

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale In Ingegneria Chimica e dei processi sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Proprietà antimicrobiche di film polisaccaridici e proteici per il *wound dressing*



Relatori

Prof.ssa Francesca Bosco
Dott.ssa Donatella Duraccio

Candidato

Mariangela D'Andrea

A.A. 2017/2018

Sommario

1. INTRODUZIONE	9
1.1. Il <i>wound dressing</i>	9
1.2. I β -glucani.....	12
1.3. <i>Whey proteins</i>	14
1.4. Agenti antimicrobici.....	16
1.5. L'ossido di zinco.....	17
1.6. Metodi per la valutazione del potere antimicrobico.....	19
1.7. Microrganismi test.....	20
2. SCOPO DELLA TESI	21
3. MATERIALI E METODI	23
3.1. Valutazione dell'efficacia antimicrobica conferita da sospensioni di ZnO.....	23
3.2. Film a base di β -glucani.....	23
3.2.1. Prove di rilascio.....	24
3.2.1.1. Test di rilascio del colore su agar-acqua.....	24
3.2.1.2. Test di rilascio dello ZnO in liquido.....	25
3.2.2. Prove antimicrobiche.....	26
3.2.2.1. Metodo dell'alone di inibizione.....	26
3.2.2.2. Metodo delle strisce parallele.....	28
3.3. Film a base proteica – proteine del siero di latte.....	30
3.3.1. Preparazione del film a base proteica.....	31
3.3.2. Preparazione del film a base proteica con ZnO.....	32
3.3.3. Prove antimicrobiche.....	33
4. RISULTATI	35
4.1. Valutazione efficacia antimicrobica di ZnO.....	35
4.2. Prove di rilascio.....	36
4.2.1. Test di rilascio di colore su terreno di agar-acqua.....	36
4.2.2. Test di rilascio in terreno liquido.....	41
4.3. Prove antimicrobiche.....	44
4.3.1. Metodo dell'alone di inibizione.....	44
4.3.2. Metodo delle strisce parallele.....	51

4.4.	Film a base proteica- Proteine del siero del latte	60
4.4.1.	Preparazione del film a base proteica	60
4.4.2.	Preparazione del film a base proteica con ZnO	61
4.4.3.	Prove antimicrobiche (Metodo strisce parallele).....	62
5.	CONCLUSIONI.....	67
6.	APPENDICE	69
7.	BIBLIOGRAFIA.....	75
8.	RINGRAZIAMENTI.....	79

*“Baby slow down,
the end is not as fun as the start,
please stay a child somewhere in your heart”
-Original of the species, U2-*

*A mia madre e mio padre
Che non hanno mai smesso di credere in me
anche quando ero io stessa a non crederci più.*

1. Introduzione

1.1. Il *wound dressing*

Il termine *wound dressing*, in italiano può essere tradotto con medicazione; esso è un processo che facilita la riparazione dei tessuti mediante trattamenti che proteggono la ferita, favoriscono la cicatrizzazione e la guarigione delle lesioni. Il *wound dressing* è una parte importante dell'industria tessile.

Può essere effettuato sia tramite l'impiego di farmaci che di materiali con la funzione di copertura e protezione della ferita. Questa viene definita come difetto della pelle che può essere causato da lesioni meccaniche, termiche o chimiche; possono essere ferite comuni oppure ferite croniche di lunga durata.

La funzione primaria delle medicazioni è quello di proteggere la ferita dalle contaminazioni, batteriche e fungine, e da altre lesioni, non deve in alcun modo ritardare il processo di guarigione attraverso meccanismi come l'adesione alla ferita o il rilascio di componenti tossici. Inoltre, soprattutto per medicazioni da cambiare con molta frequenza, essa deve essere di facile rimozione.

In generale, le ragioni per applicare una medicazione sono varie:

- Produrre una rapida guarigione della ferita;
- Contenere gli odori;
- Ridurre il dolore;
- Prevenire e combattere le infezioni;
- Nascondere e coprire la ferita per ragioni estetiche.

E' sicuramente molto importante capire per una specifica medicazione i requisiti necessari alla ferita.

Si possono distinguere due tipologie di medicazioni: quelle tradizionali e quelle avanzate.

Le **medicazioni tradizionali** riguardano il materiale posto a diretto contatto con la ferita, hanno la sola funzione di copertura e protezione. Uno dei maggiori problemi delle medicazioni tradizionali è la difficoltà di rimozione: infatti il cotone e le fibre tessili possono aderire alla ferita causando danni al tessuto interessato . Nell'ambito delle medicazioni tradizionali, la ricerca è indirizzata allo sviluppo di material assorbenti, a bassa aderenza e facili da rimuovere. A tale fine, si utilizzano materiali come film di poliammide o fibre di viscosa rivestite di polipropilene. Recentemente, materiali non tessili laminati con film plastici perforati sono largamente usati per ridurre l'aderenza della medicazione e per ridurre i residui fibrosi.

Le **medicazioni avanzate** o moderne, sviluppatesi dagli anni '60, sono materiali di copertura, con caratteristiche di biocompatibilità. Lo scopo di tale medicazione è creare un ambiente ideale per favorire la cicatrizzazione della ferita, isolandola da eventuali traumi o infezioni esterne.

Di seguito sono riassunti i requisiti generali per le moderne medicazioni (Figura 1.1) :

- Devono rimuovere l'eccesso di liquidi e di componenti tossici;
- Mantenere un'umidità relativa all'interfaccia ferita/medicazione;
- Devono permettere scambi gassosi;
- Essere impermeabili ai microrganismi;
- Fornire isolamento termico;
- Non contenere particolato e componenti tossici;
- Poter essere rimosse senza particolari traumi e senza causare ulteriori lesioni.

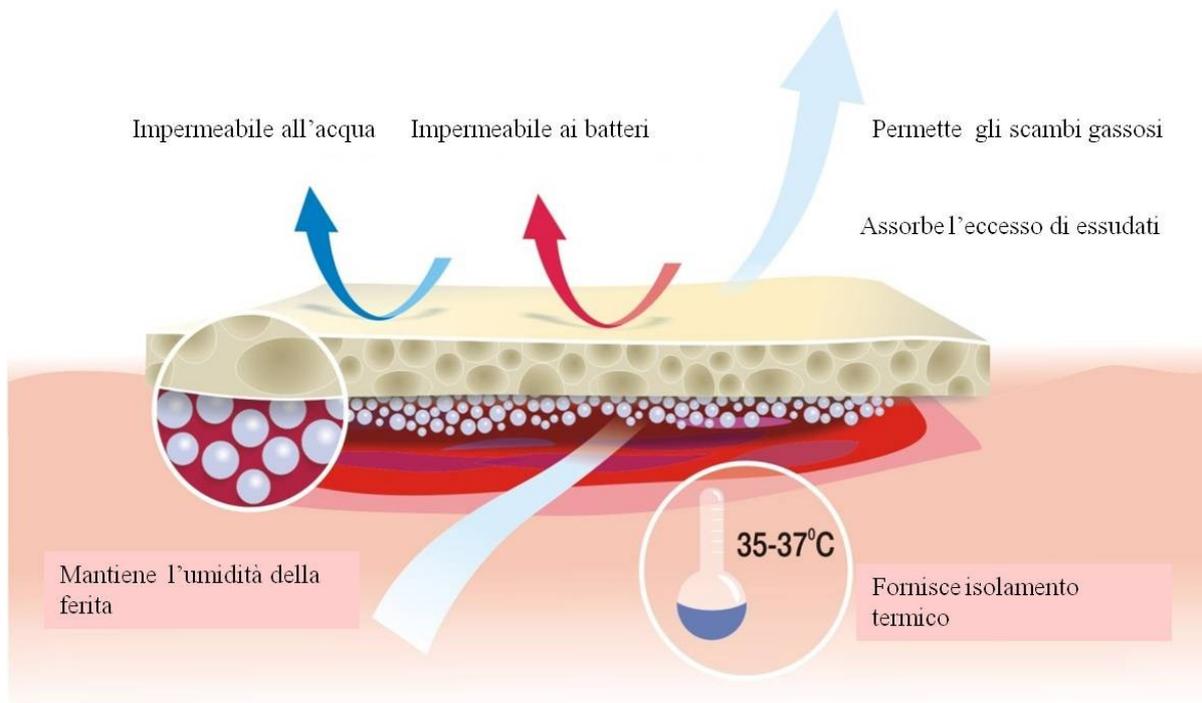


Figura 1.1 - Requisiti generali per le medicazioni avanzate (da <http://newshawktime.com/traditional-adhesive-dressings-market-2017-research-report-analysis-size-share-growth-trends-and-forecast-opportunities-to-2021/>, modificata)

La ricerca ha sviluppato numerosi materiali per le medicazioni avanzate, tra i quali si possono elencare, a titolo di esempio:

- Schiume di poliuretani con alta capacità di assorbimento e molto flessibili;
- Idrocolloidi, il primo tipo di medicazioni moderne, fatti da granuli idrofilici dispersi in una matrice adesiva elastica. Facile da rimuovere, offrono una buona protezione contro la contaminazione batterica della ferita;
- Idrogeli, carriers per antibiotici, molto usati in questa forma sono i polisaccaridi come i β -glucani, chitosano e chitina, acido ialuronico, eparina (Mogoşanu and Grumezescu, 2014);
- Alginati, polisaccaridi naturali estratti da alghe brune, le fibre di alginati sono conosciute per la loro non infiammabilità grazie alla alta concentrazione di ioni metallici nelle fibre;
- Idrofibre, a base di carbossimetilcellulosa, sono di facile rimozione, capaci di assorbire consistenti quantità di essudato promuovendo l'umidità della ferita;
- Medicazioni composite, formate dall'accoppiamento dei materiali precedentemente descritti per migliorare la guarigione della ferita, offrono una combinazione di benefici, un grande numero di medicazioni composite sono disponibili in commercio. (Qin, 2001)

Altro fattore importante da considerare nelle medicazioni è sicuramente la contaminazione microbica. Tra le medicazioni avanzate, un ruolo importante si deve attribuire alle **medicazioni attive**, le quali vengono impregnate con agenti antimicrobici per controllare e/o prevenire le infezioni. (Adamian *et al.*, 2004)

Il controllo delle infezioni è sempre molto importante in quanto l'area attorno alla ferita è molto vulnerabile. Per controllare le infezioni, normalmente vengono utilizzati farmaci antibatterici, ma la loro somministrazione sistematica può portare a seri problemi ai reni e al fegato. Per evitare ciò, si cerca di fornire l'antibatterico solo a livello locale.

Nelle medicazioni attive, si ha l'aggiunta di agenti antibatterici all'interno delle medicazioni stesse garantendone un rilascio nella zona della ferita. Tuttavia, la tossicità di questi agenti antibatterici è ancora argomento di discussione.

Tra gli agenti più usati ci sono:

- Argento e ioni d'argento, riconosciuti come tossici per i microrganismi. Hanno efficacia antibatterica sia contro Gram positivi che contro Gram negativi. Si è sempre creduto che una bassa concentrazione di questi composti causi una tossicità per le cellule eucariotiche trascurabile. Inoltre, il rilascio di questa sostanza dipende anche da come questa è stata incorporata nella medicazione;
- Antibiotici, somministrati oralmente, inibiscono la crescita dei microrganismi, possono essere incorporati nelle medicazioni in vari metodi, con impregnazione o mescolandoli con la matrice polimerica (Zhong, 2015);
- Nanoparticelle, considerate come alternative promettenti agli antibiotici convenzionali, mostrano il loro effetto battericida tramite il contatto diretto con la

parete cellulare batterica. Grazie ad un bilanciamento di cariche positive/negative, le nanoparticelle riescono a distruggere sia la parete che la membrana cellulare provocando la morte della cellula. Numerose le tipologie di nanoparticelle che possono essere incorporate nelle medicazioni come agenti antibatterici: tra le più famose quelle di ossido di zinco, di ossido ferrico, di biossido di titanio, di argento (Simões *et al.*, 2018).

Ultimamente si sta cercando di utilizzare il più possibile materiali di origine naturale con proprietà emollienti, astringenti, antimicrobiche, antiinfiammatorie e antiossidanti, i quali possono migliorare il processo di guarigione (Mogoşanu and Grumezescu, 2014). Alcuni tra questi materiali, sono sicuramente i polisaccaridi e le proteine. Tra i polisaccaridi più promettenti in questo campo troviamo i β -glucani e il chitosano (Kofuji *et al.*, 2010), tra le proteine le *soy proteins* e le *whey proteins*.

