopi ottici. Essa è basata sull'interazione fra un fascio di elettroni primari accelerati ad alta energia (dell'ordine dei keV), fatti collimare ed indirizzati verso il materiale. Dei detector rilevano gli elettroni che provengono dal materiale. Il SEM può lavorare in due condizioni diverse, le quali offrono informazioni diverse sul materiale, a seconda dell'output analizzato:

- Elettroni retrodiffusi: provengono da profondità fino ad alcune centinaia di nanometri del materiale. Questi elettroni vengono retrodiffusi per scattering elastico; la loro analisi offre informazioni sulla morfologia del materiale (colori più chiari indicano superfici più vicine, il che impartisce tridimensionalità all'immagine), a scapito della risoluzione;
- Elettroni secondari: provengono da profondità minori perché meno energici rispetto ai retrodiffusi, il che ne rende elevata la risoluzione. L'intensità del segnale è fortemente dipendente dal numero atomico (Z) dell'atomo con il quale interagiscono. Segnali più intensi, che si traducono in colori più chiari nelle immagini, indicano elementi chimici più pesanti e viceversa.

L'analisi al SEM può essere distruttiva per campioni scarsamente conduttivi. Per arrivare ad ingrandimenti sufficientemente elevati, è necessario metallizzare il campione se questo non è conduttivo.

Lo strumento utilizzato è stato un SEM Stereoscan 360 (Cambridge Instrument), accoppiato ad un EDS Link Pentafet (Oxford Instrument).

# 2.2.3 Analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica temoanalitica che misura variazioni di peso in un materiale quando esso è sottoposto ad un graduale e controllato aumento di temperatura. La TGA consente un'analisi quanitativa della composizione del campione. È una tecnica di analisi che permette di acquisire informazioni di natura fisica, come decomposizioni termiche o transizioni di fase. Lo strumento è costituito essenzialmente da un piatto porta campioni, posizionato all'interno di un forno, e la prova viene condotta a temperatura, pressione ed atmosfera controllate. La curva ottenuta esprime la variazione di massa in funzione del tempo. Spesso si fa riferimento anche alla curva differenziale che fornisce invece la perdita di massa in funzione del tempo (o della temperatura). Questo tipo di analisi permette di valutare la stabilità termica di un materiale, offrendo informazioni anche sulla reattività del materiale.

#### 2.2.4 Analisi di fisisorbimento di azoto

L'adsorbimento è il fenomeno per il quale molecole, atomi o ioni, detti adsorbati, si legano ad una superficie. Nel caso dei sistemi gas/solido, l'adsorbimento avviene quindi sulla superficie, fuori dalla struttura solida. L'adsorbimento può essere poi di natura chimica (chemisorbimento) o fisica (fisisorbimento). Il fisisorbimento è un fenomeno reversibile che si verifica quando si instaurano deboli interazioni fra adsorbato e substrato; per i gas, sono le stesse interazioni responsabili della condensazione di vapori. Il fenomeno si può verificare in modo non-specifico, potenzialmente fra qualsiasi coppia adsorbato/adsorbente, specie a temperature inferiori. È un processo di natura reversibile. I parametri che influenzano il fisisorbimento sono diversi: la porosità del materiale e la morfologia dei pori, la rugosità superficiale, l'area superficiale specifica, etc. È possibile valutare l'effetto di questi parametri attraverso le isoterme di adsorbimento, curve che correlano la quantità di



Figura 2.3. Immagine dello strumento Quantochrome AUTOSORB-1 durante una misura.

gas adsorbito dalla superficie del materiale, a temperatura costante, in funzione della pressione relativa (rapporto fra pressione e tensione di vapore del gas). Per queste analisi si ricorre normalmente a gas poco affini verso il campione, come l'azoto o l'argon.

La misura è stata effettuata utilizzando lo strumento Quantochrome AUTOSORB-1 (Figura 2.3), su aliquote di circa 80 mg di polvere. Le polveri sono state inserite in una buretta di vetro, con all'interno un rod. Essa viene poi sigillata con un tappo. Operativamente, il degasaggio è necessario preliminarmente alla misura. Esso è stato condotto a 150 °C per 2 h per rimuovere eventuali specie adsorbite sulla superficie. Dopo il degasaggio, la misura viene condotta a 77 K e l'area superficiale specifica viene calcolata con il modello BET (Brauner-Emmet-Teler). Distribuzione e morfologia dei pori sono stati invece ottenuti con il modello BJH (Barret-Joyner-Helenda).

La IUPAC fornisce una classificazione delle isoterme di adsorbimento in sei principali categorie. Confrontando l'isoterma ottenuta con questo schema, è possibile ottenere delle informazioni sulla natura del materiale, in particolare sulla natura, morfologia e distribuzione dei pori.

# 2.3 Prove per la valutazione dell'attività antimicrobica

I metodi per la valutazione dell'attività antimicrobica sono divisi in due grandi categorie: metodi a diluizione e metodi a diffusione. Fra i primi, il principale è il metodo diluizione in brodo, a sua volta distinto in micro-diluizione in brodo e macro-diluizione in brodo. Fra i secondi, il più comune è il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar. L'attività antimicrobica, per tutti e tre i campioni, è stata valutata attraverso questi due metodi. I microrganismi testati sono stati *Staphilococcus epidermidis* (LMG 10474), batterio Gram(+), ed *Escherichia coli* (LMG 08063), batterio Gram(-). Essi sono batteri non patogeni, surrogati di batteri patogeni, ossia che si utilizzano per simulare il comportamento di batteri più pericolosi ma evitando i rischi infettivi. Vengono ora descritte in dettaglio le procedure ed i materiali necessari per le prove di attività antimicrobica. Per tutti e tre i campioni di polvere, le prove sono state ripetute due volte, una su *S. epidermidis* e l'altra su *E. coli*. Le procedure delle prove sono state quindi identiche per i tre campioni di polvere, nonché identiche per i due batteri testati.

### 2.3.1 Allestimenti preliminari

Le prove di attività antimicrobica richiedono l'utilizzo di materiali che comprendono acqua distillata, soluzione salina, puntali per micropipette, eppendorf e terreni di coltura batterica. I terreni utilizzati per i batteri sono il Mueller Hinton-Agar (MHA) (Oxoid; Basingstoke, UK), solido ed il Mueller-Hinton Broth (MHB) (Oxoid; Basingstoke; UK), liquido. Essi vengono preparati solubilizzando, secondo indicazione del produttore, quantità definite di polvere in acqua, per poi portare a volume necessario. I terreni vengono poi distribuiti in bottiglie, per prepararli alla sterilizzazione. I volumi sono di 250 ml per bottiglia per MHA e 100 ml per MHB. Per MHB, si sono preparate sia bottiglie con concentrazione 1x sia con concentrazione 2x, essendo quest'ultima necessaria per le prove di diluizione. Analogamente, la soluzione tampone fosfato (PBS) è stata preparata per solubilizzazione di pastiglia e successiva sterilizzazione. La soluzione salina è stata normalmente sterilizzata per microfiltrazione (filtro con porosità 0,22 μm). Le piastre di Petri sono state preparate sotto cappa, versando 20 ml circa di MHA in ciascuna piastra dopo la sterilizzazione, ad una temperatura di circa 45 °C. Esse sono poi state lasciate ad asciugare socchiuse, per poi essere chiuse e conservate capovolte sotto cappa. I liquidi, ad eccezione del MHA, sono stati manipolati avvalendosi di micropipette Eppendorf ®.

Le prove antimicrobiche si svolgono in condizioni di sterilità, venendo effettuate in opportune cappe. Nel lavoro qui descritto si è operato sotto cappa Biohazard Scanlaf Mars 1200. I terreni, la vetreria, i puntali e le vaschette che sono stati utilizzato per allestire le prove antimicrobiche sono stati sterilizzati in autoclave prima dell'utilizzo. La sterilizzazione avviene per trattamento a 120 °C e 2 atm per 20 minuti; in Figura 2.4 si vede l'interno dell'autoclave.



Figura 2.4. Materiali sottoposti a sterilizzazione in autoclave.

I microrganismi vengono manipolati sia nelle prove di micro-diluizione che in quelle di diffusione sotto forma di sospensioni. Esse vengono preparate secondo procedura standard. Viene utilizzata una coltura batterica, conservata in frigorifero, cresciuta in una piastra di Petri con terreno Mueller-Hinton Agar. Essa viene utilizzata per recuperare delle colonie batteriche, le quali vengono depositate e disperse su un'altra piastra di Petri. Quest'ultima viene incubata per 18 – 24 h a 37 °C. Da questa piastra, attraverso un'ansa, si prelevano tre colonie, che vengono disperse in 5 ml di soluzione salina. Questa procedura assicura che la concentrazione batterica sia dell'ordine di 10<sup>8</sup> unità formanti colonie (UFC)/ml. Si effettuano a questo punto due diluizioni successive 1:10 in terreno MHB 1x, avendo cura di vortizzare prima di prelevare le aliquote di sospensione. Il risultato è che si ottiene una concentrazione finale di 10<sup>6</sup> UFC/ml per l'inoculo. L'inoculo così preparato ha opacità simile allo standard McFarland 0,5. Per la prova di diffusione in agar modificata, si rende necessaria un'ulteriore diluizione 1:10, sempre in MHB, arrivando ad una concentrazione di 10<sup>5</sup> UFC/ml.

#### 2.3.2 Preparazione sospensioni

Le polveri di ossido di calcio sono state testate sotto forma di sospensioni di particelle in liquido, in particolare in PBS. Per tutti e tre i campioni (CaO-P, ottenuto per calcinazione di idrossido; CaO-C, commerciale; e CaO-SG, ottenuto per via sol-gel), si sono preparate le sospensioni, in condizioni di sterilità, seguendo la stessa procedura. Sono state predisposte delle provette eppendorf, riempite ciascuna con 1,5 mL di PBS. Le diverse concentrazioni delle sospensioni preparate sono riportate in Tabella 2.1. Per le sospensioni da 1 a 5 e la sospensione "20" la polvere è stata pesata su una bilancia di precisione, per poi essere trasferita nella eppendorf. Ciascuna eppendorf è stata poi sottoposta a vortizzazione a 1500 rpm per alcuni secondi, per omogeneizzare la sospensione. Le sospensioni da 6 a 12 e la sospensione "0,03" sono state invece ottenute per successive diluizioni. Fra ogni diluizione e la successiva si è vortizzato il contenuto della eppendorf, per assicurarsi la maggiore omogeneità possibile nella concentrazione finale.

Dopo la preparazione di tutte le sospensioni, esse sono state brevemente vortizzate e sottoposte a sonicazione, per ridurre l'agglomerazione fra le particelle. Lo strumento utilizzato è stato il bagno ad ultrasuoni Elmasonic S 60 H. Le sospensioni sono state sonicate per 1 h a 50 Hz. A questo punto, esse sono state trasferite sotto cappa microbiologica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	«0,03»	«20»
Conc.ne [mg/ml]	40	30	15	7,5	3,75	1,92	0,96	0,48	0,24	0,12	0,06	0,03	20
Conc.ne [mM]	714	535	268	134	67	33	16,7	8,3	4,1	2,1	1,0	0,5	357

Tabella 2.1. Valori di concentrazione delle nanoparticelle nelle diverse sospensioni preparate per le successive prove antimicrobiche.

## 2.3.3 Metodo micro-diluizione in brodo

Il metodo della micro-diluizione in brodo è un tipo di test di natura qualitativa, il cui allestimento è standardizzato nel metodo CLSI M07-A9. Esso permette, attraverso ispezione visiva, di determinare la minima concentrazione inibente (MIC), ossia la più bassa concentrazione di agente antimicrobico per la quale non si ha visibile crescita. La crescita viene valutata attraverso un'analisi visiva: tanto più il pozzetto è torbido, tanto più intensa è stata la crescita batterica.