1.2.I β -glucani

Alcuni dei componenti più utilizzati come nuovo materiale per il *wound dressing*, sono i polisaccaridi, tra i più studiati troviamo sicuramente i β -glucani.

I β -glucani sono dei polisaccaridi lineari costituiti da molecole di glucosio unite mediante legami glicosidici $\beta(1-3)$ e $\beta(1-4)$. In Figura 1.2. è mostrata la struttura chimica dei β -glucani.

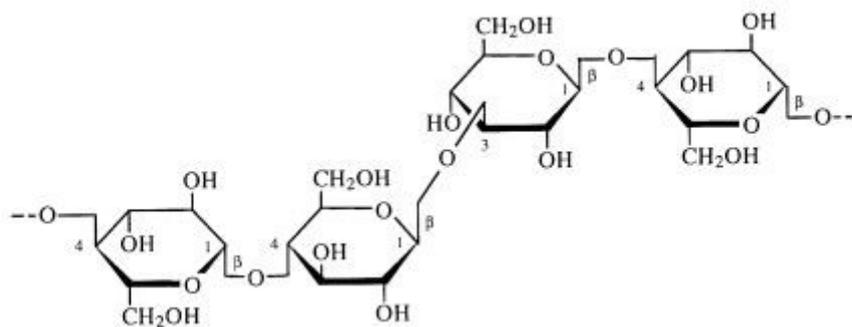


Figura1.2 - Struttura base dei β -glucani (da Rop, Mlcek, and Jurikova, 2009)

I β -glucani hanno attirato l'attenzione negli anni grazie alle loro proprietà fisiche e chimiche: sono caratterizzati da un alto peso molecolare e hanno la caratteristica di formare soluzioni viscosi anche a concentrazioni molto basse (Morgan and Ofman, 1998). Derivano da differenti fonti e, in base a ciò, hanno proprietà biologiche differenti. Ad esempio, i β -glucani

derivanti dei cereali aiutano a ridurre il livello di colesterolo e il livello di glucosio nel sangue, quelli derivanti da funghi hanno effetti antinfiammatori ed infine quelli estratti da microrganismi sembrano avere effetti sulla salute della pelle (Zhu, Du and Xu, 2016).

Nei microrganismi, i β -glucani conferiscono rigidità alle pareti cellulari. Gli studi effettuati su questi polisaccaridi descrivono la forte influenza positiva dei β -glucani sul sistema immunitario, sulle guarigioni delle ferite e su attività antitumorali (Jaehrig *et al.*, 2008). Inoltre, Liu *et al.*, (2008), hanno evidenziato proprietà bioattive dei β -glucani, come l'immunostimolazione, a seguito del loro legame a specifici recettori dei macrofagi.

E' stata anche studiata l'attività antimicrobica di questi polisaccaridi isolati da un cianobatterio, *Chroococcus turgidus*: si è rilevata un'efficacia sia antibatterica che antifungina (Chinnu *et al.*, 2015).

Ad oggi, i meccanismi molecolari alla base di queste proprietà non sono ancora ben chiari, si ipotizza siano dovuti alla loro struttura molecolare (Freimund *et al.*, 2003).

Oltre a ciò, i β -glucani hanno l'abilità di formare dei film che possono essere sfruttati per nuovi materiali, sia per imballaggio eco-sostenibili nell'industria alimentare, sia per applicazioni in campo medico (Razzaq *et al.*, 2016).

Questi polisaccaridi hanno numerose applicazioni potenziali nel campo medico, farmaceutico, cosmetico e della produzione degli alimenti.

Per quanto riguarda il campo medico, i β -glucani sono stati usati in diversi studi clinici per testare i loro effetti sulla salute umana, ad esempio Rondanelli, Opizzi and Monteferrario, (2009) hanno studiato come i β -glucani smussano la risposta glicemica ed insulinica, come essi aumentano la risposta del sistema immunitario umano.

Inoltre, in uno studio effettuato negli ultimi anni (Kofuji *et al.*, 2010), è stato ottenuto un film trasparente, usato come medicazione, formato da un complesso di β -glucani e chitosano. Questo complesso ha evidenziato un'efficacia terapeutica comparabile o addirittura superiore alle medicazioni commerciali sulle ferite provocate sul dorso dei topi. Questo foglio trasparente formato dal complesso β -glucani-chitosano è una grande promessa nel campo delle medicazioni. Si è effettivamente riscontrato che bruciature nei neonati e nei bambini possono essere trattate con i β -glucani con ottimi risultati. Per di più questo film è risultato essere biocompatibile, bioassorbibile, biodegradabile e con efficacia terapeutica.

Nella cosmesi, i β -glucani sono usati come componenti in creme protettive, unguenti e polveri da numerosi anni. Il polisaccaride aumenta la produzione di collagene, riduce le rughe, la cellulite, l'acne e le dermatiti e altre condizioni patologiche della pelle. I film formati da β -glucani hanno una funzione di idratazione e favoriscono la guarigione delle ferite (Zhu, Du and Xu, 2016)

Tuttavia, nonostante provengano da materiali di scarto, i processi di estrazione e di purificazione hanno un costo elevato. Questo è uno dei principali fattori limitanti per le applicazioni industriali di questi polisaccaridi (Razzaq *et al.*, 2016).

1.3. *Whey proteins*

Whey Proteins è la denominazione inglese per indicare le proteine del siero del latte (parte liquida del sottoprodotto della produzione del formaggio). Tali proteine possiedono molti benefici salutistici e numerose applicazioni in campo alimentare.

Le proteine del siero in commercio si suddividono in tre forme principali: concentrate (WPC), contenenti tra il 50-85% di proteine su base secca, isolate (WPI), che contengono tra il 90-98% di proteine e idrolizzate (WPH). Al giorno d'oggi i processi di ultrafiltrazione e di diafiltrazione del siero sono operazioni standard che consentono il recupero di tutte le proteine ed eliminano il lattosio o le proteine minori (Mollea, Marmo and Bosco, 2013). Le proteine del siero di latte sono formate da proteine globulari isolate dal siero di latte. Le principali classi di proteine del siero di latte sono elencate in Tabella 1.1:

Proteine del Siero di latte	Quantità (%)
<i>β-lattoglobuline</i>	50
<i>α-lattoalbumine</i>	20
<i>Siero-albumine</i>	10
<i>Immunoglobuline</i>	10
<i>Frazioni minori</i>	10

Tabella 1.1 - Principali frazioni proteiche delle proteine del siero del latte

Tutte le maggiori proteine che fanno parte delle *whey proteins* sono sintetizzate dalle cellule epiteliali delle ghiandole mammarie. La concentrazione delle *whey proteins* dipende da numerosi fattori quali il tipo di siero, la provenienza del latte (bovina, ovina, umana) e il tipo di alimentazione.

Le frazioni minori delle proteine del siero del latte (10%) è costituito da lattoferrine, lattoperossidasi, lisozima, proteone, peptoso, osteopontina. In ogni caso le prime due sono le più abbondanti tra le frazioni minori (Mollea, Marmo and Bosco, 2013).

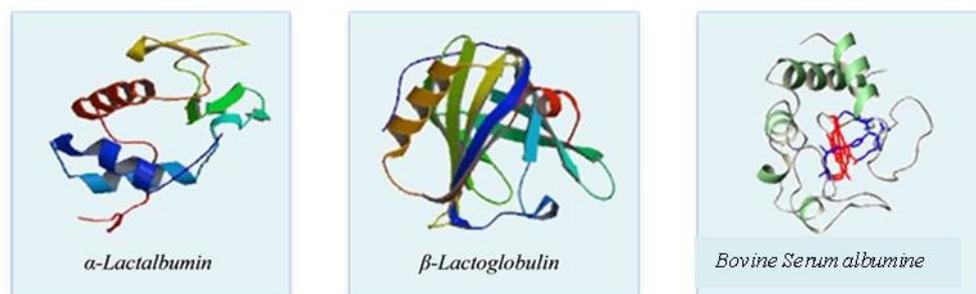


Figura 1.3 - Struttura dei componenti principali delle *Whey Proteins* (da Ortega-Requena and Rebouillat, 2015, modificata)

Una delle principali proprietà delle *whey proteins* è quella di formare biofilms: questa proprietà di formare film viene usata per produrre film trasparenti, incolori e flessibili. Talvolta vengono incorporati dei plasticizzanti come ad esempio glicerolo, polioli, sorbitolo. Questi componenti modificano la struttura chimico-fisica e le proprietà meccaniche dei film, la loro forza di adesione e la loro permeabilità (Bosco *et al.*, 2013).

Le β -lattoglobuline è presente in molte specie di mammiferi, ma non negli umani. La sua funzione endogena non è del tutto chiara, quello che si sa è che è una grande fonte di amminoacidi. Le α -lattoalbumine sono una delle proteine più studiate; è un componente importante del latte, essa partecipa attivamente alla sintesi del lattosio. Nel siero di latte umana è la proteina più abbondante, è caratterizzata da numerosi benefici per la salute. Questa proteina potrebbe avere attività battericida e antitumorali. Le immunoglobuline forniscono l'immunità passiva ai neonati. La siero-albumina bovina ha la funzione di inibizione della crescita tumorale. La lattoferrina e la lattoperossidasi sono proteine presenti in concentrazione minore nel siero del latte. La prima ha un ruolo fondamentale nel metabolismo del ferro, ha un effetto batteriostatico grazie alla sua abilità di legare ferro libero, essenziale per la crescita batterica. La lattoperossidasi è presente in varie secrezioni umane, presenta un'attività antimicrobica correlata al sistema della lattoperossidasi: formato dalla lattoperossidasi, dall'anione tiocianato e dal perossido di idrogeno (Mollea, Marmo and Bosco, 2013).

Un grande numero di studi riportano l'uso di prodotti di *soy proteins* e di *whey proteins*. Soprattutto per quello che riguarda i prodotti formati da *whey proteins*, sono prodotti formati da WPI (whey protein isolate), da WPC (whey protein concentrate) e da suoi componenti (specialmente β -lattoglobuline e siero albumina bovina) per la preparazione di idrogeli a base proteica. Questi idrogeli possono essere formulati sia solo con *whey proteins* che con altri componenti addizionati (ad esempio alginati e chitosani) (Abaee, Mohammadian and Jafari, 2017).

Le *whey proteins* hanno mostrato che possono agire anche come molecole bioattive. E' però essenziale dimostrare che queste proteine non siano tossiche sulle cellule epiteliali se usate come medicazione (Gilbert *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda l'efficacia antimicrobica, un ruolo importante assume la lattoferrina, proteina globulare multifunzionale con attività antimicrobica, battericida, fungicida e antiparassitaria, componente delle frazioni minori delle *whey proteins*. Le lattoferine hanno una vasta gamma di applicazioni sia nei prodotti farmaceutici, sia in campo medico che veterinario.

Come efficacia antimicrobica, la lattoferrina umana evidenzia risposte efficaci contro una grande varietà di batteri, (sia Gram negativi che Gram positivi) incluse le specie di *Streptococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Sthapylococcus*, *Enterobacter*. La lattoferrina è attiva sia *in vivo* che *in vitro* contro vari batteri e lieviti, sebbene mostri pochi effetti sinergici con gli antibiotici (Bruni *et al.*, 2016).

Inoltre, i biofilm formati dalle *whey proteins* possono essere addizionate con ulteriori agenti antimicrobici, sia da fonti vegetali come oli essenziali (Fernández-Pan, Royo and Ignacio Maté, 2012), spezie e erbe aromatiche (Seydim and Sarikus, 2006) o acido sorbico e acido amino benzoico (Cagri, Ustunol and Ryser, 2001).

1.4. Agenti antimicrobici

Come si è visto precedentemente nei paragrafi 1.3 e 1.2 ed 1.1, un ruolo essenziale spetta sicuramente agli agenti antimicrobici: sostanze chimiche, naturali o di sintesi, che uccidono i microrganismi, o ne inibiscono la crescita. La loro attività dipende da molti parametri come la concentrazione nel substrato, la temperatura, il pH, la tipologia del microrganismo; essa è inoltre influenzata dalla presenza di umidità e di ossigeno.

Gli antimicrobici possono essere suddivisi in base alla loro attività e al tipo di microrganismo bersaglio. Per l'utilizzo degli agenti antimicrobici possono essere usate differenti matrici, inclusi lipidi, polisaccaridi, proteine.

Tra le tipologie di antimicrobici più diffusi ci sono sicuramente gli oli essenziali, i polisaccaridi, gli acidi organici e le batteriocine. (Rocha *et al.*, 2013):

- Oli essenziali (ad es. bergamotto, cannella, origano, coriandolo): l'antimicrobicità è dovuta ai terpenoidi e ai composti fenolici in essi presenti. I terpeni rompono e penetrano nella struttura della parete cellulare microbica portando alla denaturazione delle proteine e alla distruzione della membrana cellulare fino alla morte delle cellule stesse;
- Polisaccaridi (ad es. chitosano): grazie ai suoi gruppi NH_2 i quali possono essere protonati a NH_3^+ e formano facilmente interazioni elettrostatiche con i gruppi anionici delle membrane cellulari dei microrganismi, portando alla lisi cellulare, distruggendo la membrana cellulare;
- Acidi organici (ad es. acido formico): l'attività antimicrobica è dovuta alla riduzione del pH e all'interruzione del trasporto del substrato;
- Batteriocine (ad es. nisina): molto usata nelle matrici di Whey protein, esibisce una forte efficacia antimicrobica contro i batteri Gram positivi.

In campo medico, negli ultimi anni è sorta la necessità di avere dei tessuti capaci di resistere ai microrganismi, negli ultimi anni sono stati commercializzati alcuni biopolimeri come il chitosano. Anche per quello che riguarda gli agenti antimicrobici si sta cercando di utilizzare prodotti naturali, soprattutto derivanti da vegetali, noti da moltissimo tempo per avere proprietà coloranti e medicinali. Tra queste può essere citato l'hennè, colorante naturale che contiene un pigmento rosso noto con il nome di acido hennotannico (struttura chimica in Figura 1.4), principale componente delle foglie della pianta di hennè.

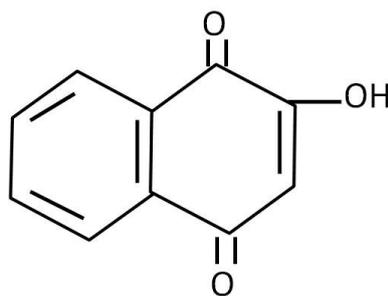


Figura 1.4 - Struttura chimica acido hennotannico

E' stato scoperto che l'estratto acquoso delle foglie di hennè inibisce la crescita sia dei batteri Gram positivi che dei Gram negativi. Inoltre l'estratto delle foglie di hennè inibisce i microrganismi coinvolti nelle ferite da ulcera (Dev *et al.*, 2009).

Nel campo del *wound dressing*, si stanno cercando degli agenti antimicrobici non tossici per l'uomo, rispettosi per la pelle e per l'ambiente e soprattutto più economici rispetto a quelli classici (Simoncic and Tomsic, 2010). Si prende spunto da altre applicazioni, ad esempio, in campo alimentare, per preservare gli alimenti, viene impiegato da alcuni anni il packaging attivo, ovvero si aggiungono degli antibatterici all'interno degli imballaggi e delle confezioni. Questi stessi antibatterici possono essere usati anche nel *wound dressing*: hanno tutti i requisiti necessari per poter essere efficaci anche sulle ferite umane.

Gli agenti antibatterici, usati nell'industria alimentare possono essere classificati in due categorie: organici ed inorganici. Quelli inorganici sono più stabili ad alte temperature e pressioni. Esempi di agenti antimicrobici organici sono gli acidi organici come l'acido sorbico o l'acido formico. Invece dei materiali inorganici antibatterici gli ossidi di metalli, come l'ossido di zinco, sono quelli che hanno ricevuto molte attenzioni negli ultimi anni, soprattutto poiché sono considerati non pericolosi per gli esseri umani e per gli animali. Infatti, studi recenti hanno mostrato che alcune nanoparticelle degli ossidi di metallo, come ZnO, hanno una tossicità selettiva contro batteri, ma mostrano un minimo effetto su cellule umane (Liu *et al.*, 2009).

1.5. L'ossido di zinco

Come già anticipato nel paragrafo 1.4, l'ossido di zinco, composto chimico inorganico con formula chimica ZnO, è uno degli antimicrobici più utilizzati grazie alle sue specifiche proprietà. Le sue proprietà antimicrobiche sono interessanti, per applicazioni in campo alimentare, tessile, cosmetico e farmaceutico.

L'attività antimicrobica dello ZnO dipende da tre fattori (Pasquet *et al.*, 2015):

- i. Grazie alle proprietà di semiconduttore dello ZnO, si genera una sequenza di reazioni fotochimiche che danno origine a specie reattive nell'ossigeno che danneggiano le membrane cellulari dei microrganismi;
- ii. La dissoluzione parziale di ZnO in acqua in ioni Zn^{2+} che presentano un effetto citotossico;
- iii. L'assorbimento di particelle di ZnO sulle cellule microbiche danneggia e rompe le pareti cellulari microbiche.

L'ossido di zinco a temperatura ambiente risulta essere una polvere bianca. Questa polvere di ZnO rilascia ioni Zn^{2+} in soluzioni acquose. Il rilascio maggiore di questi ioni avviene in soluzioni acide (Mohd Omar, Abdul Aziz and Stoll, 2014).

Soprattutto in applicazioni tessili e mediche, l'ossido di zinco è per lo più usato in forma nanoparticellare. Le nanoparticelle hanno differenti proprietà a seconda della loro grandezza (Gutha *et al.*, 2017). Le nanoparticelle di ZnO (50-70 nm di grandezza) sono abbondantemente usate come antibatterico: il meccanismo principale è lo stress ossidativo, cioè l'alterazione dell'equilibrio fisiologico in un organismo. Le nanoparticelle però possono attraversare barriere biologiche come quella emato-encefalica, che ha una funzione di protezione del tessuto cerebrale da elementi tossici. Heinlaan *et al.* (2008) hanno valutato la tossicità delle nano particelle di ZnO sottolineando la formulazione dell'ossido del metallo (nano o in forma micronizzata).

Rajendra *et al.* (2010) hanno studiato l'attività antibatterica dell'ossido di zinco sia in forma nano particellare che in forma micronizzata nei tessuti di cotone con un batterio Gram positivo e uno Gram negativo. In questo studio si può osservare che sia la forma nano che la forma micronizzata hanno una certa efficacia. L'inibizione maggiore è stata osservata nei confronti del batterio Gram positivo.

Lo studio di Pasquet *et al.*, (2014) valuta l'efficacia antimicrobica su semplici sospensioni acquose di ossido di zinco versate nei terreni liquidi a concentrazioni crescenti. Tuttavia, le formulazioni dei terreni liquidi sono molto complesse e possono contenere un gran numero di ingredienti, soprattutto in campo cosmetico. Alcuni di questi ingredienti mostrano interazioni con l'ossido di zinco e possono alterare la sua attività antimicrobica e la sua dissoluzione. Ad esempio le proteine presenti nei terreni in cui viene sciolto l'ossido di zinco aumentano la solubilità poiché i peptidi si legano allo zinco creando un complesso ad alta solubilità, ciò risulta molto importante per un'eventuale interazione con le *whey proteins*.

Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato la non tossicità dello zinco: questo infatti è un elemento essenziale per i microrganismi e per organismi più complessi poiché esso è coinvolto in numerose reazioni cellulari. L'attività antimicrobica degli ioni Zn^{2+} dipende dalla loro concentrazione e dal tempo di contatto con il microrganismo. Nei prodotti dermatologici, gli ioni Zn^{2+} sono interessanti biocidi a condizione che vengano generati in concentrazioni sufficientemente elevate. Kumar *et al.* (2017) hanno studiato il rilascio di ioni Zn^{2+} e la loro efficacia antimicrobica sui batteri Gram negativi e Gram positivi. per quanto riguarda l'effetto sui primi batteri (*E. coli*), si ottiene che la citotossicità degli ioni è comparabile con quella

dello ZnO: la morfologia del batterio subisce una alterazione durante il trattamento. I batteri Gram positivi, con uno strato di peptidoglicano nella parete cellulare, sono meno suscettibili al rilascio di ioni Zn^{2+} : lo strato di peptidoglicano viene caricato negativamente e gli ioni Zn^{2+} rimangono intrappolati in esso.

La dissoluzione delle particelle di ossido di zinco è influenzata da numerosi parametri, che possono essere suddivisi in due classi (Pasquet *et al.*, 2014):

- La chimica dei fattori ambientali come pH, durata dell'esposizione, irradiazione UV, la presenza di altre sostanze o di microrganismi;
- Proprietà fisico-chimiche delle particelle come la dimensione elementare, la porosità, la forma e concentrazione.

1.6. Metodi per la valutazione del potere antimicrobico

In ospedale sono molte le superfici contaminate da microrganismi, i tessuti delle uniformi e della biancheria dei letti, ma soprattutto le medicazioni applicate sulle ferite dei pazienti. Il materiale tessile è infatti in contatto permanente con i microrganismi dell'ambiente e soprattutto quelli della pelle dell'uomo.

Per ovviare a questo problema vengono usati dei tessuti trattati con agenti antimicrobici. È necessario valutare l'efficacia di tali agenti antimicrobici (Teufel *et al.*, 2006). L'efficacia delle sostanze antimicrobiche può essere valutata mediante analisi di tipo qualitativo e quantitativo. Tra le analisi qualitative si possono annoverare i seguenti metodi (Ncube *et al.*, 2008):

Metodi di diffusione, dove la zona di inibizione viene calcolata misurando il diametro dell'alone sottraendo il diametro del campione (Sathianarayanan *et al.*, 2010). Tra questi metodi troviamo: *Agar disk diffusion* e *Agar well diffusion*, *Parallel streak method*. Quest'ultimo è usato nei casi di sostanze antimicrobiche che non diffondono. Nessuno di questi metodi permette di distinguere tra azione batteriostatica e battericida.

Metodi di diluizione, con questi metodi si valuta la resistenza batterica all'agente antimicrobico in concentrazioni crescenti. Di solito vengono usati per calcolare la minima concentrazione di un agente antimicrobico capace di inibire la crescita (MIC dall'inglese *Minimal inhibitory concentration*). Questi metodi permettono di distinguere l'azione batteriostatica da quella battericida. Sono test che si possono usare con una ampia varietà di microrganismi. Tra questi ci sono *Agar dilution method*, *Broth macro/microdilution method*.

Le analisi quantitative invece, quantificano alcuni parametri quali la percentuale di riduzione della carica microbica e la resistenza del trattamento antimicrobico ai lavaggi. Tra questi metodi troviamo (Rajendra *et al.*, 2010):

Percentage reduction test: con questo metodo viene calcolata la percentuale di riduzione della carica batterica in un tempo definito;

Wash durability of the finished fabric: si analizza la durata del trattamento antimicrobico ai lavaggi; il materiale tessile viene lavato in base ad uno standard e si misura la percentuale di riduzione dei batteri per ogni campione (Farjana, Zerín and Kabir, 2014).

1.7. Microrganismi test

L'efficacia antimicrobica di un agente o di un materiale solitamente viene analizzata con i metodi descritti al paragrafo 1.6 "Metodi per la valutazione del potere antimicrobico". I microrganismi generalmente possono essere miscelati con il terreno oppure applicati sulla superficie agarizzata a seconda del metodo utilizzato per valutare l'efficacia antimicrobica (Zaika, 1988).

Molto importante è sapere anche quali sono i microrganismi che si utilizzano per effettuare queste analisi. L'attività antimicrobica dipende dal tipo di microrganismo. Innanzitutto si deve distinguere tra attività antibatterica e antifungina. Quest'ultima è più complicata da testare in quanto i funghi sono microrganismi capaci di differenziarsi (Zaika, 1988). I funghi che vengono comunemente utilizzati per testare l'attività antifungina sono *Asperigillus niger* e *Candida albicans* (Elgayyar *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda il potere antibatterico, esso viene testato analizzando le due tipologie batteriche, Gram negativi e Gram positivi. I ceppi patogeni utilizzati, principali esponenti di queste due classi batteriche sono rispettivamente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Gutha *et al.*, 2017).

2. Scopo della tesi

Lo scopo del lavoro di tesi svolto è stata la valutazione dell'efficacia antimicrobica dell'ossido di zinco in due diverse matrici di origine naturale: una polisaccaridica, a base di β -glucani, e una proteica, a base di *whey proteins*. Questi due materiali possono essere utilizzati per il *wound dressing*, ovvero come medicazioni di ferite cutanee. L'ossido di zinco è stato scelto perché è un agente antimicrobico economico e non tossico per la salute umana.

L'efficacia antimicrobica è stata testata sia nei confronti di un batterio Gram negativo che di uno Gram positivo. A tale scopo sono stati scelti, rispettivamente, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*, entrambi microrganismi non patogeni e presenti sulla cute umana.