Si è utilizzata una piastra multi-well con 96 pozzetti, ciascuno di volume 300 μl. Il layout della multiwell, con la relativa legenda, è schematizzato in Figura 2.5. I pozzetti preparati si distinguono in quattro diversi tipi:

- Solo terreno: in questi pozzetti è stato depositato il solo terreno Mueller-Hinton Broth (MHB), con concentrazione 1x; rappresenta uno dei due controlli abiotici. In ciascun pozzetto sono stati depositati 300 µl di terreno con l'ausilio di una micropipetta.
- Controllo biotico: in questi pozzetti abbiamo il solo terreno MHB 1x e l'inoculo batterico. Rispettivamente, sono stati inseriti 270 µl di terreno e 30 µl di inoculo batterico.
- Terreno + CaO: in questi pozzetti sono stati introdotti 135 µl di terreno MHB 2x e 135 µl di sospensioni di polvere. Il risultato della miscelazione dei due elementi è un terreno di crescita batterica modificato dalla presenza delle particelle. Non viene introdotto inoculo, di conseguenza rappresenta l'altro controllo abiotico.
- Terreno + CaO + inoculo: in questi pozzetti vengono depositati 135 μl di sospensione di particelle di CaO, 135 μl di terreno MHB 1x e 30 μl di inoculo.



Figura 2.5. Layout della multi-well preparata per le prove di microdiluizione, con annessa legenda. Vengono riportate le concentrazioni delle polveri nel pozzetto nella prima riga.

Lungo ogni riga, ad eccezione della riga H e della riga E (lasciata vuota), sono state testate concentrazioni decrescenti delle sospensioni di particelle di CaO. I valori della concentrazione delle polveri nel pozzetto, espressi in mg/ml, sono stati riportati nella Figura 2.5, lungo la riga A. Per ogni concentrazione di sospensioni testate vi sono quindi sei diverse repliche, collocate tutte lungo la stessa colonna.

Dopo l'allestimento, la multi-well viene sigillata con del parafilm ed ulteriormente avvolta da pellicola trasparente in LDPE. Essa è poi stata posta nell'incubatore per 24 h a 37 °C, in agitazione a 250 rpm. Trascorse le 24 h, si è recuperata la piastra per effettuare il controllo visivo della torbidità dei pozzetti. Si è effettuato il confronto con il controllo biotico, ossia con i pozzetti con terreno MHB semplice ed inoculo batterico, dove la crescita è avvenuta in condizioni non alterate da agenti antimicrobici. Da qui si è risaliti ad un valore di MIC per la polvere, nelle condizioni della prova, nei confronti dello specifico batterio.

Si è proceduto in successione con la determinazione della MBC, minima concentrazione battericida. Per ciascuna concentrazione di polveri di CaO testata, si è prelevato un volume di  $10~\mu L$  da un pozzetto biotico, lo stesso si è fatto per il controllo biotico. La sospensione è stata poi depositata su una piastra di Petri, con terreno MHA, con successivo spreading omogeneo sul terreno. Le piastre sono state poi chiuse con parafilm e poste all'interno dell'incubatore, a  $37~^{\circ}C$  per 24~h, al termine delle quali si è proceduto al controllo visivo delle piastre stesse, nuovamente confrontando la crescita batterica con il controllo biotico. Sulla base di queste osservazioni si è determinato il valore di MBC, corrispondente a quella concentrazione tale per la quale la crescita batterica è assente.

# 2.3.4 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato

Il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato è un metodo di valutazione dell'attività antimicrobica che permette di testare la polvere, dispersa a formare una sospensione, direttamente sul terreno solido. Nel lavoro di tesi, si è seguita la procedura "EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 8.0", con alcune modifiche. Il principio della prova è quello di depositare gocce di sospensione di polveri, con diverse concentrazioni, con lo scopo di valutare l'inibizione della crescita batterica. L'inibizione da parte delle polveri comporta la formazione di un alone di inibizione, ossia una zona circolare attorno alla goccia con crescita batterica ridotta o completamente inibita.

L'inoculo utilizzato, preparato come descritto nel paragrafo 2.3.1, ha concentrazione UFC pari a  $10^5/\text{ml}$ . Su ciascuna piastra preparata si sono depositati  $100~\mu$ l di inoculo, il quale è stato poi disperso omogeneamente sul terreno. Le polveri all'interno delle eppendorf tendono naturalmente a sedimentare, rendendo necessaria la vortizzazione per disperdere le particelle nella sospensione. Dopo la vortizzazione, vengono depositate due gocce, di volume  $20~\mu$ l, per ciascuna sospensione, in modo da avere due repliche per ciascun campione. Su ogni piastra, per le concentrazioni più elevate di polveri di CaO, vengono testate due sospensioni diverse, per un totale di quattro gocce su ciascuna piastra. Per le ultime concentrazioni, si sono depositate anche 6 o, in un caso, 8 gocce. Per ciascuna sospensione vengono depositati  $40~\mu$ l, essendo le gocce due per sospensione. Esse vengono depositate sulla piastra ad alcuni centimetri di distanza fra loro. Questa accortezza serve ad evitare che gli aloni di inibizione si possano sovrapporre, rendendone più complessa la misurazione.

Dopo aver preparato le piastre con le gocce di sospensione sotto cappa, si è lasciato asciugare per alcuni minuti. A questo punto, le piastre sono state sigillate con parafilm, per poi inserirle nell'incubatore per 24 h a 37 °C. Dopo l'incubazione, si è proceduto all'analisi visiva ed alla misura dell'alone di inibizione.

#### 2.3.5 Metodo micro-diluizione in brodo con terreno modificato

Essendo le polveri di CaO materiali basici, i meccanismi di attività antimicrobica intrinseci delle polveri si sovrappongono all'effetto inibitorio del pH, innalzato verso valori alcalini dalla presenza delle polveri stesse. La sovrapposizione dei due effetti richiede quindi di effettuare una prova che

aiuti a scinderli, permettendo di determinare l'attività antimicrobica intrinseca delle particelle. In questa prova, nello specifico, si è utilizzato un terreno modificato con un agente basificante. Analogamente alla prova descritta nel paragrafo 2.3.3, la prova con terreno modificato è stata effettuata in multi-well, su entrambi i microrganismi. Il layout della prova è descritto in Figura 2.6. In tutti i pozzetti sono presenti 270 µl di terreno e 30 µl di inoculo. La colonna 1 contiene terreno tal quale, mentre le colonne 2 - 7 contengono terreno progressivamente più basico. Il terreno è stato modificato utilizzando come agente basificante una soluzione di NaOH 5M, preparata sotto cappa per assicurare sterilità. Poiché il pH-metro utilizzato è uno strumento non sterile, il suo contatto con il brodo o con dei pozzetti li avrebbe contaminati, sfalsando potenzialmente la prova. Questo ha richiesto di procedere con ulteriori accortezze, per assicurare la sterilità del terreno posto nella multiwell. Sono state preparate due bottiglie di terreno MHB con concentrazione 1x, contenenti entrambe 50 ml di brodo. Una bottiglia, di terreno "non-sterile", è stata utilizzata per la misura del pH con successive aggiunte di soluzione di NaOH, fino ad arrivare al valore di pH desiderato. Una volta raggiunto il valore di pH voluto, si è aggiunta la stessa quantità di soluzione basica nell'altra bottiglia di brodo, con terreno "in condizioni sterili". A questo punto, si è utilizzato il terreno "in condizioni sterili" per depositarlo nei pozzetti della multi-well. A questo punto, si è ripetuta la procedura, riempiendo progressivamente i pozzetti della MW con terreno con terreno a valori di pH crescenti. Questo procedimento è stato sviluppato nell'ottica di minimizzare il rischio di contaminazione. Per lo stesso motivo, sono state preparate due diverse multi-well per ciascun microrganismo. La misura dei pH nei pozzetti è stata infatti effettuata sia al tempo t = 0 che al tempo t = 24 h (cioè dopo incubazione). Nell'ottica di evitare di tenere in incubazione dei pozzetti contaminati dal pH-metro, una riga di pozzetti biotici con terreno pH-ato a valori crescenti è stata preparata in una multi-well separata (Figura 2.6, (b)). Questa riga è stata utilizzata per la misurazione dei pH al tempo iniziale. Poiché la misurazione dei pH comporta la contaminazione dei pozzetti, questa multi-well non è stata successivamente incubata.

Le misure di pH sono state effettuate utilizzando lo strumento HALO pH PROBE (HI10832; Hanna Instruments).

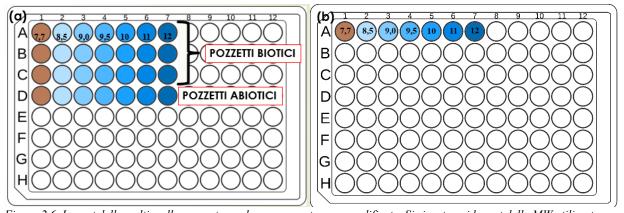


Figura 2.6. Layout delle multi-well preparate per la prova con terreno modificato. Si riportano i layout della MW utilizzata per la misura di pH a 24 h (a) e quello della MW utilizzata per la misura del pH al tempo t=0.

Per quanto riguarda l'altra piastra (Figura 2.6, (a)), essa è stata sigillata con parafilm ed avvolta in pellicola trasparente prima di essere posta in incubatore. Dopo 24 h a 37 °C, essa è stata sottoposta ad analisi visiva. Analogamente alla prova descritta nel paragrafo 2.3.3, l'analisi è stata fatta osservando la torbidità dei pozzetti. L'obiettivo era la determinazione dell'effetto inibente del pH sulla crescita dei microrganismi testati. Dopo quest'analisi, si è proceduto al prelievo di un'aliquota (10 μl) di sospensione da pozzetti lungo la riga B. Ciascuna di queste aliquote è stata successivamente depositata su una piastra, contenente terreno MHA. Dopo spreading omogeneo sul terreno, si è sigillata la piastra con parafilm e posta in incubatore a 24 h per 37 °C. Dopo l'incubazione, si è

effettuato un controllo visivo sulle piastre, usando il controllo (pozzetto contenente terreno tal-quale) come riferimento. L'obiettivo di questa procedura, parallelamente a quanto descritto nel paragrafo 2.3.3, è la determinazione di un valore di pH battericida, sulla falsariga del concetto di MBC associato alle polveri di CaO.

# 3. RISULTATI

Come descritto nel capitolo 2, i campioni di ossido di calcio sub-micrometrico o nanometrico testati sono stati tre. Due di questi sono stati sintetizzati in laboratorio, mentre uno è stato acquistato commercialmente. La caratterizzazione fisico-chimica è stata effettuata su tutti e tre gli ossidi; per gli ossidi di sintesi, si sono caratterizzati anche gli intermedi di sintesi. Si illustrano ora i risultati delle analisi condotte sui campioni. In particolare, per i campioni di CaO si riportano i risultati delle analisi di diffrattometria ai raggi X (XRD), microscopia elettronica a scansione (SEM) e fisisorbimento di azoto (BET). Per gli intermedi di reazione, si riportano le caratterizzazioni effettuate attraverso analisi XRD, BET e TGA.

# 3.1 CaO ottenuto per precipitazione

La sintesi per precipitazione acquosa di idrossido e sua successiva calcinazione ha restituito circa 800 mg di ossido di calcio. La resa teorica della sintesi, ipotizzando tassi di conversione completi sia nella precipitazione che nella calcinazione, sarebbe stata di 1,40 g. La resa relativa della sintesi è di conseguenza pari al 57 % circa.

# Diffrattometria ai raggi X

Dopo la sintesi ed il drying in stufa, si è proceduto con l'analisi XRD su un'aliquota di campione di intermedio. L'analisi XRD è stata ripetuta dopo ogni step di calcinazione, per monitorare l'effetto sul materiale del trattamento In Figura 3.1 si riporta il diffrattogramma I0 del campione, prima della calcinazione.

Sulla base dell'analisi XRD è possibile determinare che il sistema è bifasico: le fasi presenti sono  $Ca(OH)_2$  (scheda PDF numero 00-087-0673) ed il carbonato di calcio  $CaCO_3$  (scheda PDF numero 00-081-2027). È presente il picco principale del  $CaCO_3$  ( $2\theta = 29,5$ °); gli altri picchi sono attribuibili al  $Ca(OH)_2$  (picco principale per  $2\theta = 34,1$ ).