Il potere antimicrobico dello ZnO è stato valutato a tre diverse concentrazioni, (0,5% w/w, 1% w/w e 2% w/w), incorporate nelle diverse matrici: si è inoltre analizzata l'efficacia antimicrobica delle due matrici tal quali.

3. Materiali e metodi

3.1. Valutazione dell'efficacia antimicrobica conferita da sospensioni di ZnO

Come primo test, è stata effettuata una valutazione dell'efficacia antimicrobica conferita da sospensioni di ZnO. Tale prova è stata effettuata per determinare direttamente l'efficacia antimicrobica dello ZnO. Come per le altre prove antimicrobiche effettuate, descritte nel dettaglio nel paragrafo 3.2.2 “Prove antimicrobiche”, sono stati testati due microrganismi, *Escherichia coli* (LMG 08063) e *Staphylococcus epidermidis* (LMG 10474), e sono state usate piastre di Nutrient Agar (Oxoid).

La procedura seguita per la preparazione dell'inoculo sarà descritta al paragrafo 3.2.2.1 “Metodo dell'alone di inibizione”.

Una volta dispersa la coltura sulla superficie dell'agar, sono state depositate alcune gocce di sospensione di ossido di zinco ed alcune gocce di acqua (controlli). Più precisamente, sono state depositate due gocce da 10 µl; sono state effettuate tre repliche sulla stessa piastra.

Le capsule sono state incubate per 24 ore a 37°C.

La concentrazione della sospensione di ossido di zinco è stata scelta in base alla quantità percentuale maggiore inserita nei film (2% w/w). La polvere di ossido di zinco è stata sciolta in 50 ml di acqua distillata, dopo ciò è stata effettuata una sonicazione per 10 minuti in un bagno ad ultrasuoni in modo da favorire la dispersione dell ZnO. Dopodiché la sospensione è stata depositata sulle piastre inoculate come prima descritto.

3.2. Film a base di β-glucani

I film a base di β-glucani, testati per le loro proprietà antimicrobiche, sono elencati nella Tabella 3.1. I β-glucani, utilizzati per la preparazione dei film, sono di origine vegetale e sono stati estratti con acqua o in due differenti soluzioni acquose basiche.

<i>Film testati</i>	<i>(%) ZnO</i>			
<i>WATER EXTRACT (WE)</i>	Controllo (C)	0,5%	1%	2%
<i>NEW, estratto a pH alcalino</i>	Controllo (C)	0,5%	1%	2%
<i>SBC, estratto a pH alcalino</i>	Controllo (C)	0,5%	1%	2%

Tabella 3.1 - Film di β-glucani testati, il film denominato “Controllo” non contiene ZnO

3.2.1. Prove di rilascio

3.2.1.1. Test di rilascio del colore su agar-acqua

I film di β -glucani, come mostrato nella Figura 3.1, sono caratterizzati da un colore ambrato. Prima di testare i film, per valutarne le proprietà antimicrobiche, è stata realizzata una prova di rilascio del colore su piastre di agar acqua, in assenza di microrganismi.

Le piastre utilizzate, caratterizzate da elevata trasparenza, erano costituite da agar disciolto in acqua distillata (20 g/L). La sospensione di agar è stata sterilizzata in autoclave e, in seguito, sono state riempite capsule Petri da 5 cm di diametro. Il terreno è stato fatto solidificare in condizioni di sterilità.

Frammenti circolari del diametro di 18 mm sono stati tagliati da ciascun film. Sono stati preparati dei campioni circolari per evitare gli effetti di bordo dovuti alla presenza di spigoli.

I campioni di film sono stati posti al centro, uno per ciascuna Petri (Figura 3.1). Per migliorare l'adesione, prima di procedere con la deposizione del film, sulla superficie dell'agar sono stati dispersi 100 μ l di acqua distillata sterile. Per ciascun campione sono state fatte tre ripetizioni.

I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 24 ore. Dopo 24 ore, si misura in mm l'alone di colore rilasciato sulla superficie di agar-acqua.

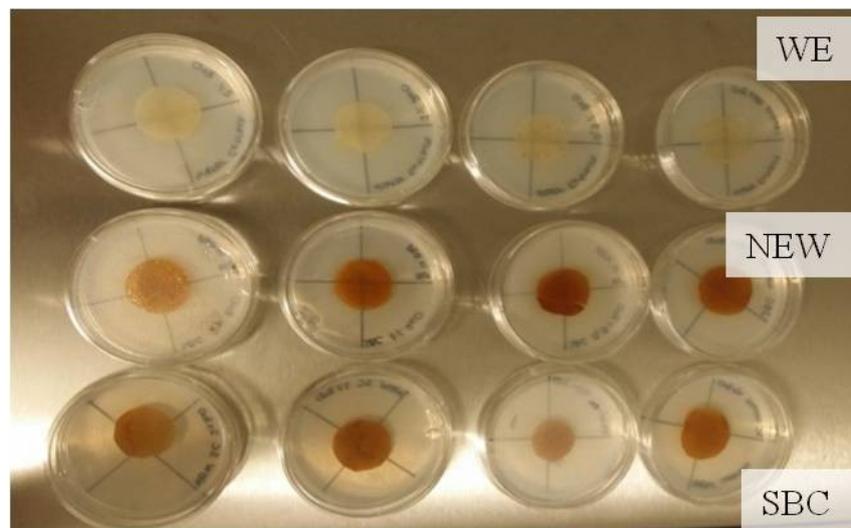


Figura 3.1 - Campioni di film WE, SBC e NEW appena posizionati sulla capsula all'inizio dell'incubazione

3.2.1.2. Test di rilascio dello ZnO in liquido

Tale prova è stata svolta per valutare l'eventuale rilascio di ZnO in ambiente acquoso. Il test è stato svolto per i film della tipologia NEW. I film testati sono stati:

- a. NEW C (0% ZnO)
- b. NEW 0,5% ZnO
- c. NEW 1% ZnO
- d. NEW 2% ZnO

Una quantità nota di ciascun film (0,05 g) è stata immersa in un volume di acqua distillata sterile pari a 30 ml all'interno di beute da 50 ml (Figura 3.2). Queste sono state mantenute alla temperatura di 37°C ed in agitazione a 125 rpm per 1, 6, 24 e 30 ore.

Periodicamente sono stati effettuati dei prelievi (al tempo zero, dopo 1, 6, 24 e 30 ore dall'incubazione) ed il liquido prelevato è stato analizzato spettrofotometricamente analizzando tre lunghezze d'onda: 226, 258 e 380 nm. Nelle misurazioni è stato tenuto conto del fattore di concentrazione.

E' stata inoltre effettuata la misura di pH al tempo zero, dopo 1 ora e dopo 30 ore dall'immersione del film.

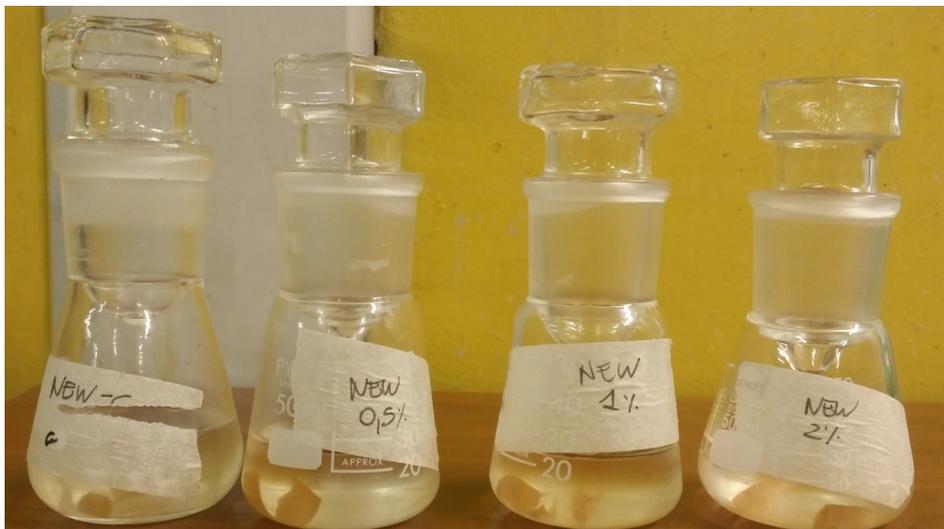


Figura 3.2. - Campioni dei film NEW immersi in acqua

3.2.2. Prove antimicrobiche

Per valutare l'efficacia antimicrobica dei film a base di β -glucani, sono state effettuate prove antimicrobiche con due differenti metodi: il metodo dell'alone di inibizione e il metodo delle strisce parallele. In entrambe i casi sono stati testati due microrganismi, *Escherichia coli* (LMG 08063) e *Staphylococcus epidermidis* (LMG 10474), rappresentanti rispettivamente le categorie batteriche dei Gram negativi e dei Gram positivi, entrambi i microrganismi sono anaerobi facoltativi. Essi hanno un pH ottimale di crescita neutro.

3.2.2.1. Metodo dell'alone di inibizione

Utilizzando questo metodo, si è valutata l'inibizione della crescita del microrganismo inoculato, al di sotto e attorno ai campioni depositati sul terreno agarizzato. Si sono testati tutti i film di β -glucani descritti in Tabella 3.1.

Precoltura e standardizzazione dell'inoculo

Per ciascuno dei due microrganismi testati, la precoltura è stata preparata inoculando due piastre di Nutrient Agar (Oxoid) con 500 μ l di una sospensione ottenuta disperdendo con 15 ml di soluzione fisiologica sterile le colonie di una coltura precedentemente cresciuta su Nutrient Agar. Le piastre inoculate sono state incubate per circa 18 ore alla temperatura ottimale di crescita di ciascuno dei due ceppi dei batteri, 20° C per *E. coli* e 37° C per *S. epidermidis*.

Passato il tempo necessario alla crescita, le colonie batteriche cresciute in una capsula di Nutrient Agar sono state risospese in 15 ml di soluzione fisiologica sterile. L'inoculo è stato quindi standardizzato. È stata determinata spettrofotometricamente, alla lunghezza d'onda di 620 nm, l'assorbanza della sospensione e, successivamente, essa è stata diluita per avere un valore di assorbanza compreso tra 0,8 e 1 in modo tale da ricadere nella linearità della legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \times l \times C \quad (1)$$

A= assorbanza [-]

ε = coefficiente di assorbimento molare, dipende dal tipo di solvente utilizzato e dalla lunghezza d'onda [$M^{-1} \times cm^{-1}$]

l= cammino ottico, ovvero lo spessore della soluzione contenuto nella cuvetta [cm=1]

C= concentrazione del campione [mol/l].

Dopo aver standardizzato l'inoculo, in condizioni di sterilità, sono stati dispersi 500 μ l di sospensione per ciascuna Petri e con un'ansa da 4 mm è stato realizzato l'inoculo. Per effettuare il test è stato utilizzato un terreno commerciale Mueller-Hinton.

Allestimento del test

I campioni di β -glucani da testare sono stati tagliati in cerchi di 18 mm di diametro e sono stati posizionati sul terreno agarizzato di Mueller-Hinton inoculato precedentemente (Precoltura e standardizzazione dell'inoculo, paragrafo 3.2.2.1 "Metodo dell'alone di inibizione). Per ciascuna tipologia di film si sono stati depositati tre campioni per ogni Petri.

Le capsule sono state incubate per 24 ore alla temperatura ottimale di crescita dei microrganismi inoculati, 20° C per *E. coli* e 37° C per *S. epidermidis*.

Al termine dell'incubazione è stata calcolata, se presente, la zona di inibizione calcolando il diametro dell'alone e sottraendo il diametro del campione.

In Figura 3.3 si mostra lo schema dell'allestimento del test tramite il metodo dell'alone di inibizione.

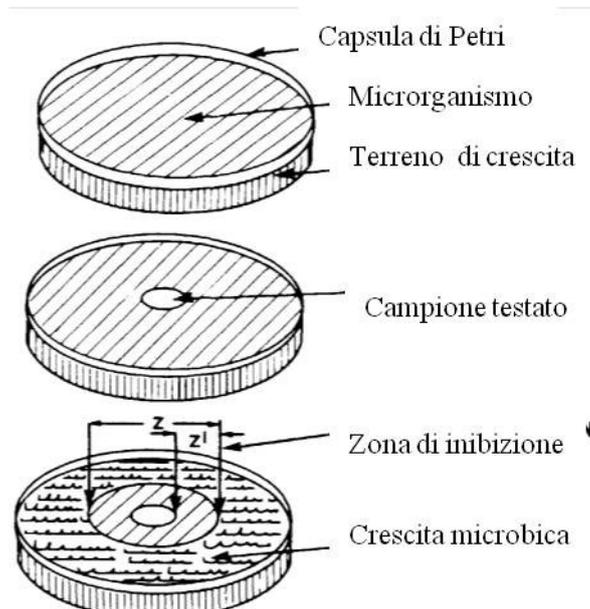


Figura 3.3 – Schema del metodo dell'alone di inibizione (da ZAIKA, 1988 modificata)

3.2.2.2. Metodo delle strisce parallele

Questo metodo viene utilizzato per valutare l'efficacia antimicrobica sui materiali tessili quando l'agente antimicrobico non diffonde. Il metodo è standardizzato come AATCC-147.

Anche tale metodo è stato utilizzato per testare l'efficacia antimicrobica di tutti i film di β -glucani elencati nella Tabella 3.1. Come per il Metodo dell'alone di inibizione, l'efficacia antimicrobica dei campioni è stata testata sia nei confronti di *Escherichia coli* (LMG 08063) che di *Staphylococcus epidermidis* (LMG 10474).

Precoltura e standardizzazione dell'inoculo

Per ciascuno dei due microrganismi testati (*E. coli* e *S. epidermidis*) la precoltura è stata allestita in terreno liquido, Nutrient Broth (Oxoid), contenuto in una provetta, inoculato con un pellet di biomassa congelato.

L'inoculo è stato effettuato partendo da un coltura standardizzata in terreno liquido. Il contenuto di un conetti di (1ml) congelati con 400 μ l di terreno liquido e 400 μ l di glicerolo al 50%, è stato prelevato ed è stato disperso di Nutrient Broth sterile. La provetta è stata incubata a 37° C e posta in agitazione a 150 rpm nel termostato per 24 ore.

Passato il tempo necessario alla crescita, l'inoculo è stato standardizzato come descritto nel paragrafo 3.2.2.1 "Metodo dell'alone di inibizione".

Allestimento del test

I film testati sono stati tagliati in forma rettangolare con dimensioni di 2,5×5 cm.

Su ogni piastra di Nutrient Agar (Oxoid) prelevando la sospensione di inoculo standardizzato una sola volta utilizzando un'ansa da 4 mm, si sono effettuate cinque strisce di circa 6 cm di lunghezza, distanziate l'una dall'altra di circa 1 cm. Le strisce sono state realizzate partendo sinistra verso destra e procedendo dall'alto verso il basso in modo da avere righe a diversa concentrazione di inoculo: sarà maggiore la concentrazione della parte sinistra della banda più alta.

Il campione rettangolare è stato posto al di sopra delle strisce di inoculo (Figura 3.4): per una migliore adesione del film sulla superficie agarizzata, sopra il campione è stato appoggiato un piccolo peso in plexiglas di opportune dimensioni per coprire interamente il film.

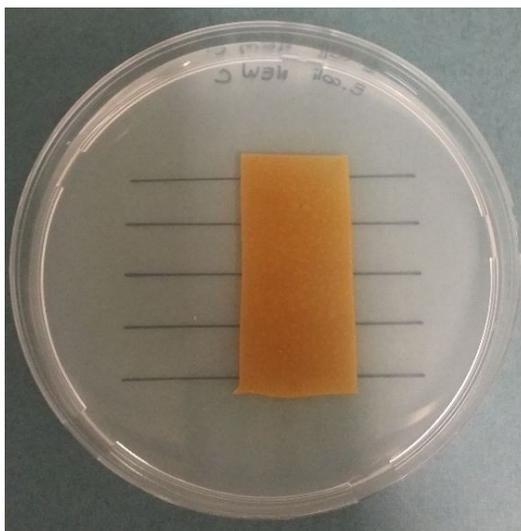


Figura 3.4 – Esempio dell’allestimento del test: per eseguire l’inoculo sono state seguite le righe nere precedentemente disegnate sul retro della Petri

Successivamente le capsule sono state incubate a 37° C (per entrambi i microrganismi) per 24 ore.

Una volta terminato il periodo di incubazione è stata misurata la zona inibita.

La larghezza della zona è stata calcolato di inibizione con la seguente formula:

$$W = \frac{(T-D)}{2} \quad (2)$$

dove: W = larghezza della zona di inibizione

 T = larghezza del film e della zona di inibizione

 D = larghezza del film

La zona di “chiaro”, dall’inglese *clear zone*, ovvero la zona dove non è presente crescita batterica, viene calcolato dalla prima colonia batterica visibile (Figura 3.5).

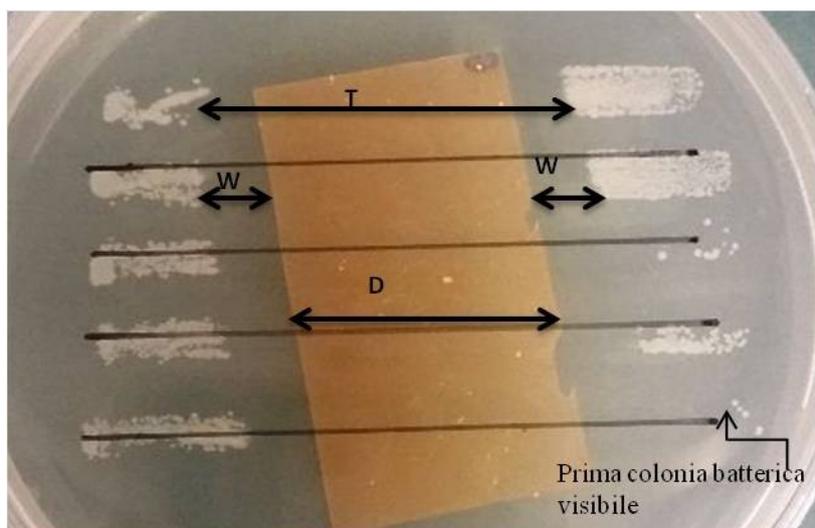


Figura 3.5 - Parametri utilizzati nel calcolo della zona inibita

3.3. Film a base proteica – proteine del siero di latte

In laboratorio sono stati preparati dei film a base proteica, con proteine del siero del latte (*whey proteins*). Questi film sono stati testati tal quali e addizionando come agente antimicrobico l'ossido di zinco (1% w/w e 2% w/w). E' stato aggiunto ossido di zinco per poter effettuare un confronto con i film di β -glucani testati.

La procedura per la preparazione di film proteici, messa precedentemente a punto nel laboratorio biotecnologico del DISAT, prevede l'utilizzo del concentrato proteico MILEI 80 caratterizzato dalla composizione descritta in tabella 3.2:

	Quantità [g/100g]
<i>Proteine</i>	80%
<i>Lattosio</i>	8%
<i>Lipidi</i>	8%
<i>Acqua</i>	5%
<i>Minerali</i>	3,50%

Tabella 3.2 - Composizione concentrato proteico MILEI 80 usato per produzione film proteico

3.3.1. Preparazione del film a base proteica

Per la preparazione del film si è utilizzata la procedura messa a punto da Tricoli F. nella stesura della tesi di laurea specialistica “Valutazione dell’impiego di proteine del siero di latte” (2012), modificandola per adattarla agli scopi di questo lavoro:

1. Si è realizzata una sospensione di Whey Protein Concentrate (WPC) con una concentrazione proteica pari a 104 g/l;
2. Un volume di sospensione, tale da rispettare un rapporto volume/superficie pari a 0,135 cm, è stato posto in una beuta;
3. Il pH della soluzione è stato portato ad un valore di 7 mediante aggiunta di una soluzione di NaOH 1,5 M;
4. La sospensione, mantenuta in agitazione, è stata riscaldata in un bagno termostatico alla temperatura di 90,5° C per circa 20 minuti: in questo modo è stata effettuata la denaturazione delle proteine;
5. Una volta raffreddata la soluzione, si è addizionato il glicerolo che ha la funzione di plastificante. E’ stato aggiunto il 60% del peso secco totale del concentrato proteico;
6. La soluzione è stata trasferita in una beuta opportuna per attuare il degasaggio sotto-vuoto;
7. Si è trasferito il contenuto della beuta in un contenitore di silicone. Tale materiale facilita il distacco del film;
8. Infine il campione è stato asciugato in stufa alla temperatura di 60° C per un tempo sufficiente per il distacco del film.

Preparazione del film proteico con soluzione ultrafiltrata

Al fine di diminuire la concentrazione di lattosio nel concentrato proteico utilizzato per la preparazione del film, dopo aver preparato la sospensione, come indicato nella procedura descritta nel paragrafo 3.3.1 “Preparazione del film a base proteica”, questa è stata ultrafiltrata. Il processo di ultrafiltrazione è un processo a membrana, che utilizzando una membrana selettiva, tramite una forza spingente, limita in modo selettivo la velocità di trasferimento delle specie che la attraversano. Esistono diverse tipologie di processi a membrana e sono classificati in base al tipo di separazione e alla forza spingente. Nel caso in esame è stato impiegato il processo di ultrafiltrazione a flusso frontale e la forza spingente è la pressione.

In Figura 3.6 si mostra la cella nella quale viene svolto il processo di ultrafiltrazione. La membrana utilizzata è un disco di taglio nominale di 10000 dalton con diametro efficace di 44,5 mm, la cella ha una capacità di 50 ml e può sopportare una pressione massima di 5-5,5 atm.



Figura 3.6 - Cella usata per ultrafiltrare la soluzione proteica

La pressione utilizzata per ultrafiltrare è di circa 2 atm. La sospensione di acqua e preparato è stata lavata più volte con acqua, finché le proteine nel permeato fossero in quantità trascurabili.

Per valutare la quantità di proteine nel permeato e nel retentato è stata eseguita una misura spettrofotometrica, analizzando il valore di assorbanza a 280 nm, picco al quale assorbono le proteine.

3.3.2. Preparazione del film a base proteica con ZnO

Si è inoltre, messa a punto la procedura per aggiungere l'ossido di zinco, con funzione antimicrobica, nei film proteici.

E' stato addizionato l'ossido di zinco in modo da poter avere un confronto con i film polisaccaridici testati: è stato aggiunto l'ossido di zinco nelle quantità in percentuali di 1% e del 2% w/w calcolato sul peso secco totale del concentrato proteico.

In Figura 3.7 è mostrata la sospensione di ossido di zinco aggiunta nella soluzione proteica.



Figura 3.7 - Sospensione di ZnO aggiunta nella soluzione proteica

La procedura riportata nel paragrafo 3.3.1 “Procedura per la preparazione del film a base proteica” ha subito un’unica modificazione: l’ossido di zinco è stato aggiunto in sospensione dopo essere stato sonicato in un bagnetto ad ultrasuoni con frequenza 35 kHz (Figura 3.8) per 10 min in modo da favorire la risospensione della polvere.



Figura 3.8 - Bagnetto ad ultrasuoni

3.3.3. Prove antimicrobiche

E’ stata valutato il potere antimicrobico anche sui film di *whey proteins*. Si sono testati i film tal quali e i film con le concentrazioni di ZnO pari ad 1% e 2% w/w. Per valutare l’efficacia antimicrobica è stato utilizzato il Metodo delle strisce parallele descritto nel paragrafo 3.2.2.2.

Anche in questo caso il potere antimicrobico è stato valutato sia nei confronti di *Escherichia coli* (LMG 08063) che di *Staphylococcus epidermidis* (LMG 10474).

4. Risultati

4.1. Valutazione efficacia antimicrobica di ZnO

La prova è stata realizzata per valutare l'effettiva efficacia antimicrobica dell'ossido di zinco.

Le piastre sono state visionate dopo le 24 ore di incubazione. Si possono osservare le stesse considerazioni per entrambi i microrganismi (*E. coli* in Figura 4.1 e *S. epidermidis* in Figura 4.2):

- Controllo (realizzato con gocce d'acqua): la crescita del microrganismo è stata osservata ovunque, anche dove le gocce sono state depositate è stata rilevata la crescita batterica.
- 2% ZnO: dove è stata depositata la sospensione di ossido di zinco non si è rilevata crescita. Non si sono osservati aloni e l'ossido di zinco non ha diffuso. L'inibizione è stata locale.