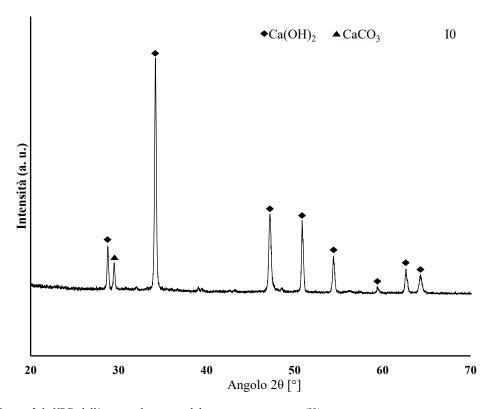


Figura 3.1. XRD dell'intermedio prima del trattamento termico (I0).

L'analisi non è per sua natura quantitativa, il che non permette di definire l'abbondanza relative delle due fasi. È in ogni caso evidente che avviene formazione di carbonato già in fase di sintesi o durante il drying, per esposizione all'aria del campione. I picchi sono ben definiti, il che è indice di buona cristallinità del materiale. Al tempo stesso, il fatto che i picchi siano stretti ed intensi è evidenza di una dimensione relativamente elevata dei cristalliti, certamente non nanometrica.

In Figura 3.2 si riporta invece il diffrattogramma del campione dopo aver effettuato il primo step di calcinazione, confrontato con quello precedente. Il sistema in questo caso è trifasico; oltre al Ca(OH)<sub>2</sub> ed al CaCO<sub>3</sub> è presente ora anche l'ossido di calcio (scheda PDF numero 99-0070). Confrontando le intensità relative dei picchi principali di idrossido e di carbonato rispetto alla figura precedente, è possibile notare che il Ca(OH)<sub>2</sub> si sia ridotto, a causa della sua decomposizione ad ossido. Esso è però ancora presente, il che è indice della non completa reazione dell'idrossido. Inoltre, l'abbondanza relativa di carbonato nel campione è aumentata.

Analogamente al caso precedente, il diffrattogramma è ben definito, caratterizzato da picchi intensi e stretti al tempo stesso. Le fasi presenti sono quindi caratterizzate da buona cristallinità, ma anche da una taglia media dei cristalliti sub-micrometrica.

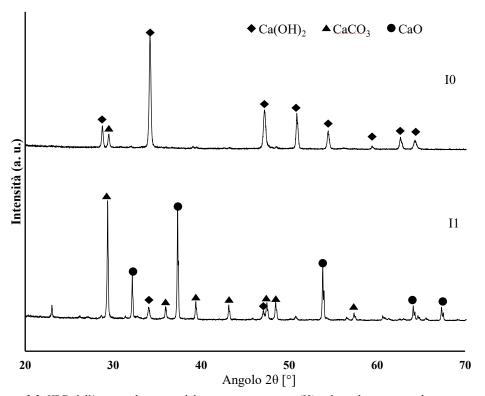


Figura 3.2. XRD dell'intermedio prima del trattamento termico (10) e dopo il primo step di trattamento (11)

In Figura 3.3 si riporta lo spettro del campione analizzato dopo il secondo step di calcinazione, confrontandolo con il diffrattogramma precedente. Il sistema è ora bifasico, costituito da ossido e da carbonato di calcio. Il secondo step di calcinazione ha garantito la decomposizione completa di Ca(OH)<sub>2</sub>. Tuttavia, la temperatura di trattamento si è rivelata troppo bassa per la decomposizione del carbonato di calcio. Confrontando le intensità relative dei picchi principali delle due fasi prima e dopo lo step di calcinazione, è evidente che l'abbondanza relativa del carbonato è inoltre aumentata.

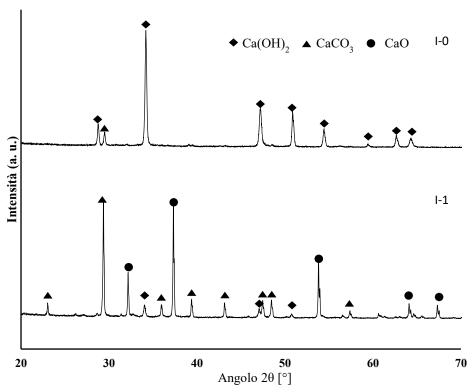


Figura 3.3. XRD dell'intermedio dopo il primo step (II) e dopo il secondo step di calcinazione (12).

In Figura 3.4 si riporta il diffrattogramma del campione dopo l'ultimo step di calcinazione, effettuato a temperatura superiore (900 °C). Il materiale è ora monofasico; tutti i picchi presenti sono attribuibili all'ossido di calcio, con struttura cristallina cubica.

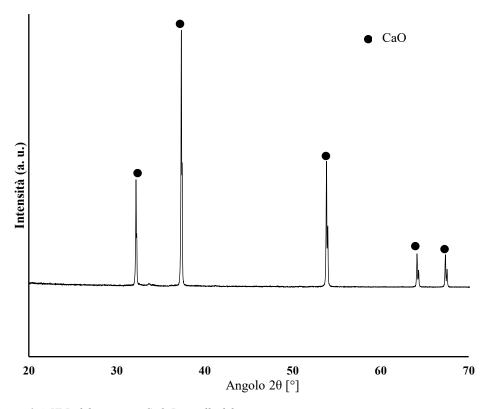


Figura 3.4. XRD del campione CaO-P, a valle del trattamento termico.

Si può quindi affermare che la decomposizione del carbonato si è verificata completamente. I picchi sono stretti ed alti, a riprova della elevata cristallinità dell'ossido; al tempo stesso, la dimensione dei cristalliti è sub-micrometrica. Dall'analisi di Debye-Scherrer, effettuata sul campione, si determina una taglia media dei cristalliti di 280 nm, a conferma della natura sub-micrometrica delle particelle.

# Microscopia elettronica a scansione (SEM)

In Figura 3.5 si riporta un'immagine SEM delle polveri di CaO-P.

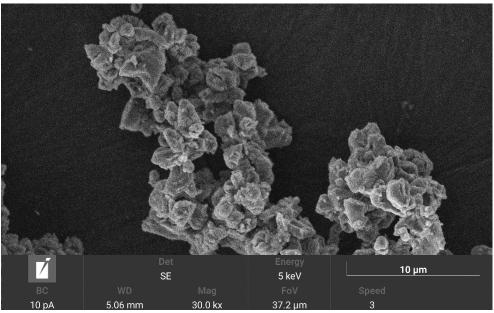


Figura 3.5. Immagine SEM del campione CaO-P.

Sono visibili agglomerati di morfologia irregolare, di dimensioni dell'ordine del micrometro. L'agglomerazione delle polveri è importante ed evidente. La morfologia è attribuibile ad una non ottimale cristallizzazione dell'idrossido di calcio, precursore dell'ossido. Gli agglomerati ricordano l'aspetto della portlandite. Essi presentano infatti un aspetto esagonale irregolare.

#### Fisisorbimento di azoto

In Figura 3.6 si riporta la curva isoterma di fisisorbimento di azoto del campione di idrossido di calcio; sono distinte con colori diversi le curve che descrivono l'adsorbimento ed il desorbimento. L'isoterma è ascrivibile, sulla base della classificazione IUPAC [69], al tipo II, caratteristico di materiali non porosi e dalla bassa affinità con il gas. Il materiale ha area superficiale specifica (SSA) di 11,8 m²/g, un valore caratteristico di un materiale privo di porosità.

Per quanto riguarda il campione di ossido, esso è stato sottoposto all'analisi BET nelle stesse condizioni. Tuttavia, il valore dell'area superficiale determinato è stato inferiore ai 5 m²/g. Un valore così basso implica un'area superficiale trascurabile; la curva di fisisorbimento diventa di conseguenza poco significativa. Per questo motivo, essa non viene riportata.

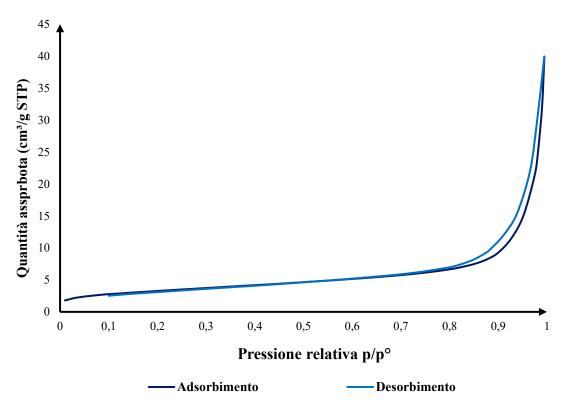


Figura 3.6. Curva di fisisorbimento di azoto dell'idrossido di calcio.

# Analisi termogravimetrica (TGA) e successiva diffrattometria (XRD)

Per l'analisi termogravimetrica, sono stati prelevati 12,4 mg di idrossido post-drying. Si riporta in Figura 3.7 la curva di perdita di massa in funzione della temperatura.

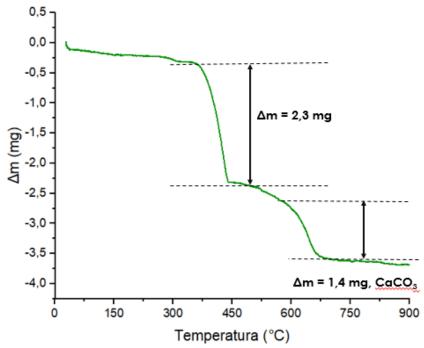


Figura 3.7. Curva di perdita di massa in funzione della temperatura del materiale.

Emergono due perdite di peso durante il processo di riscaldamento. La prima perdita importante si verifica fra i 350 °C ed i 450 °C; questo step rappresenta la decomposizione dell'idrossido in ossido. La perdita di peso teorica associata a questa reazione è il 24 %; nel caso specifico, i 2,3 g persi rappresentano il 21 % dell'idrossido presente. Si verifica infatti una seconda perdita di peso fra i 550 °C ed i 650 °C, attribuibile alla decomposizione del carbonato presente. Questo risultato è coerente con quanto osservato nell'analisi XRD, la quale confermava la presenza delle due fasi.

Sul campione, dopo l'analisi termogravimetrica, è stata condotta un'analisi diffrattometrica ai raggi X, per verificare le fasi presenti e la cristallinità del materiale. Lo spettro è riportato in Figura 3.8.

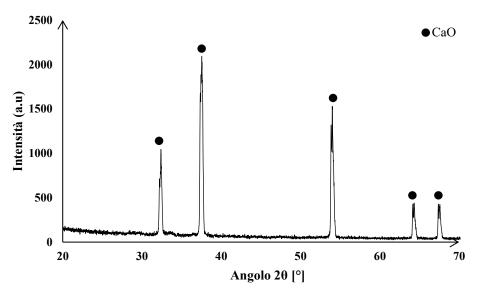


Figura 3.8. XRD del campione di intermedio di CaO-P, dopo TGA.

Il materiale è monofasico, costituito da CaO con struttura cubica, con buona cristallinità. Non sono infatti presenti picchi riconducibili ad altre fasi.

## 3.2 CaO ottenuto per sintesi sol-gel

La sintesi sol-gel ha prodotto 9,6 g di gel disidratato; dopo il trattamento termico si sono prodotti 1,8 g di CaO. La resa della sintesi è pari all'85 %.

#### Diffrattometria ai raggi X

La diffrattometria a raggi X è stata effettuata sul campione dopo il trattamento termico ad 850 °C. Si riporta il diffrattogramma in Figura 3.9. Dall'analisi emerge che il campione ottenuto è monofasico, costituito da solo CaO. I picchi risultano essere meno stretti ed alti rispetto ai campioni precedenti, a riprova di una taglia media dei cristalliti inferiore. L'analisi di Debye-Scherrer permette di determinare una dimensione media dei cristalliti di 100 nm. Il campione ottenuto è quindi nanometrico.

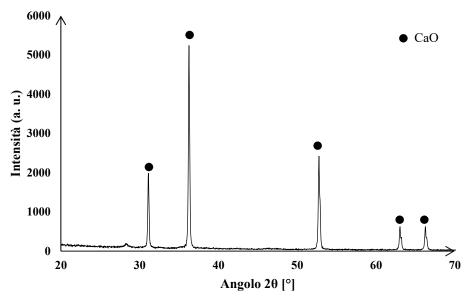


Figura 3.9. XRD del campione CaO-SG.