Figura 4.1 - Piastre con gocce di acqua(sinistra) e con gocce di sospensione al 2% di ossido di zinco (destra) dopo 24 ore di incubazione con *E. coli*

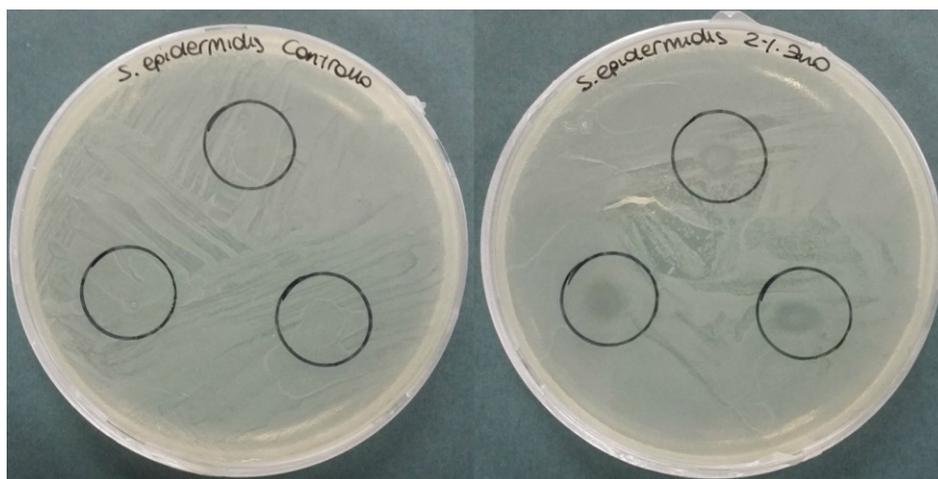


Figura 4.2 - Piastre con gocce di acqua(sinistra) e con gocce di sospensione al 2% di ossido di zinco (destra) dopo 24 ore di incubazione con *S. epidermidis*

L'ossido di zinco, quindi, inibisce la crescita con entrambe le tipologie di batteri, sia Gram negativi che Gram positivi.

4.2. Prove di rilascio

4.2.1. Test di rilascio di colore su terreno di agar-acqua

La prova è stata realizzata per valutare un eventuale rilascio di colore da parte dei film testati: il test è stato effettuato in assenza di microrganismi e su un terreno (agar-acqua) trasparente ed incolore.

Sono stati testati i campioni elencati nella Tabella 4.1.

<i>Film testati</i>	<i>(%) ZnO</i>			
	Controllo (C)	0,5%	1%	2%
<i>Water Extract (WE)</i>	Controllo (C)	0,5%	1%	2%
<i>NEW, estratto a pH alcalino</i>	Controllo (C)	0,5%	1%	2%
<i>SBC, estratto a pH alcalino</i>	Controllo (C)	0,5%	1%	2%

Tabella 4.1 – Film di β -glucani testati, il film denominato “Controllo” non contiene ZnO

I campioni di forma circolare (diametro di 18 mm), come spiegato nel capitolo 3 “Materiali e metodi” nel paragrafo 3.2.1.1, sono stati posizionati sul terreno agarizzato: un film al centro di ciascuna capsula. Per ciascun campione sono state eseguite tre repliche.

Al momento del posizionamento dei campioni, è stato rilevato che questi avevano difficoltà a rimanere adesi alla superficie del terreno agarizzato; dopo alcuni minuti di contatto, però, l’umidità del terreno ha consentito una completa adesione.

Allestendo la prova (tempo zero), è stato osservato che, i film NEW ed SBC, entrambi estratti a pH alcalino, hanno mostrato un rilascio di colore quasi immediato al di sotto del campione. Infatti, appena adagiato il film, la superficie dell’agar è diventata gialla. Per quanto riguarda i campioni WE, non è stata fatta nessuna particolare osservazione; questi film apparivano bianchi ed opachi.

Dopo 24 ore, per i film NEW ed SBC si è notato un rilascio di colore maggiore rispetto a quello osservato al tempo zero: sull’agar è visibile un alone di colore giallo attorno ai dischi dei campioni NEW (Figura 4.3) e SBC (Figura 4.4). I campioni WE (Figura 4.5) hanno invece perso la loro opacità e sono diventati trasparenti; seppur con difficoltà, anche in questo caso, è stato rilevato un rilascio di colore attorno al film, visibile sulla superficie dell’agar-acqua come un alone opaco attorno ai dischi.

Il rilascio è stato osservato per tutte le tipologie di film, NEW, SBC e WE, sia in assenza che in presenza di ZnO a diverse concentrazioni.

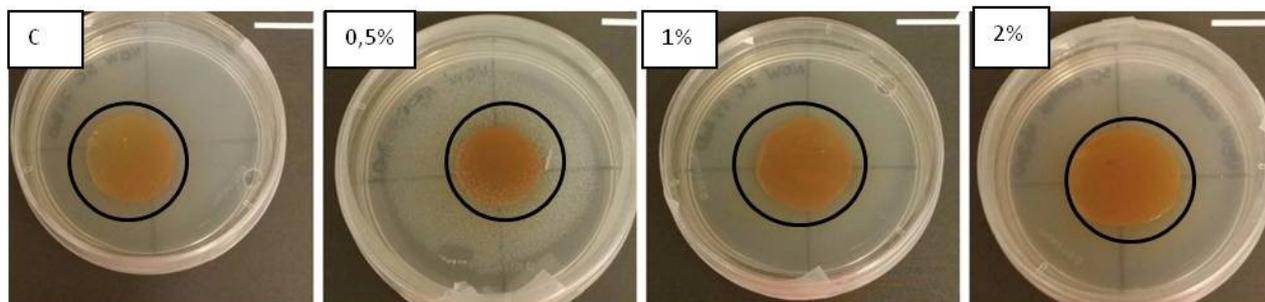


Figura 4.3 - Campioni NEW dopo 24 ore di incubazione.

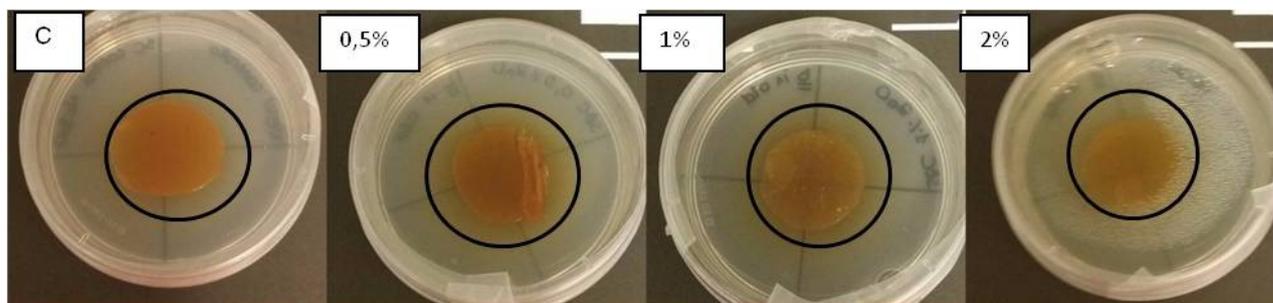


Figura 4.4 - Campioni SBC dopo 24 ore di incubazione

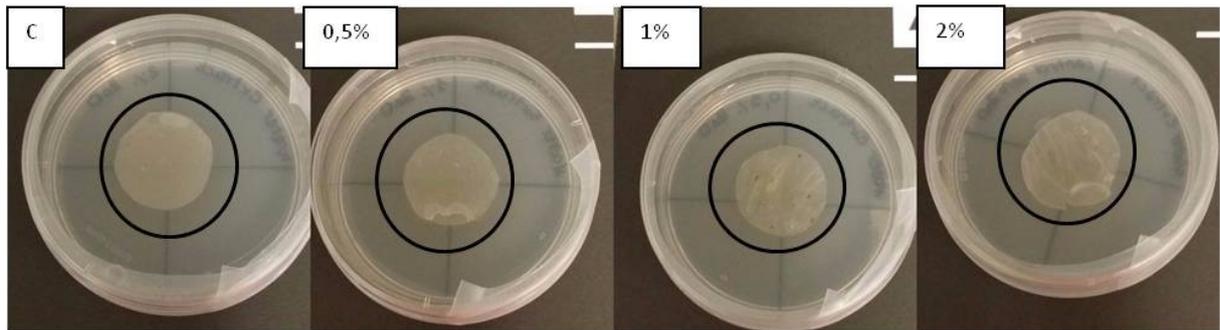


Figura 4.5 - Campioni WE dopo 24 ore di incubazione

Dopo 24 ore di incubazione si è rilevato che alcune parti dei film che non erano riuscite ad aderire perfettamente alla superficie dell'agar-acqua e che erano rimaste sollevate, SBC 0,5% ZnO (Figura 4.6) e WE 0,5% ZnO (Figura 4.7), si sono spezzate. Questo, probabilmente, è accaduto in quanto il film, non riuscendo a rimanere adesivo alla piastra, si è seccato a contatto con l'aria. Tutti gli altri campioni hanno resistito per tutta la durata della prova, 24 ore, non si sono deformati e non si sono sciolti. Al termine dell'incubazione è stato infatti possibile misurare nuovamente il diametro dei film.

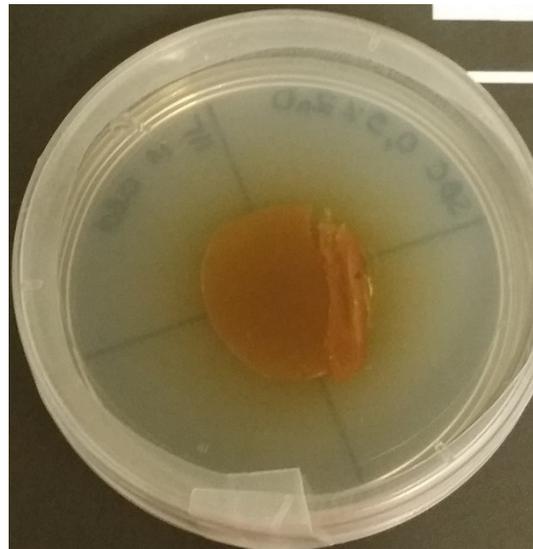


Figura 4.6 - Particolare campione SBC 0,5% ZnO

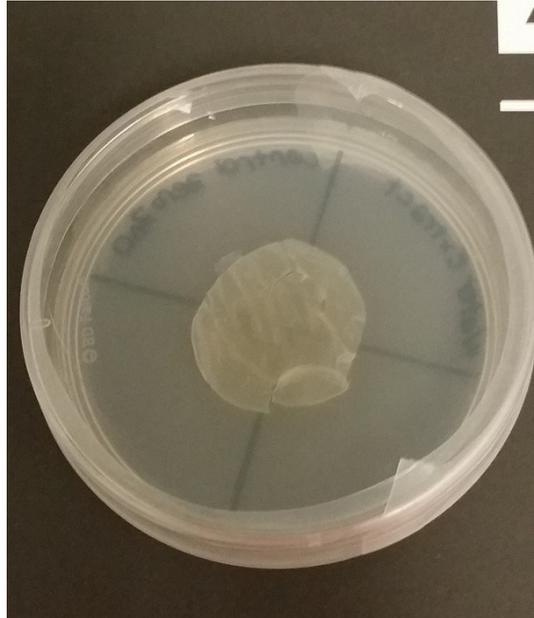


Figura 4.7 - Particolare campione WE 0,5%ZnO

Il diametro dell'alone di rilascio è stato misurato per tutte le tipologie di film, dopo 24 ore di incubazione. Le Figure 4.8, 4.9 e 4.10 mostrano i valori medi del totale tra alone di rilascio e diametro del film misurati per ciascun campione, essi sono la media di tre repliche. In ciascun grafico è riportato, come riferimento, il diametro dei film al momento iniziale, ($\text{Ø}18$ mm, barra blu) in modo da calcolare agevolmente l'alone di rilascio sottraendolo alle barre a diversa gradazione di rosso.