## Microscopia elettronica a scansione (SEM)

In Figura 3.10 si riportano due immagini ottenute al SEM ad ingrandimenti diversi. L'immagine (a), ad ingrandimento maggiore, è stata ottenuta grafitizzando il campione prima dell'analisi, mentre l'immagine (b) è stata acquisita sul campione tal quale. Nella prima immagine è evidente che le particelle tendono ad agglomerarsi, seppur lasciando dello spazio vuoto fra di esse. La morfologia degli agglomerati è spongiosa, con aspetto fragile, wafer-like, nonché caratterizzata da importanti porosità. L'immagine (a) offre la possibilità di osservare più in dettaglio la morfologia e discernere i singoli cristalliti. Emerge in modo più evidente la presenza di incavi e di cavità fra gli agglomerati. Questo peculiare aspetto può essere correlato alle peculiarità della sintesi. Durante l'aggiunta dropwise della soluzione di acido citrico, il sistema è stato tenuto in agitazione; è stata quindi inglobata molta aria. Durante la gelificazione ed il successivo drying, queste bolle di aria si sono conservate. Durante il trattamento termico, la cristallizzazione è avvenuta in modo preferenziale in corrispondenza degli interstizi fra le bolle di aria, originando una morfologia spugnosa.

Per quanto riguarda la dimensione delle particelle si osservano dimensioni di circa 200 nm, come riportato nel riquadro in figura 3.10 b. La loro morfologia è-sferica.

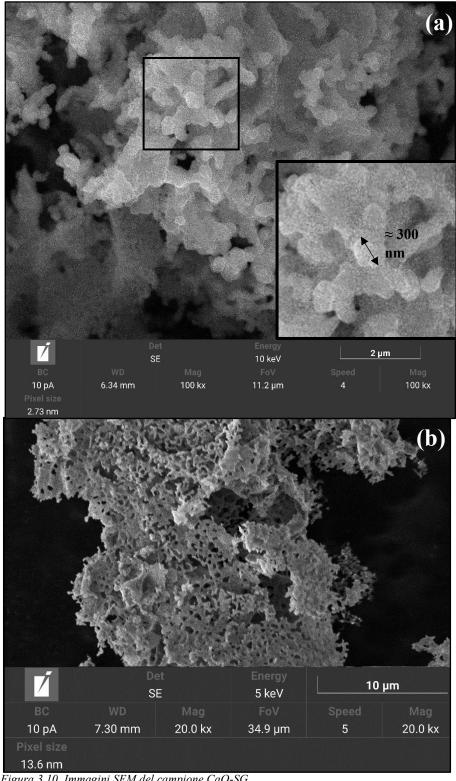


Figura 3.10. Immagini SEM del campione CaO-SG.

#### Fisisorbimento di azoto

In Figura 3.11 si riporta la curva di fisisorbimento di azoto del campione CaO-SG. Sono riportati in due colori diversi il ramo di adsorbimento e quello di desorbimento. La curva nel suo complesso è, sulla base della classificazione IUPAC [69], una curva di tipo II. Il materiale è quindi non poroso e presenta una bassa affinità con il gas. Si riporta inoltre il valore dell'area superficiale specifica, di 8,8 m<sup>2</sup>/g. Fra i tre campioni di ossido testati, CaO-SG rappresenta l'unico caso nel quale l'area superficiale non è trascurabile. Per questo, è l'unico campione di cui è significativo riportare la curva di fisisorbimento di azoto.

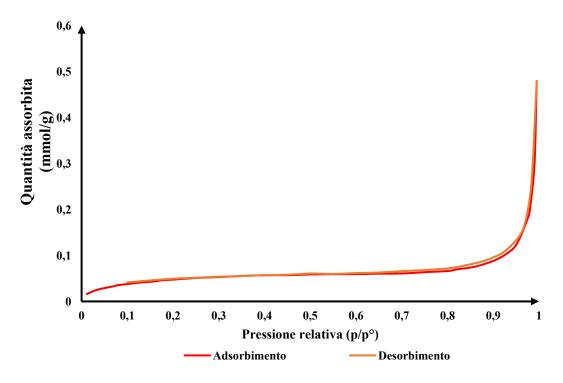


Figura 3.11. Curva di fisisorbimento di azoto dell'ossido di calcio CaO-SG.

#### Analisi termogravimetrica (TGA)

In Figura 3.12 si riporta la curva termogravimetrica; l'analisi è stata condotta su un'aliquota di 24,8 mg di campione di gel, dopo il drying. Si osservano tre diversi step di perdita di peso, per diverse temperature:

- 4. 155 165 °C: decomposizione del citrato di calcio con formazione di carbonato di calcio e fusione dell'acido citrico in eccesso non reagito. Si verifica una perdita di massa del 55 %. Una perdita di massa così significativa, superiore a quella teorica, è da attribuirsi alla decomposizione del citrato, favorita dalla presenza di acido citrico fuso.
- 2. 300 500 °C: si verifica una perdita di massa del 7 %. Questa perdita di massa, per il citrato di calcio puro [70], è attribuibile alla decomposizione della fase organica del complesso organo-metallico. Nel nostro sistema citrato-acido citrico, la gran parte della decomposizione è già avvenuta nello step precedente. Questa ulteriore perdita di massa è attribuibile alla completa decomposizione del citrato.
- 3. 700 780 °C: decomposizione del carbonato di calcio, con formazione di ossido di calcio. L'ultimo step comporta una perdita di massa del 15 %.

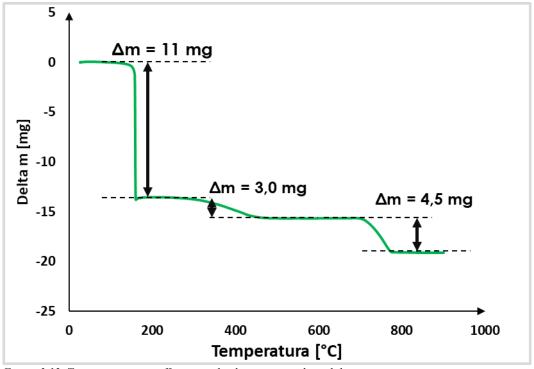


Figura 3.12. Termogravimetria effettuata sul gel precursore, dopo il drying.

## 3.3 CaO commerciale

Sul campione CaO-C, di natura commerciale, sono state condotte analisi XRD, SEM e BET.

# Diffrattometria ai raggi X

In Figura 3.13 si riporta il diffrattogramma effettuato sul campione di CaO-C.

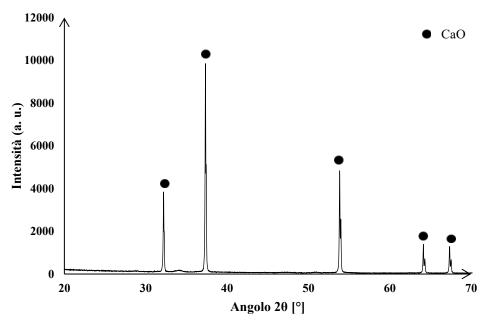


Figura 3.13. XRD del campione CaO-C.

Sulla base del diffrattogramma, è possibile affermare che il campione di CaO-C è di natura monofasica, costituito dal solo CaO cubico. Non sono presenti picchi attribuibili ad altre fasi. I picchi sono particolarmente stretti ed alti, indizio di dimensione media dei cristalliti relativamente elevata. L'analisi di Debye-Scherrer conferma questa ipotesi: la dimensione media dei cristalliti è 538 nm, ben maggiore rispetto agli altri due campioni di CaO.

## Microscopia elettronica a scansione (SEM)

In Figura 3.14 si riporta un'immagine SEM delle particelle di CaO-C.

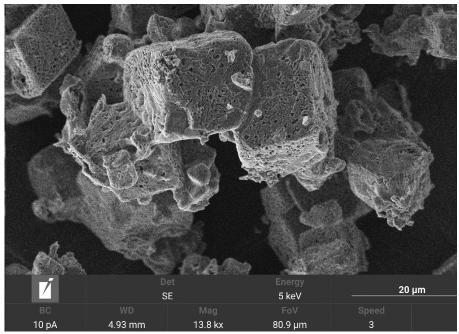


Figura 3.14. Immagine al SEM delle particelle sub-micrometriche di CaO-C.

Nella Figura 3.14 sono evidenti agglomerati di particelle, dell'ordine di grandezza di alcuni micrometri. Il fenomeno dell'agglomerazione delle particelle è particolarmente evidente per questo campione, più che per gli altri due. La dimensione media dei cristalliti, sulla base dell'analisi di Debye-Scherrer, è 538 nm. La morfologia degli agglomerati è di natura romboedrica, abbastanza regolare e definita. Questa peculiare morfologia è probabilmente funzione, come per le altre particelle descritte, della sintesi con la quale esse sono state ottenute. A livello industriale, la via più economica e quindi più comune per produrre CaO è per calcinazione di carbonato di calcio [71]. Poiché la fonte più comune in natura di CaCO<sub>3</sub> è il minerale calcite, che ha struttura romboedrica, è probabile che la forma degli agglomerati di partenza di carbonato fosse romboedrica e che quest'ultima si sia conservata con la calcinazione.

#### Analisi di fisisorbimento di azoto

L'analisi BET è stata effettuata su un'aliquota del campione. L'analisi ha restituito un' area superficiale trascurabile. Per questo motivo non viene riportata la curva di fisisorbimento di azoto. Inoltre, sulla base dell'analisi, è possibile escludere la presenza di porosità del materiale.

#### 3.2 Valutazione attività antimicrobica

Come descritto nel capitolo 2, l'attività antimicrobica è stata valutata attraverso prove di microdiluizione in brodo e di diffusione in agar modificate. Inoltre, per valutare l'effetto del pH sulla

crescita batterica, con l'obiettivo di scindere l'effetto da pH da quello intrinseco delle particelle di CaO, è stata effettuata una prova micro-diluizione in brodo- con terreno modificato I risultati delle varie prove e per i vari campioni sono riportati di seguito. Per chiarezza di comprensione, vengono inserite e commentate le più significative nei paragrafi seguenti.

#### 3.2.1 Metodo brodo micro-diluizione con terreno modificato

In Tabella 3.1 sono riportati i risultati delle prove effettuate sui microrganismi utilizzando terreno con pH modificato. Si riportano, per *S. epidermidis* e per *E. coli*, nonché per il controllo abiotico, i valori di pH misurati testando terreno con pH crescente (riportato nella riga in alto). Per il controllo abiotico, si è misurato il pH solo dopo 24 h; per i microrganismi, per ciascun pozzetto si riportano i valori di pH misurati sia a tempo t = 0 che a t = 24 h. Per ciascun microrganismo, vengono evidenziati i pozzetti corrispondenti ad inibizione parziale (in giallo) o totale (in rosso) della crescita batterica. In altri termini, in questo modo si è potuto determinare il valore di pH batteriostatico e battericida del terreno nei confronti di *S. epidermidis* e di *E. coli*. Questa informazione si rende necessaria per cercare di scindere, in un secondo momento, l'attività antimicrobica intrinseca delle NPs dall'effetto indiretto che queste hanno, andando ad innalzare il pH nel pozzetto.

Valori p	H	MHB t.q.	«8,5»	«9»	«9,5»	«10»	«11»	«12»
S. epidermidis	t = 0	7,33	8,5	8,8	9,35	9,80	10,55	11,32
	t = 24  h	7,06	8,02	8,42	9,22	9,56	9,92	10,09
E. coli	t = 0	7,34	8,45	8,78	9,31	9,65	10,38	11,10
	t = 24  h	8,34	8,48	8,45	8,59	8,27	9,14	9,30
Abiotico	t = 24 h	7,84	8,56	8,86	9,33	9,62	9,95	10,07

Tabella 3.1. Valori di pH misurati nei pozzetti, sia biotici che abiotici, per i diversi terreni pH-ati testati. Si riporta, per i pozzetti biotici, sia il valore misurato a t=0 che a t=24 h.

In Figura 3.15, sono riportate alcune immagini delle piastre, sulle quali sono stati seminati 10 µl di coltura batterica derivante dai pozzetti biotici, per determinare i valori di pH batteriostatico e battericida, per *S. epidermidis*. Per ogni piastra è presente un'etichetta in basso a sinistra che indica il valore nominale di pH del terreno testato. Il colore dello sfondo dell'etichetta indica l'effetto del pH: se grigio, il pH non è inibente; se giallo, il pH è batteriostatico; se rosso, il pH è battericida. Per *S. epidermidis*, i valori di pH batteriostatico e battericida sono rispettivamente di 9,5 e di 10. In Figura 3.15 e 3.16 si riportano le immagini relative alle piastre sulle quali si è effettuata la coltura batterica prelevando aliquote da pozzetti della multi-well dopo 24 h. Sono di nuovo evidenziati i valori di pH batteriostatico e battericida; questi sono, per *E. coli*, rispettivamente di 11 e 12. Queste informazioni si rendono poi essenziali per interpretare i risultati delle prove micro-diluizione in brodo, aiutando a discriminare fra effetto indiretto dato dal pH ed effetto diretto delle polveri.

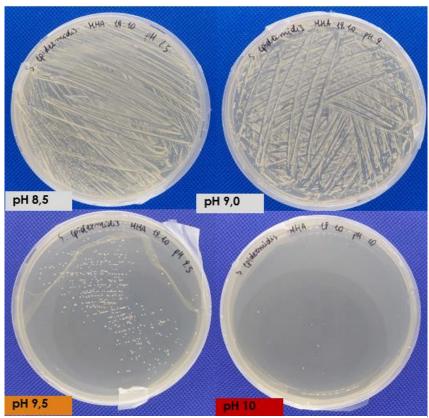


Figura 3.15. Immagini di alcune delle piastre su cui sono state incubate aliquote prelevati da pozzetti con diversi valori del terreno per S. epidermidis.

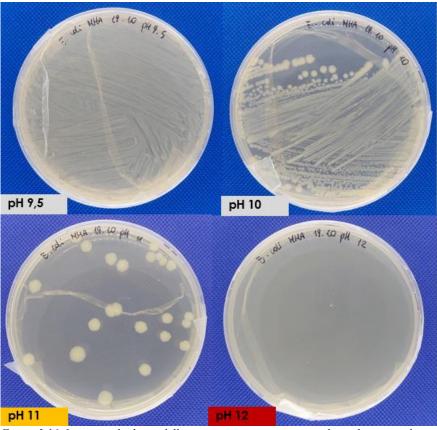


Figura 3.16. Immagini di alcune delle piastre su cui sono state incubate aliquote prelevati da pozzetti con diversi valori del terreno per E. coli.

#### 3.2.2 Metodo micro-diluizione in brodo

Nelle prove di micro-diluizione in brodo, si sono testate concentrazioni diverse di polveri di CaO, confrontando la crescita con un controllo biotico. Prima di commentare i risultati per i singoli campioni CaO-P, CaO-C e CaO-SG, è utile fare delle considerazioni valide per tutte le polveri testate. Un aspetto comune a tutte e tre le polveri è la sedimentazione di queste ultime nei pozzetti. Questo fenomeno, visibile ad occhio nudo, è particolarmente evidente per le concentrazioni al di sopra della soglia di solubilità del CaO in acqua. Quest'ultima è pari a 1,29 mg/ml a 25 °C [72]; questo valore si trova quindi a cavallo fra le concentrazioni "5" (1,92 mg/ml) e "6" (0,96 mg/ml) testate nella multiwell. La sedimentazione delle polveri ha l'effetto di intorbidire il pozzetto ad occhio nudo, il che rende il controllo visivo meno agevole. Inoltre, è probabile che la sedimentazione vada ad impattare sull'attività antimicrobica delle NPs. Poiché questa è funzione del contatto fra superficiale che può esplicare il contatto diretto con le cellule batteriche. L'effetto deleterio della sedimentazione è compatibile con quanto osservato già in letteratura [11] su polveri con scarsa solubilità in acqua, come CaO.

Si riporta in Tabella 3.2 la concentrazione testata in multi-well (per la determinazione della MIC) e successivamente su piastra (per la determinazione della MBC); le "etichette" numeriche su ciascuna piastra corrispondono alla concentrazione riportata in Tabella. Vengono riportate le immagini delle piastre corrispondenti alle concentrazioni MIC ed MBC, oltre ai valori di pH misurati nei pozzetti biotici dopo 24 h. In ordine, si espongono ora i risultati delle prove su ciascun campione, sia per *S. epidermidis* che per *E. coli*. Inoltre, nelle immagini vengono anche indicati i valori di pH misurati nei pozzetti biotici dopo 24h, evidenziando se l'effetto del pH sui microrganismi è inibente o meno.

Pozzetto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Conc.ne	20	15	7,5	3,75	1,92	0,96	0,48	0,24	0,12	0,06	0,03
[mg/ml]											

Tabella 3. 2. Valori di concentrazione delle polveri testate nei diversi pozzetti delle multi-well. Sulle piastre di cui verranno mostrate le immagini, l'etichetta corrispondente sarà per l'appunto corrispondente alla concentrazione qui riportata.

#### CaO-P

In Tabella 3.3, sono riportati i valori di MIC ed MBC determinati per il campione CaO-P sui microrganismi e, ove possibile, si sono riportati i valori corrispondenti di pH. In Figura 3.17 si riportano le foto delle piastre utilizzate per determinare la MBC su *S. epidermidis*; su ciascuna piastra si riporta la concentrazione di polvere testata. Inoltre, si evidenziano le MIC e le MBC determinate per il campione. Si evidenziano i valori di pH battericidi in rosso.

Questa prova è stata la prima ad essere effettuata sulle polveri di CaO per valutarne l'attività antimicrobica. È a seguito di questa prima prova che è emersa la necessità di valutare anche il pH ed il suo effetto sulla crescita batterica. Per questo motivo per tutte le successive prove si sono misurati i valori di pH dopo 24 h, cioè al termine dell'incubazione.

CaO-P	MIC	pН	MBC	pН
S. epidermidis	1,92 mg/ml	-	3,75 mg/ml	-
E. coli	3,75 mg/ml	9,3	7,5 mg/ml	11,0

Tabella 3.3. Valori di MIC e di MBC misurati per S. epidermidis ed E. coli per la polvere CaO-P, con (solo per E. coli) corrispondenti valori di pH misurati dopo 24 h.

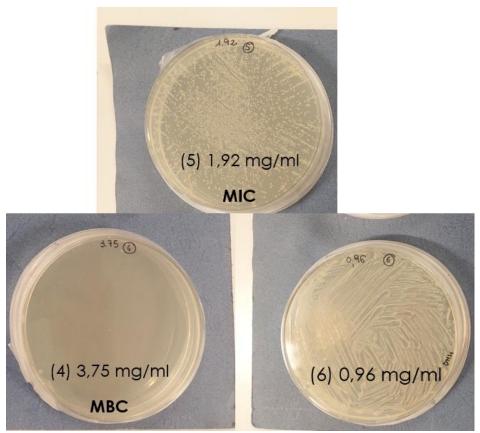


Figura 3.17. Immagini delle piastre di S. epidermidis, utilizzate per determinare la MBC, per CaO-P. Si evidenziano la MIC e la MBC, con i corrispondenti valori di concentrazione e di pH nei pozzetti sia biotici che abiotici.

In Figura 3.18 si riportano invece i risultati della prova su *E. coli* per CaO-P. Per ciascuna piastra, sono riportati i valori di MIC ed MBC su *E. coli*. In questo caso, così come per tutti i risultati successivi, vengono riportati i valori di pH misurati nel pozzetto biotico (cioè contenente polveri ed inoculo) dopo 24 h. In Figura, inoltre, vengono indicati con riquadro rosso quei valori di pH per il quale la crescita batterica è inibita dal solo pH, cioè dove il meccanismo responsabile dell'attività battericida è l'innalzamento del pH da parte delle polveri.

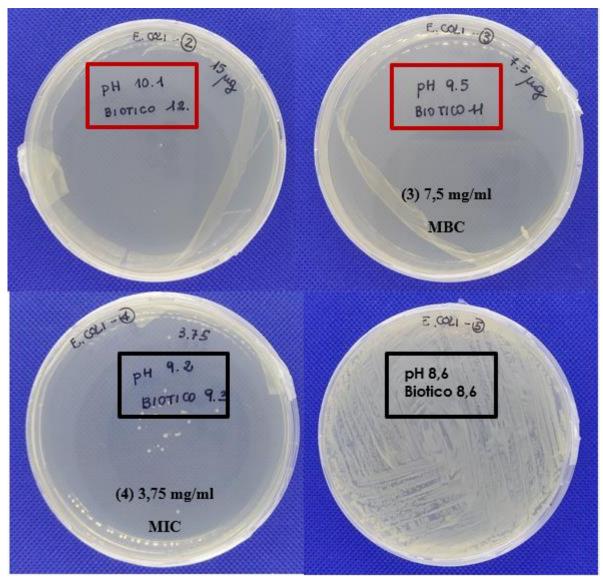


Figura 3.18. Immagini delle piastre di E. coli, utilizzate per determinare la MBC, per CaO-P. Si evidenziano la MIC e la MBC, con i corrispondenti valori di concentrazione e di pH nei pozzetti sia biotici che abiotici.

## CaO-C

In Tabella 3.4 si riportano i valori di MIC e di MBC misurati per CaO-C, sia per *S. epidermidis* che per *E. coli*. Sono inoltre riportati i valori di pH misurati nei pozzetti abiotici con corrispondente concentrazione delle polveri.

CaO-C	MIC	рН	MBC	pН
S. epidermidis	0,96 mg/ml	8,3	1,92 mg/ml	8,9
E. coli	1,92 mg/ml	8,1	3,75 mg/ml	8,8

Tabella 3.4. Valori di MIC e di MBC misurati per S. epidermidis ed E. coli per la polvere CaO-C, con corrispondenti valori di pH misurati dopo 24 h.

A titolo di esempio, in Figura 3.19 sono invece riportate le immagini delle piastre utilizzate per determinare la MBC per *E. coli* nel caso di CaO-C. Sono inoltre riportati i valori di pH. Si osserva che, in questo caso, sia la MIC che la MBC corrispondono a concentrazioni per le quali il pH in sé non ha effetto inibente sulla crescita.

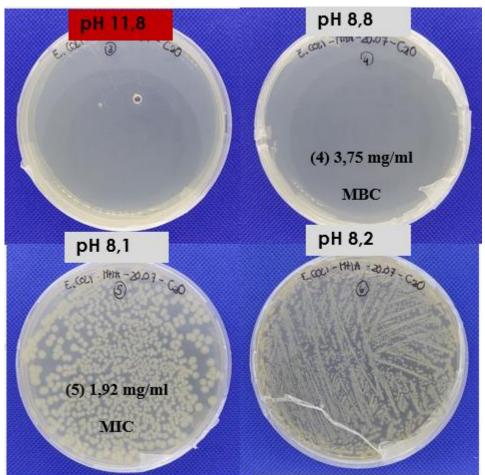


Figura 3.19. Immagini delle piastre di E. coli, utilizzate per determinare la MBC, per CaO-C. Si evidenziano la MIC e la MBC, con i corrispondenti valori di concentrazione e di pH nei pozzetti biotici.

#### CaO-SG

In Tabella 3.5 si riportano i valori di MIC e di MBC, per la polvere CaO-SG, determinati sia per *S. epidermidis* che per *E. coli*. Sono inoltre riportati i valori di pH misurati nei pozzetti biotici dopo 24 h. Sono evidenziati in rosso i valori di pH che hanno effetto battericida.

CaO-SG	MIC	pН	MBC	pН
S. epidermidis	0,48 mg/ml	8,2	1,92 mg/ml	10,1
E. coli	0,96 mg/ml	8,9	3,75 mg/ml	12,5

Tabella 3.5. Valori di MIC e di MBC misurati per S. epidermidis ed E. coli per la polvere CaO-SG, con corrispondenti valori di pH misurati dopo 24 h.

È importante sottolineare il fatto che sia per MIC che per MBC i valori di pH corrispondenti sono valori in sé non inibenti per la crescita batterica.