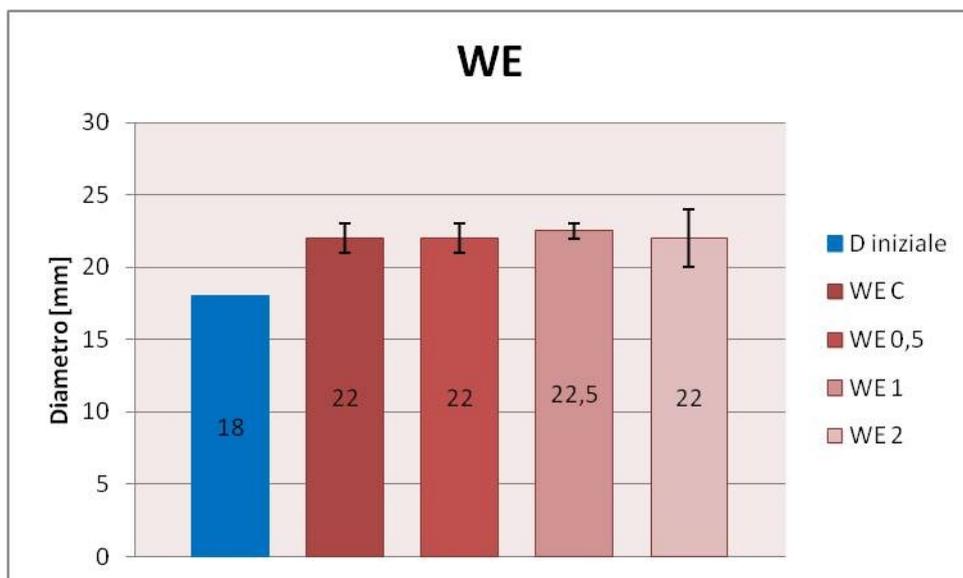


Figura 4.8 - Diametro dell'alone di rilascio per i campioni WE

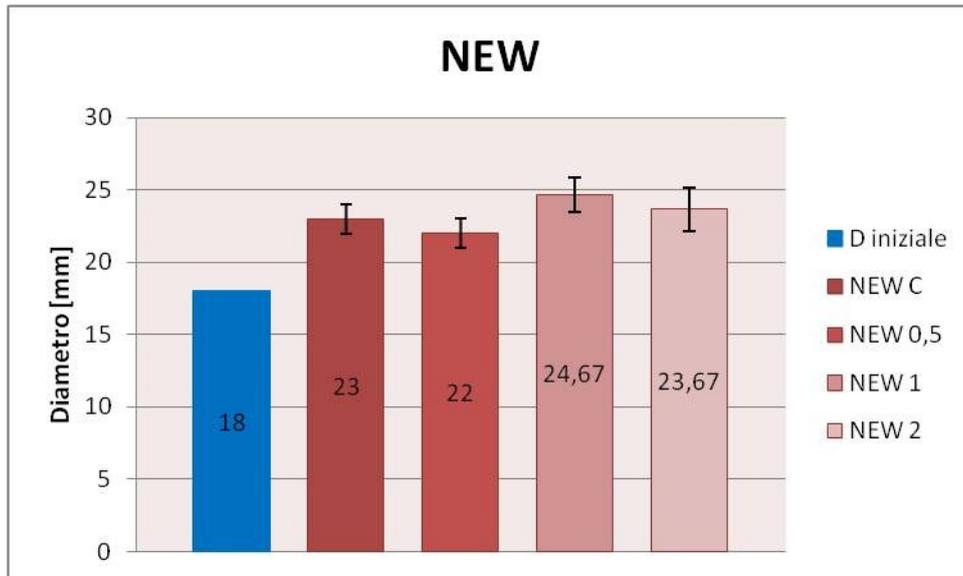


Figura 4.9 - Diametro dell'alone di rilascio per i campioni NEW

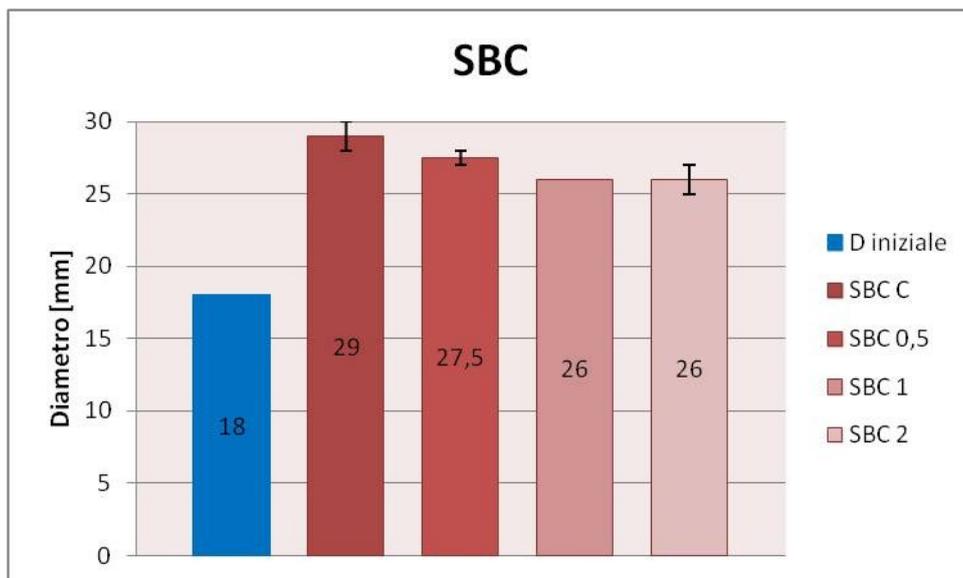


Figura 4.10 - Diametro dell'alone di rilascio per i campioni SBC

In generale, si osserva che il rilascio di colore non è proporzionale alla concentrazione di ossido di zinco presente nei campioni, in quanto l'alone di colore si rileva in tutti i film, compresi i controlli. Dalla Figura 4.8, che mostra il diametro dell'alone di rilascio di colore per i film WE, si osserva un rilascio medio uguale per tutti i campioni (22 mm). Dalla Figura 4.9, riguardante la tipologia di film NEW, si osserva che il rilascio di colore medio è maggiore (23,5 mm > 22 mm) rispetto ai WE. La figura 4.10 indica che per i campioni SBC il rilascio di colore è molto evidente: l'alone decresce con l'aumento della concentrazione di ossido di zinco ed è maggiore nel controllo (29 mm).

4.2.2. Test di rilascio in terreno liquido

Questo test è stato eseguito soltanto su una tipologia di film non essendo stato riscontrato il rilascio di ZnO in acqua durante la prova.

Questa prova preliminare è stata effettuata per valutare l'eventuale rilascio di ZnO dai film in acqua. Il test è stato eseguito per la tipologia di film NEW, a diversi tempi di incubazione: tempo zero, 1, 6, 24 e 30 ore. Le soluzioni così ottenute sono state analizzate allo spettrofotometro UV-Vis a 226 (OD₂₂₆), 258 (OD₂₅₈) e 380 nm (OD₃₈₀). Quest'ultima lunghezza d'onda è stata selezionata come valore intermedio tra 360 e 400 nm, lunghezze d'onda alle quali lo ZnO assorbe. Invece, le lunghezze d'onda di 226 e 258 nm sono state scelte, poiché a questi valori è stato rilevato un picco per tutti i campioni.

In Figura 4.11 sono raffigurati quattro grafici dove sono mostrati i valori di assorbanza ottenuti alle lunghezze d'onda indicate ottenuti ai diversi tempi di incubazione.

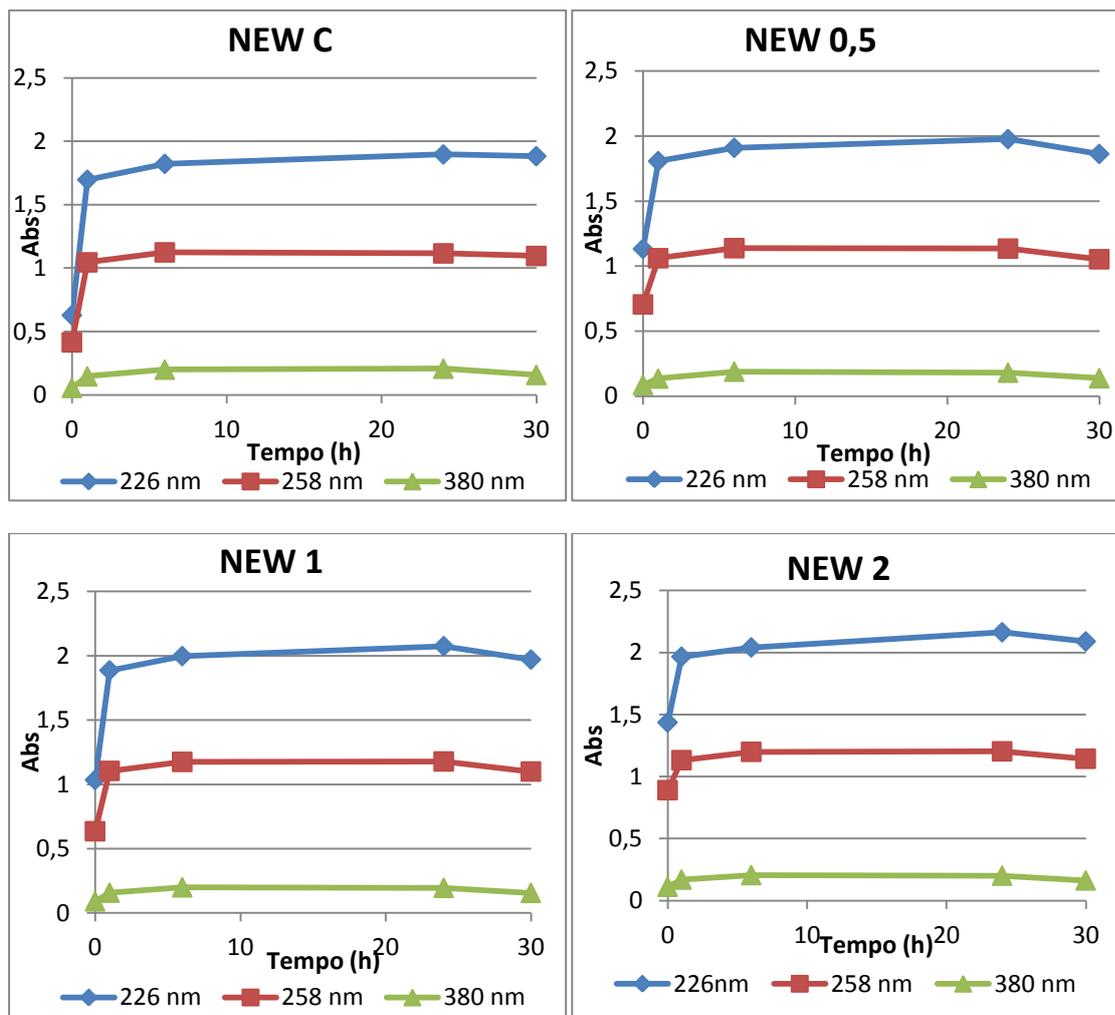


Figura 4.11 – Si mostrano OD₂₂₆, OD₂₅₈ e OD₃₈₀ a diversi tempi di incubazione per le soluzioni in cui sono stati immersi i campioni: dall'alto NEW C, NEW 0,5, in basso NEW 1 e NEW 2

In generale, è possibile osservare che tutti i campioni presentano andamenti molto simili. Tutte le curve hanno andamento crescente nella prima ora di incubazione, ciò indica che il rilascio è pressoché immediato, successivamente le curve tendono a raggiungere un asintoto. Inoltre, dall'andamento della curva verde relativa a OD₃₈₀, è possibile ipotizzare che l'ossido di zinco non venga rilasciato o comunque liberato in minime quantità, in quanto, i valori di assorbanza a questa lunghezza d'onda sono relativamente bassi rispetto a quelli che si osservano a OD₂₂₆ e OD₂₅₈ (rispettivamente curva blu e rossa). Il grafico in Figura 4.12 mostra il confronto delle assorbanze (OD₃₈₀) tra i film NEW a diverse concentrazioni di ZnO: seppur non in maniera rilevante, il valore di assorbanza a 380 nm cresce con l'aumentare della concentrazione di ZnO nel campione (Tabella 4.2).