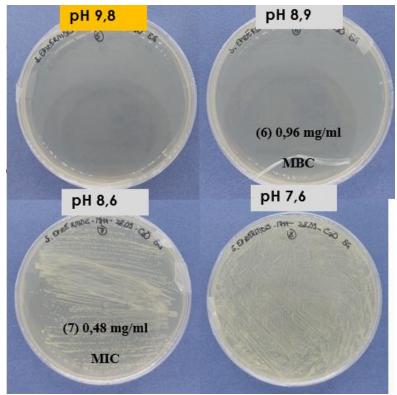


Figura 3.20. Immagini delle piastre di S. epidermidis, utilizzate per determinare la MBC, per CaO-SG. Si evidenziano la MIC e la MBC, con i corrispondenti valori di concentrazione e di pH nei pozzetti biotici.

In Figura 3.21 sono invece riportate le immagini delle piastre, dopo l'incubazione di 24 h, utilizzate per definire la MBC su *E. coli*. In questo caso è possibile notare il fatto che la MBC corrisponde ad un valore di pH già intrinsecamente battericida. Inoltre, la MIC corrisponde ad un valore di pH che è già di per sé batteriostatico per il microrganismo. In questo caso, risulta quindi meno semplice discernere l'effetto intrinseco diretto delle NPs da quello indiretto dovuto all'innalzamento del pH.

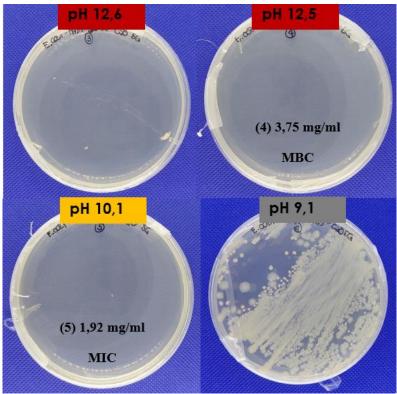


Figura 3.21. Immagini delle piastre di E. coli, utilizzate per determinare la MBC, per CaO-SG. Si evidenziano la MIC e la MBC, con i corrispondenti valori di concentrazione e di pH nei pozzetti biotici.

#### Correlazione fra valori di pH ed inibizione crescita batterica

I risultati delle prove di brodo micro-diluizione possono essere analizzati nel loro insieme, per poter discernere fra l'effetto inibente diretto delle polveri ed un effetto indiretto, dovuto a valori di pH basici. È utile quindi confrontare i valori di pH corrispondenti alla MIC ed alla MBC per le varie polveri con i valori di pH batteriostatici o battericidi per i due batteri testati.

Nei grafici successivi si riportano, per ciascun batterio e ciascuna polvere, i valori di pH misurati per tutte le concentrazioni testate in multi-well. Viene inoltre riportato il valore di pH del pozzetto biotico di controllo, misurato nella prova di micro-diluizione in brodo con terreno modificato.

Inoltre, vengono riportati i valori di pH batteriostatico (linea orizzontale gialla) e battericida (linea orizzontale rossa), nonché i valori di MIC e di MBC.

Nelle Figure 3.22 e 3.23, si riportano i valori di pH misurati su *S. epidermidis* nel caso, rispettivamente, del CaO-C e del CaO-SG.

È innanzitutto evidente il fatto che, per entrambe le polveri, l'attività antimicrobica si esplica già per valori di pH non inibenti sulla crescita batterica. È quindi possibile ipotizzare che le polveri di CaO-C e di CaO-SG presentino un'attività antimicrobica intrinseca, con un effetto diretto su *S. epidermidis*. Le misure di pH non sono state invece effettuate nel caso di CaO-P, poiché era la prima prova antimicrobica effettuata in ordine cronologico e l'importanza del ruolo del pH non era ancora emersa.

# Valori pH S. epidermidis - CaO-C

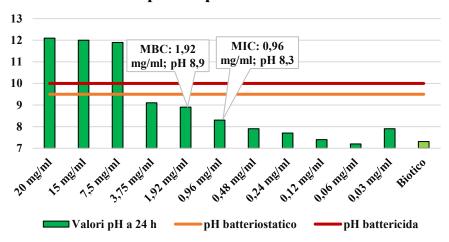


Figura 3.22. Valori di pH biotici, misurati dopo 24 h, per S. epidermidis su CaO-C. Si riportano inoltre i valori di pH batteriostatico e battericida per il batterio.

# Valori pH S. epidermidis - CaO-SG

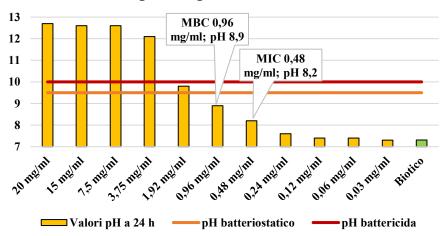


Figura 3.23. Valori di pH biotici, misurati dopo 24 h, per S. epidermidis su CaO-SG. Si riportano inoltre i valori di pH batteriostatico e battericida per il batterio.

Nelle Figure 3.24, 3.25 e 3.26 si riportano invece i grafici relativi alle prove effettuate su *E. coli* sulle polveri CaO-P, CaO-C e CaO-SG, rispettivamente.

# Valori pH E. coli - CaO-P

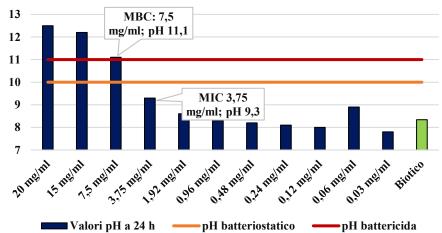


Figura 3.24. Valori di pH biotici, misurati dopo 24 h, per E. coli, su CaO-P. Si riportano inoltre i valori di pH batteriostatico e battericida per il batterio.

#### Valori pH E. coli - CaO-C

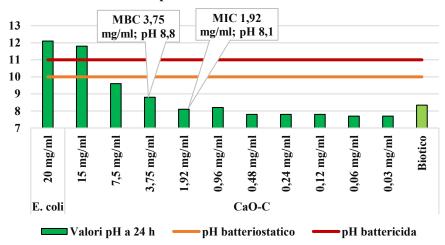


Figura 3.25. Valori di pH biotici, misurati dopo 24 h, per E. coli, su CaO-C. Si riportano inoltre i valori di pH batteriostatico e battericida per il batterio.

# Valori pH E. coli - CaO-SG

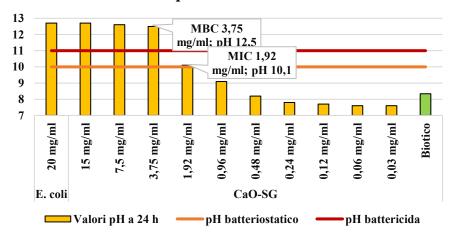


Figura 3.26. Valori di pH biotici, misurati dopo 24 h, per E. coli, su CaO-SG. Si riportano inoltre i valori di pH batteriostatico e battericida per il batterio.

Per il campione CaO-P (Fiugra 3.24), la sovrapposizione degli effetti rende meno semplice distinguere fra l'effetto diretto delle particelle e quello indiretto dato dall'innalzamento di pH. In questo caso, la MBC corrisponde infatti ad un valore di pH battericida su *E. coli*. La MIC, invece, corrisponde a valore di pH non inibente sulla crescita batterica. È probabile quindi che i due meccanismi di azione siano sinergici. Il campione CaO-C (Figura 3.25) risulta avere attività antimicrobica intrinseca anche su *E. coli*. Le MIC e le MBC determinate corrispondono infatti a valori di pH che non inibiscono la crescita batterica. Per il campione CaO-SG, la sovrapposizione degli effetti è ancora più evidente. La MIC determinata nella prova di micro-diluizione in brodo corrisponde ad un valore di pH già intrinsecamente battericida. Per questo campione, su *E. coli*, i due meccanismi di azione giocano entrambi un ruolo importante; è probabile che l'innalzamento da pH sia il principale meccanismo di attività antimicrobica per lo specifico campione e per lo specifico microrganismo.

		CaO-P	CaO commerciale	CaO-SG
Multi-well	MIC	1,92 mg/ml	0,96 mg/ml	0,48 mg/ml
	pН	-	8,3	8,2
Piastratura	MBC	3,75 mg/ml	1,92 mg/ml	0,96 mg/ml
	pН	-	8,9	8,9
Goccia		Nessun alone	e di inibizione	

Tabella 3.6. Risultati prova di micro-diluizione in brodo (valori di MIC ed MBC, con annessi valori di pH) e della prova di diffusione in agar modificata su S. epidermidis per i tre campioni di polvere.

		CaO-P	CaO commerciale	CaO-SG		
Multi-well	MIC	3,75 mg/ml	1,92 mg/ml	1,92 mg/ml		
	pН	9,3	8,1	10,1		
Piastratura	MBC	7,5 mg/ml	3,75 mg/ml	3,75 mg/ml		
	pН	11,1	8,8	12,5		
Goccia		Nessun alone di inibizione				

Tabella 3. 7. Risultati prova di micro-diluizione in brodo (valori di MIC ed MBC, con annessi valori di pH) e della prova di diffusione in agar modificata su E. coli per i tre campioni di polvere.

L'attività antimicrobica delle polveri di CaO testate, nelle specifiche condizioni della prova, è maggiore sul batterio Gram(+) *S. epidermidis* rispetto al batterio Gram(-) *E. coli*. Le MIC e le MBC misurate per i tre campioni sono infatti sempre maggiori per *E. coli*, a parità di polvere. Questo risultato è coerente con la letteratura scientifica sul CaO [13], nonché con il comportamento delle particelle di ossidi metallici in generale [73].

Per *S. epidermidis*, sulla base delle MIC e delle MBC determinate, il campione CaO-SG risulta essere il campione più efficace, seguito da CaO-C, seguito a sua volta da CaO-P. Questo risultato è significativo, in quanto apparentemente non vi è correlazione fra la taglia media delle particelle e loro attività antimicrobica.

Per *E. coli*, invece, i campioni CaO-SG e CaO-C hanno sostanzialmente lo stesso comportamento, in termini di MIC e di MBC misurate. La differenza principale è che per CaO-C è possibile attribuire l'attività antimicrobica principalmente ad un effetto intrinseco e diretto delle particelle, mentre per

CaO-SG vi è sovrapposizione con l'effetto indiretto dato dal pH. Il campione CaO-P, come per *S. epidermidis*, ha la minore attività antimicrobica.

## 3.2.3 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato

La prova di diffusione in agar modificato, anche chiamata "prova della goccia", si è rivelata una prova poco significativa in termini di valutazione dell'attività antimicrobica testata. Per valutare l'effetto delle polveri sui microrganismi, si è effettuata la misura dell'alone di inibizione della crescita batterica che si forma attorno alla goccia. Tuttavia, per nessuna delle polveri testate e per nessuna concentrazione è stato possibile osservare un alone. Le problematiche emerse nella prova della goccia sono coerenti con quanto sostenuto in letteratura su polveri micrometriche di CaO [12] e, in generale, su polveri di ossidi metallici.

A titolo di esempio, in Figura 3.27 è riportata un'immagine relativa ad una delle prove effettuate. In particolare, la piastra è stata inoculata con *E. coli* e sono state depositate gocce delle sospensioni di polveri del campione CaO-P. Le concentrazioni testate (mg/ml) sono riportate sulla piastra. Ciascuna goccia è evidenziata da un cerchio nero.

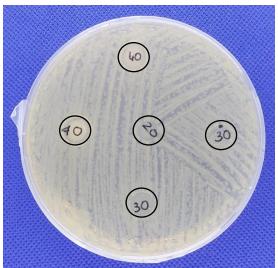


Figura 3.27. Immagine della prova della goccia effetuata su E. coli con CaO-P, per le concentrazioni più elevate.

#### 4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il lavoro svolto in questa tesi aveva, come obiettivo, la sintesi e caratterizzazione di polveri submicrometriche e nanometriche di ossido di calcio, nonché l'indagine relativa alla loro attività antimicrobica. Questo lavoro si inserisce in un contesto relativamente povero di letteratura scientifica preesistente.

Per quanto riguarda la sintesi, è stato possibile ottenere polveri di CaO seguendo due vie di sintesi: la calcinazione da idrossido di calcio, ottenuto per precipitazione acquosa, e la sintesi sol-gel. La sintesi per calcinazione di idrossido restituisce particelle sub-micrometriche, mentre la sintesi sol-gel restituisce particelle nanometriche. In entrambi i casi, l'area superficiale risulta essere bassa (<10 m²/g). Per confronto, si è inoltre caratterizzato e testato un campione di CaO commerciale con particelle di dimensione sub-micrometrica, caratterizzate da forte agglomerazione e da struttura romboedrica, calcite-like. Il lavoro di tesi, in questo senso, conferma la possibilità di ottenere polveri di CaO attraverso diversi percorsi di sintesi. Tuttavia, solo la sintesi per via sol-gel ha permesso di ottenere nanoparticelle, nonché un valore dell'area superficiale apprezzabile, per quanto relativamente basso.

In un'ottica futura, per quanto riguarda i campioni di sintesi, potrebbe essere significativo effettuare degli studi sulla calcinazione dell'idrossido, nell'ottica di ottimizzare le proprietà finali del CaO, con attenzione particolare alla sua risposta antimicrobica. Analogamente, i parametri scelti per la sintesi sol-gel ed il successivo trattamento termico dovrebbero essere studiati per migliorare le proprietà della polvere. È bene sottolineare che, in letteratura, non vi sono studi di attività antimicrobica su polveri di CaO prodotte per via sol-gel. La sintesi sol-gel proposta in questa tesi rappresenta un'utile alternativa alle sintesi tradizionali da idrossido di calcio. La ricerca futura potrebbe vertere su ulteriori diverse vie di sintesi del CaO, come sintesi assistita da microonde o sintesi "green", utilizzando precursori di origine organica, come estratti di piante. Altro aspetto significativo potrebbe essere l'utilizzo di una sintesi assistita da un templante, come il CTAB [74], nell'ottica di inibire la crescita delle particelle. Infine, un possibile sviluppo futuro potrebbe essere la ricerca su sistemi di ossidi misti, per esempio CaO-ZnO.

Un aspetto importante collegato alle polveri è la loro conservazione. Il CaO è naturalmente sensibile alla carbonatazione, per reazione con la CO<sub>2</sub> presente in aria, ed all'idratazione, per reazione con l'umidità. Per questo motivo, oltre a cercare di stabilizzare a monte il CaO ottimizzando i parametri di sintesi, è bene sottolineare che la polvere presenta dell'instabilità chimica. Un altro ramo della ricerca sull'ossido di calcio e sulla sua attività antimicrobica potrebbe essere l'analisi del suo invecchiamento nel tempo e da quali parametri questo è influenzato. Altro aspetto importante, collegato alla reattività delle polveri, è come l'ossido di calcio interagisce con l'ambiente quando è immerso in ambiente acquoso, soprattutto nell'ottica di un'applicazione *in vivo*.

Per quanto riguarda l'attività antimicrobica, le polveri sono state testate sia su batteri Gram(+) (*Staphilococcus epidermidis*) che su batteri Gram(-) (*Escherichia coli*). Nelle prove si sono ottenuti valori di MIC e di MBC per entrambi i batteri, nelle condizioni della prova, per tutti e tre i campioni di polvere. Inoltre, si è valutato l'effetto che le polveri avessero sul pH del mezzo di dispersione, nonché l'effetto che il pH ha intrinsecamente sulla crescita batterica. Da queste prove, è emerso infatti che il CaO, specie per concentrazioni elevate, abbia un effetto sul pH, che si innalza verso valori alcalini. Questo fenomeno ha imposto quindi di indagare sulla natura dell'attività antimicrobica, scindendo l'effetto diretto ed intrinseco delle particelle da quello indiretto dovuto ad innalzamento del pH.

Dalla prova di micro-diluizione in brodo emerge un'attività antimicrobica più efficace sui batteri Gram(+) rispetto ai batteri Gram(-), compatibilmente con quanto accade con altri ossidi metallici, come ZnO [56] o TiO<sub>2</sub> [6]. Per quanto riguarda le prove su *S. epidermidis*, l'attività antimicrobica si esplica anche per valori di pH non inibenti, probabilmente a riprova dell'esistenza di meccanismo di attività intrinseco delle polveri. Per *E. coli*, la scissione dell'effetto intrinseco delle polveri e

dell'effetto indiretto dato dal pH è meno evidente. Tuttavia, è bene evidenziare che, anche qualora l'attività antimicrobica sia dovuta al solo innalzamento di pH, questo non rende meno validi i risultati ottenuti. L'attenzione rivolta all'effetto del pH è un aspetto che non è stato affrontato dagli altri studi condotti sull'attività antimicrobica delle polveri di CaO. La ricerca futura potrebbe quindi indagare in modo più approfondito su questo effetto, nonché investigare quali meccanismi siano effettivamente alla base dell'attività delle particelle.

La prova di micro-diluizione in brodo ha inoltre permesso di evidenziare che non vi è apparente correlazione fra la risposta antimicrobica e la taglia media delle particelle. Il campione con maggiore efficacia, il CaO-SG, è quello con taglia minore, mentre il campione CaO-P, con taglia intermedia, risulta meno performante rispetto al CaO-C, con taglia più elevata, per entrambi i microrganismi testati. Questo aspetto richiede dunque ulteriori analisi e studi, per comprendere quale sia il ruolo giocato dalla taglia delle particelle. Inoltre, esso si correla con una delle criticità emerse in questa prova, espresse già in altri studi sull'attività antimicrobica [11], [12]: la sedimentazione delle polveri nei pozzetti. Questo rende le analisi visive delle multi-well più complesse, oltre a rendere le misure di assorbanza meno significative. Inoltre, è possibile che l'impaccamento delle polveri sedimentate influisca sulla loro attività antimicrobica, riducendo l'area superficiale effettivamente a contatto con le cellule batteriche. Ulteriori ricerche potrebbero essere condotte nell'ottica di aggirare questo ostacolo, per esempio con analisi turbidimetriche basate su altri parametri (come la conducibilità nei pozzetti) [12].

Per quanto riguarda la prova della goccia, anche in questo caso è emersa una criticità, ossia il fatto che la scarsa solubilità della polvere in acqua rende poco agevole l'interpretazione dei risultati [11]. Potrebbe quindi essere utile testare l'attività antimicrobica delle polveri di CaO attraverso altre tecniche.

Comprovata l'attività antimicrobica delle particelle di CaO, è inoltre possibile valutare la produzione di materiali compositi, per esempio film polimerici, in cui sono disperse le polveri, nell'ottica di valutare la loro efficacia quando non direttamente disperse in un mezzo acquoso.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Sehgal, H. J. Ladd, e B. Totapally, «Trends in Epidemiology and Microbiology of Severe Sepsis and Septic Shock in Children», *Hosp Pediatr*, vol. 10, n. 12, pagg. 1021–1030, dic. 2020, doi: 10.1542/hpeds.2020-0174.
- [2] «Antimicrobial resistance», OMS Organizzazione Mondiale della Sanità, nov. 17, 2021.
- [3] F. C. Tenover e J. M. Hughes, «The challenges of emerging infectious diseases: Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens», *JAMA*, vol. 275, n. 4, pagg. 300–304, 1996, doi: 10.1001/jama.275.4.300.
- [4] C. J. Murray *et al.*, «Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis», *The Lancet*, vol. 399, n. 10325, pagg. 629–655, feb. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [5] E. Hoseinzadeh *et al.*, «1; 6 King Fahd Medical Research Center», *Curr Drug Metab*, vol. 18, pagg. 0–000, 2017, doi: 10.2174/13892002176661612011111.
- [6] A. B. Younis, Y. Haddad, L. Kosaristanova, e K. Smerkova, «Titanium dioxide nanoparticles: Recent progress in antimicrobial applications», *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, ott. 2022, doi: 10.1002/wnan.1860.
- [7] D. Ziental *et al.*, «Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine», *Nanomaterials*, vol. 10, n. 2, pag. 387, feb. 2020, doi: 10.3390/nano10020387.
- [8] Y. Li, C. Liao, e S. C. Tjong, «Recent advances in zinc oxide nanostructures with antimicrobial activities», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, n. 22. MDPI AG, pagg. 1–70, nov. 02, 2020. doi: 10.3390/ijms21228836.
- [9] G. R. Rudramurthy, M. K. Swamy, U. R. Sinniah, e A. Ghasemzadeh, «Nanoparticles: Alternatives against drug-resistant pathogenic microbes», *Molecules*, vol. 21, n. 7. MDPI AG, lug. 01, 2016. doi: 10.3390/molecules21070836.
- [10] A. Khezerlou, M. Alizadeh-Sani, M. Azizi-Lalabadi, e A. Ehsani, «Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses», *Microbial Pathogenesis*, vol. 123. Academic Press, pagg. 505–526, ott. 01, 2018. doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.008.
- [11] J. Sawai, «Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay», *J Microbiol Methods*, vol. 54, n. 2, pagg. 177–182, ago. 2003, doi: 10.1016/S0167-7012(03)00037-X.
- [12] J. Sawal, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, e M. Shimizu, «Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method», *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN*, vol. 28, n. 3, pagg. 288–293, 1995, doi: 10.1252/jcej.28.288.
- [13] A. Roy, S. S. Gauri, M. Bhattacharya, e J. Bhattacharya, «Antimicrobial activity of CaO nanoparticles», *J Biomed Nanotechnol*, vol. 9, n. 9, pagg. 1570–1578, gen. 2013, doi: 10.1166/jbn.2013.1681.

- [14] Z.-X. Tang, Z. Yu, Z.-L. Zhang, X.-Y. Zhang, Q.-Q. Pan, e L.-E. Shi, «SONICATION-ASSISTED PREPARATION OF CaO NANOPARTICLES FOR ANTIBACTERIAL AGENTS», 2013.
- [15] S. Kumar, V. Sharma, J. K. Pradhan, S. K. Sharma, P. Singh, e J. K. Sharma, «Structural, optical and antibacterial response of CaO nanoparticles synthesized via direct precipitation technique», *Nano Biomed Eng*, vol. 13, n. 2, pagg. 172–178, 2021, doi: 10.5101/NBE.V13I2.P172-178.
- [16] «Microbo», Dizionario di Medicina, Treccani.
- [17] H. G. Liddell e R. Scott, «βακτήριον, A Greek-English Lexicon», 1999.
- [18] G. Dehò e E. Galli, *Biologia dei microrganismi*, Seconda edizione. Casa Editrice Ambrosiana, 2014.
- [19] R. 'Marino, *Wastewater Biology The Microlife*, Terza edizione. Water Environment Federation, 2017.
- [20] S.-W. Jeong e Y. J. Choi, «Extremophilic Microorganisms for the Treatment of Toxic Pollutants in the Environment», *Molecules*, vol. 25, n. 21, pag. 4916, ott. 2020, doi: 10.3390/molecules25214916.
- [21] J. Slonczewski e J. Foster, *Microbiology: An Evolving Science*, Terza edizione. WW Norton & Company.
- [22] M. McFall-Ngai, «Care for the community», *Nature*, vol. 445, n. 7124, pagg. 153–153, gen. 2007, doi: 10.1038/445153a.
- [23] OMS Organizzazione Mondiale della Sanità, «Plague».
- [24] OMS Organizzazione Mondiale della Sanità, «Tuberculosis».
- [25] O. Ruuskanen, E. Lahti, L. C. Jennings, e D. R. Murdoch, «Viral pneumonia», *The Lancet*, vol. 377, n. 9773, pagg. 1264–1275, apr. 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(10)61459-6.
- [26] D. H. Crawford, *Viruses: A Very Short Introduction*, Seconda edizione. Oxford: Oxford Academic, 2018.
- [27] E. v. Koonin e P. Starokadomskyy, «Are viruses alive? The replicator paradigm sheds decisive light on an old but misguided question», *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, vol. 59, pagg. 125–134, ott. 2016, doi: 10.1016/j.shpsc.2016.02.016.
- [28] J. Antonovics *et al.*, «The evolution of transmission mode», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 372, n. 1719, pag. 20160083, mag. 2017, doi: 10.1098/rstb.2016.0083.
- [29] S. R. Weiss e J. L. Leibowitz, «Coronavirus Pathogenesis», 2011, pagg. 85–164. doi: 10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2.
- [30] OMS Organizzazione Mondiale della Sanità, «Smallpox, Factsheet», set. 21, 2007.

- [31] John Hopkins University, «COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU)», *John Hopkins University*, ott. 20, 2022.
- [32] «The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks», *Nat Microbiol*, vol. 5, n. 5, pagg. 668–674, mag. 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0709-x.
- [33] H. M. Temin e D. Baltimore, «RNA-Directed DNA Synthesis and RNA Tumor Viruses», 1972, pagg. 129–186. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60749-6.
- [34] McKeen e Lawrence, Effect of Sterilization Methods on Plastics and Elastomers, Quarta edizione. Elsevier, 2018.
- [35] H. Botany Faculty, «Spore Dispersal in Fungi».
- [36] G. 'Barlow e J. 'Peter, *Kumar and Clark's Clinical Medicine*, Decima edizione. Elsevier, 2020.
- [37] «Stop neglecting fungi», *Nat Microbiol*, vol. 2, n. 8, pag. 17120, ago. 2017, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.120.
- [38] D. L. Hawksworth e R. Lücking, «Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species», *Microbiol Spectr*, vol. 5, n. 4, ago. 2017, doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- [39] A. S. Fauci e D. M. Morens, «The Perpetual Challenge of Infectious Diseases», *New England Journal of Medicine*, vol. 366, n. 5, pagg. 454–461, feb. 2012, doi: 10.1056/NEJMra1108296.
- [40] K. Gould, «Antibiotics: from prehistory to the present day», *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 71, n. 3, pagg. 572–575, mar. 2016, doi: 10.1093/jac/dkv484.
- [41] R. W. Finberg *et al.*, «The Importance of Bactericidal Drugs: Future Directions in Infectious Disease», *Clinical Infectious Diseases*, vol. 39, n. 9, pagg. 1314–1320, nov. 2004, doi: 10.1086/425009.
- [42] H. J. 'Field e E. 'DeClerq, «Antiviral drugs-a short history of their discovery and development», *Microbiology Today*, vol. 31, n. 2, pagg. 58–61, 2004.
- [43] V. 'Salib, «A History of Antivirals: Mechanisms, Classes, and Subtypes», *Pharma News Intelligence*, ago. 12, 2022.
- [44] A. ''Homei e M. ''Worboys, Fungal Disease in Britain and the United States 1850–2000: Mycoses and Modernity. Basingstoke (UK): Palgrave Macmillan, 2013.
- [45] D. 'Dixon e T. 'Walsh, *Medical Microbiology*, Quarta edizione. Galveston (Texas, USA): University of Texas Medical Branch, Galveston, 1996.
- [46] H. D. Marston, D. M. Dixon, J. M. Knisely, T. N. Palmore, e A. S. Fauci, «Antimicrobial resistance», *JAMA Journal of the American Medical Association*, vol. 316, n. 11, pagg. 1193–1204, set. 2016, doi: 10.1001/jama.2016.11764.
- [47] A. Srinivasan, J. L. Lopez-Ribot, e A. K. Ramasubramanian, «Overcoming antifungal resistance», *Drug Discov Today Technol*, vol. 11, pagg. 65–71, mar. 2014, doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.005.

- [48] D. D. Richman, «Antiviral drug resistance», *Antiviral Res*, vol. 71, n. 2–3, pagg. 117–121, set. 2006, doi: 10.1016/j.antiviral.2006.03.004.
- [49] G. Mancuso, A. Midiri, E. Gerace, e C. Biondo, «Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens», *Pathogens*, vol. 10, n. 10. MDPI, ott. 01, 2021. doi: 10.3390/pathogens10101310.
- [50] H. D. Marston, D. M. Dixon, J. M. Knisely, T. N. Palmore, e A. S. Fauci, «Antimicrobial resistance», *JAMA Journal of the American Medical Association*, vol. 316, n. 11, pagg. 1193–1204, set. 2016, doi: 10.1001/jama.2016.11764.
- [51] M. Ferri, E. Ranucci, P. Romagnoli, e V. Giaccone, «Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems», *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 57, n. 13, pagg. 2857–2876, set. 2017, doi: 10.1080/10408398.2015.1077192.
- [52] N. Allocati, M. Masulli, M. F. Alexeyev, e C. di Ilio, «Escherichia coli in Europe: An overview», *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 10, n. 12. MDPI, pagg. 6235–6254, nov. 25, 2013. doi: 10.3390/ijerph10126235.
- [53] A. B. Brueggemann e G. v Doern, «Resistance Among Streptococcus pneumoniae: Patterns, Mechanisms, Interpreting the Breakpoints».
- [54] M. L. Ermini e V. Voliani, «Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age», *ACS Nano*, vol. 15, n. 4, pagg. 6008–6029, apr. 2021, doi: 10.1021/acsnano.0c10756.
- [55] V. V. Pokropivny e V. V. Skorokhod, «Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science», *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, n. 5–8, pagg. 990–993, set. 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.09.023.
- [56] R. Kumar, A. Umar, G. Kumar, e H. S. Nalwa, «Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review», *Ceramics International*, vol. 43, n. 5. Elsevier Ltd, pagg. 3940–3961, apr. 01, 2017. doi: 10.1016/j.ceramint.2016.12.062.
- [57] A. Abbaszadegan *et al.*, «The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study», *J Nanomater*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/720654.
- [58] U. Ijaz, I. A. Bhatti, S. Mirza, e A. Ashar, «Characterization and evaluation of antibacterial activity of plant mediated calcium oxide (CaO) nanoparticles by employing Mentha pipertia extract», *Mater Res Express*, vol. 4, n. 10, ott. 2017, doi: 10.1088/2053-1591/aa8603.
- [59] A. Raghunath e E. Perumal, «Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future», *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 49, n. 2. Elsevier B.V., pagg. 137–152, feb. 01, 2017. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011.
- [60] H. Arab, B. Shojaee Sadi, e K. Amini, «Effects of iron nano-particle's on expression of tetracycline resistance encoding genes in Staphylococcus aureus by Real Time-PCR», *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, vol. 69, n. 2, pagg. 973–978, 2018, doi: 10.12681/jhvms.18025.
- [61] M. Vert *et al.*, «Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)», *Pure and Applied Chemistry*, vol. 84, n. 2, pagg. 377–410, gen. 2012, doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04.

- [62] H. Vlamakis, C. Aguilar, R. Losick, e R. Kolter, «Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community», *Genes Dev*, vol. 22, n. 7, pagg. 945–953, apr. 2008, doi: 10.1101/gad.1645008.
- [63] N. H. de Leeuw e J. A. Purton, «Density-functional theory calculations of the interaction of protons and water with low-coordinated surface sites of calcium oxide», *Phys Rev B Condens Matter Mater Phys*, vol. 63, n. 19, pagg. 1954171–1954179, 2001, doi: 10.1103/physrevb.63.195417.
- [64] C. Loyo *et al.*, «PLA/CaO nanocomposites with antimicrobial and photodegradation properties», *Polym Degrad Stab*, vol. 197, mar. 2022, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2022.109865.
- [65] C. Silva *et al.*, «Mechanical and antimicrobial polyethylene composites with CaO nanoparticles», *Polymers (Basel)*, vol. 12, n. 9, set. 2020, doi: 10.3390/POLYM12092132.
- [66] T. Jiang, H. Zhang, Z. Xu, Y. Zhao, X. Ma, e S. Wang, «Scale-up production and process optimization of Zr-doped CaO-based sorbent for CO2 capture», *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, vol. 15, n. 5, set. 2020, doi: 10.1002/apj.2502.
- [67] T. Luo, C. Luo, Z. Shi, X. Li, F. Wu, e L. Zhang, «Optimization of sol-gel combustion synthesis for calcium looping CO2 sorbents, part I: Effects of sol-gel preparation and combustion conditions», *Sep Purif Technol*, vol. 292, lug. 2022, doi: 10.1016/j.seppur.2022.121081.
- [68] E. T. Santos *et al.*, «Investigation of a stable synthetic sol-gel CaO sorbent for CO 2 capture», *Fuel*, vol. 94, pagg. 624–628, apr. 2012, doi: 10.1016/j.fuel.2011.10.011.
- [69] M. Thommes *et al.*, «Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)», *Pure and Applied Chemistry*, vol. 87, n. 9–10, pagg. 1051–1069, ott. 2015, doi: 10.1515/pac-2014-1117.
- [70] W. G. Liu, N. W. L. Low, B. Feng, G. Wang, e J. C. Diniz Da Costa, «Calcium precursors for the production of CaO sorbents for multicycle CO2 capture», *Environ Sci Technol*, vol. 44, n. 2, pagg. 841–847, gen. 2010, doi: 10.1021/es902426n.
- [71] G. S. Kumar, A. Ramakrishnan, e Y.-T. Hung, «Lime Calcination», in *Advanced Physicochemical Treatment Technologies*, Totowa, NJ: Humana Press, pagg. 611–633. doi: 10.1007/978-1-59745-173-4\_14.
- [72] National Research Council (US) Committee on Water Treatment Chemicals., A c. di, *Water Chemicals Codex*. Washington, DC, USA, 1982.
- [73] S. M. Dizaj, F. Lotfipour, M. Barzegar-Jalali, M. H. Zarrintan, e K. Adibkia, «Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles», *Materials Science and Engineering C*, vol. 44. Elsevier Ltd, pagg. 278–284, nov. 01, 2014. doi: 10.1016/j.msec.2014.08.031.
- [74] W. Yuejuan, M. Jingmeng, L. Mengfei, F. Ping, e H. Mai, «Preparation of High-Surface Area Nano-CeO2 by Template-Assisted Precipitation Method», *Journal of Rare Earths*, vol. 25, n. 1, pagg. 58–62, feb. 2007, doi: 10.1016/S1002-0721(07)60045-3.

#### RINGRAZIAMENTI

Vuoi per orgoglio, vuoi per gelosia della mia indipendenza, non amo lasciarmi aiutare da chi mi sta vicino e, di conseguenza, fatico spesso manifestare la mia gratitudine. Nella costrizione di queste poche righe, non riuscirò a fare pienamente ammenda per questo, ma spero di riuscire a fare del mio meglio.

Ringrazio innanzitutto le professoresse Barbara Onida, Silvia Ronchetti e Francesca Bosco, la dottoressa Mollea. Vi ringrazio per la disponibilità e la professionalità mostratemi durante questo lavoro. Grazie, inoltre, a Sara e Paolo, i quali hanno contribuito con i loro consigli e la loro supervisione con entusiasmo alla stesura.

Non posso che proseguire con i miei genitori. Grazie per aver assecondato la mia curiosità, per avermi fornito gli strumenti per costruirmi principi saldi e valori fondanti della mia persona e per aver saputo smussare i miei spigoli più aguzzi, quando necessario e doveroso.

Proseguo con la mia famiglia. Grazie per il sostegno e l'affetto mostratomi negli anni, per la condivisione di momenti felici e per avermi saputo consigliare in modo schietto ma mai oppressivo. Approfitto per ricordare la nonna Vittoria: anche se non ci sei potuta essere, sono sicuro che la tua felicità oggi sarebbe stata contagiosa per tutti noi.

Ringrazio anche mio cugino Michele, un familiare ed un amico fraterno insieme. Grazie per avermi sempre manifestato la voglia di includermi, per l'intesa che hai contribuito a costruire, e per aver saputo spingermi fuori dalla mia *comfort zone* senza mai farmi sentire a disagio.

Mi rivolgo ora agli amici di lunga data: Erica, Francesco e Roberta. Grazie per aver saputo vedere il meglio di me e credere a pieno in me, anche quando non ci riuscivo io stesso. Grazie per avermi insegnato l'importanza delle relazioni che si costruiscono e per aver reso lo sforzo per tenerle in piedi un piacere.

Ringrazio i miei compagni di corso Marta, Silvia e Davide, sempre presenti in questi anni di studio (e non solo, per fortuna!). Grazie per aver reso questo percorso molto più gradevole e per aver costruito, nel mentre, amicizie salde.

Infine, grazie agli amici e a tutti coloro che, pur non essendo citati espressamente, mi hanno regalato momenti piacevoli, ascoltato i miei monologhi non richiesti o aver reso possibili esperienze e situazioni che mi hanno aiutato a maturare. Siete una parte importante dell'ossatura della vita futura che mi attende.