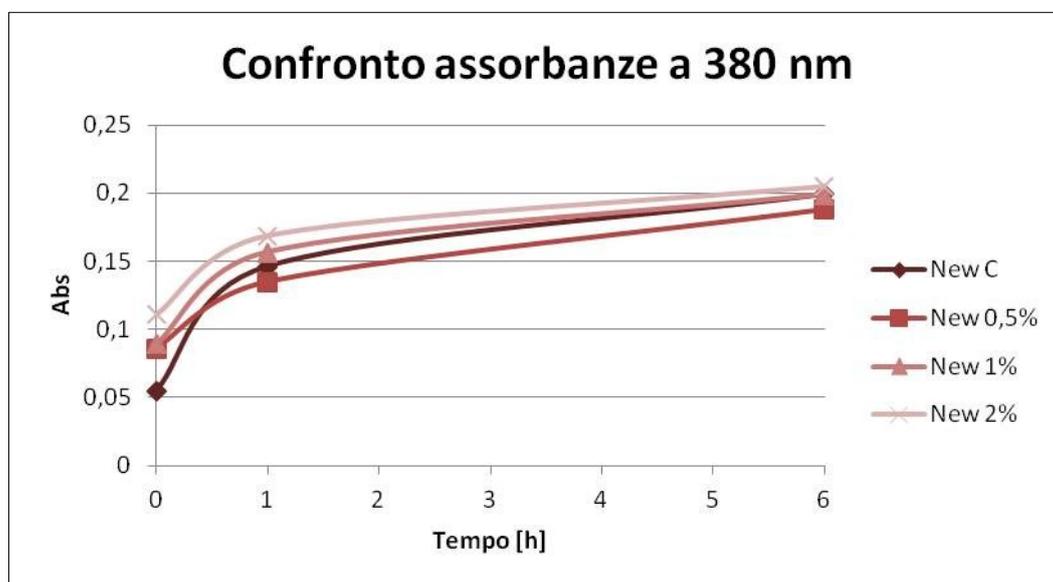


Figura 4.12- Confronto dell'assorbanza a 380 nm nei film NEW C, NEW 0,5, NEW 1 e NEW2

Assorbanza a 380 nm			
	0[h]	1 [h]	6 [h]
<i>New C</i>	0,0553	0,14663173	0,1995868
<i>New 0,5% ZnO</i>	0,086333	0,13529853	0,18854733
<i>New 1% ZnO</i>	0,089664	0,15703403	0,1991304
<i>New 2% ZnO</i>	0,111043	0,1689714	0,20512053

Tabella 4.2 - Valori di OD₃₈₀ al tempo zero, dopo 1 ora e dopo 6 ore per tutte le tipologie di campioni NEW

Come già evidenziato in precedenza, si osserva che dopo sei ore i valori non risultano essere molto differenti tra loro. E' utile, invece, prendere in considerazione i valori dopo 1 ora: si riporta la Tabella 4.3 in cui è stata fatta una differenza tra i valori di OD₃₈₀ ad 1 ora e al tempo zero. Tutti i valori sono inferiori allo 0,1: ciò indica che lo ZnO non viene rilasciato. Il film

NEW C (dove non è presente ossido di zinco) è quello che presenta il valore più elevato (0,0913) ma non si osserva una proporzionalità tra i valori acquisiti e le concentrazioni di ZnO presenti nei campioni.

	Differenza dei valori di assorbanza a 1 ora e al tempo 0
<i>NEW C</i>	0,09133173
<i>NEW 0,5% ZnO</i>	0,04896553
<i>NEW 1% ZnO</i>	0,06737003
<i>NEW 2% ZnO</i>	0,0579284

Tabella 4.3 - Differenza tra OD₃₈₀ presi ad 1 ora e al tempo zero per tutte le tipologie di campioni NEW

E' stata, inoltre, effettuata una misurazione del pH dell'acqua in cui i campioni sono stati immersi a diversi tempi di incubazione. Si possono osservare i dati in Figura 4.13, rappresentante per ogni tipologia di film il pH al tempo zero e dopo un'ora: in tutti i campioni si ha un aumento del valore di pH. Il rilascio è risultato anche in questo caso immediato: infatti si è effettuata un'ulteriore determinazione del pH a 48 ore ma i valori non hanno subito variazioni significative rispetto alle misurazioni effettuate dopo 1 ora.

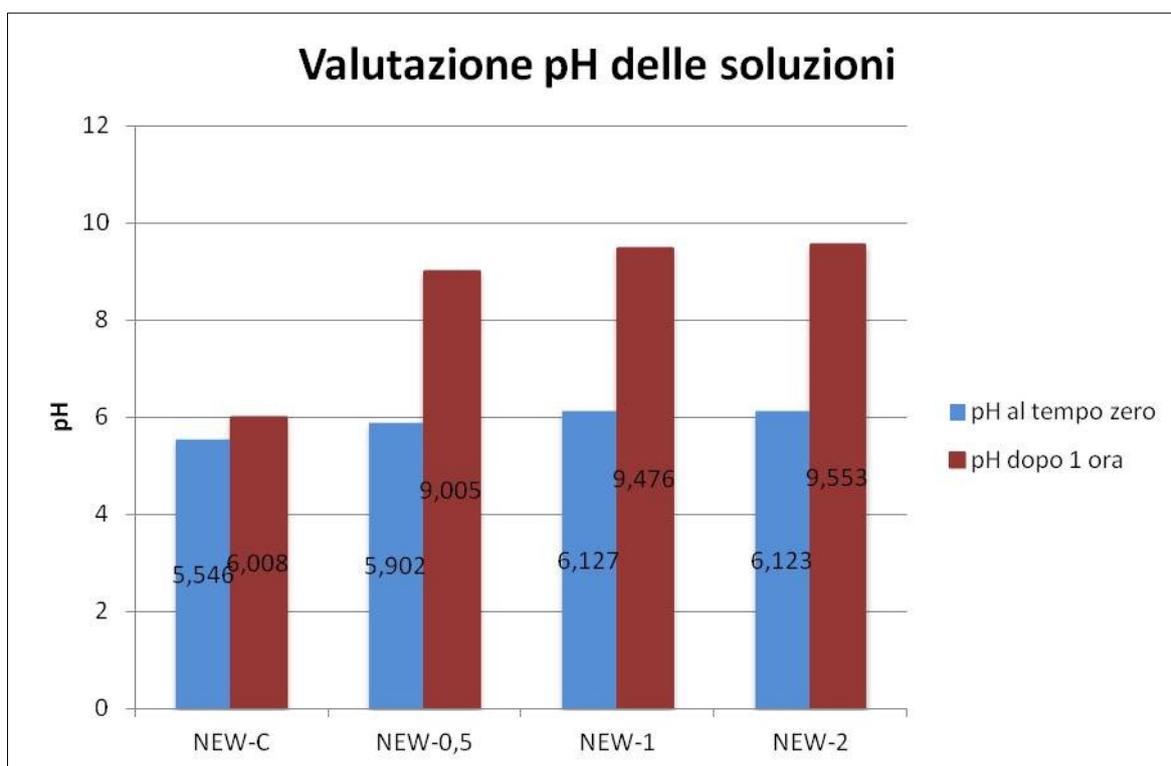


Figura 4.13 - Valutazioni del pH delle soluzioni

Il campioni contenenti l'ossido di zinco hanno subito una variazione maggiore del valore di pH: tutti e tre hanno subito un aumento del pH. Inoltre il rilascio della sostanza responsabile dell'aumento del pH è proporzionale alla concentrazione di ZnO. Nel controllo il pH non ha subito una variazione significativa: da 5,546 a 6,008, dopo 1 ora di incubazione, mentre nel campione NEW 0,5 il pH è aumentato di 3,1, nel campione NEW 1 di 3,35 e in quello NEW 2 di 3,43.

4.3. Prove antimicrobiche

4.3.1. Metodo dell'alone di inibizione

Il metodo dell'alone di inibizione è stato utilizzato per una prima valutazione delle proprietà antimicrobiche dei film a base di β -glucani: WE, SBC e NEW.

Le prove di inibizione della crescita sono state effettuate sia con un batterio Gram negativo, *Escherichia coli*, che con uno Gram positivo, *Staphylococcus epidermidis*. I batteri sono stati inoculati seguendo il metodo riportato nel capitolo 3 "Materiali e Metodi" nel sottoparagrafo 3.2.2.1.

Escherichia coli (LMG 08063)

Durante l'esecuzione del test, è stato osservato che, come per la prova di rilascio di colore su terreno agar-acqua (paragrafo 4.2.1), i film WE (Figura 4.14) hanno aderito con facilità alla superficie del terreno Mueller-Hinton mentre i campioni NEW (Figura 4.15) e SBC (Figura 4.16), hanno avuto maggiori difficoltà a rimanere adesi al terreno. Come è possibile osservare in figura, il controllo del campione NEW non è riuscito a distendersi. Anche in questo caso, i campioni SBC e NEW hanno rilasciato immediatamente colore al di sotto del film appena entrati in contatto con la superficie del terreno agarizzato.

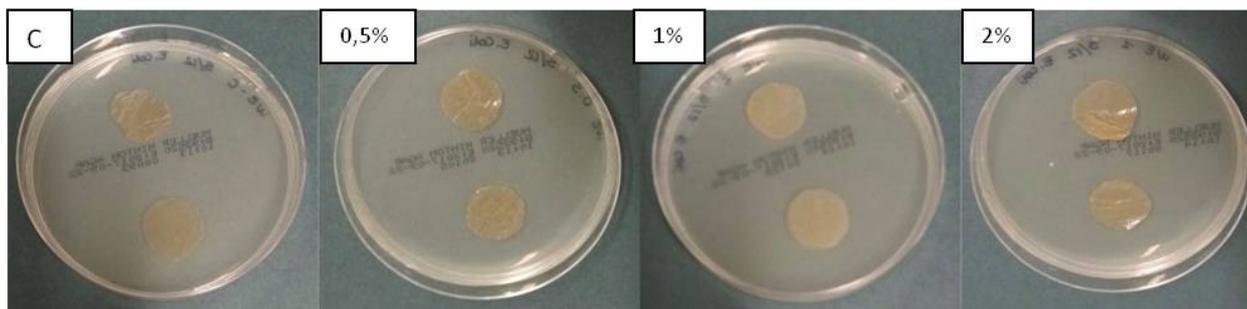


Figura 4.14- Campioni WE a concentrazioni crescenti di ZnO al tempo zero.

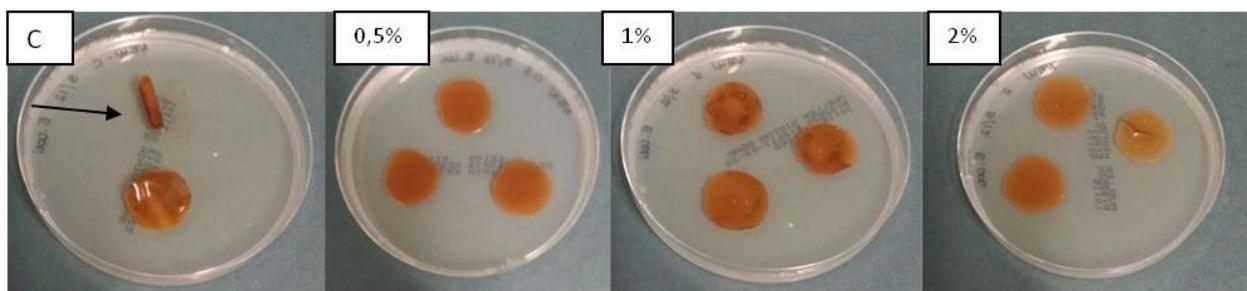


Figura 4.15 - Campioni NEW a concentrazioni crescenti di ZnO al tempo zero

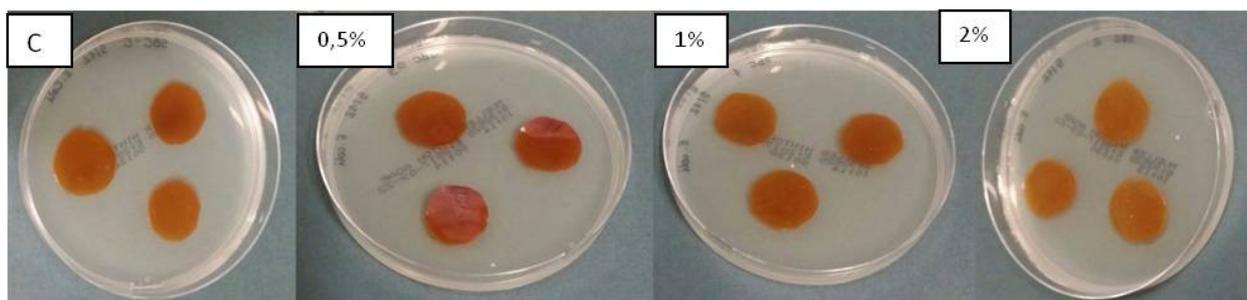


Figura 4.16 - Campioni SBC a concentrazioni crescenti di ZnO al tempo zero

Dopo 24 ore di incubazione, è stata osservata una buona crescita batterica su tutte le piastre. Per quanto riguarda le proprietà antimicrobiche dei film è possibile effettuare le seguenti osservazioni:

- WE: la crescita di *E. coli* è presente anche sotto al film (Figura 4.17), non si osserva alcun tipo di alone, né di rilascio tanto meno di inibizione. Non si sono evidenziate differenze tra il campione non trattato (controllo) e quelli a diverse concentrazioni di ossido di zinco;
- NEW: non è stata rilevata crescita batterica sotto ai campioni, sia in quelli con ossido di zinco sia nel controllo. Non è stato osservato alcun alone di inibizione e neppure di rilascio: attorno al film non si sono osservate colorazioni differenti (Figura 4.18);

- SBC: come per i campioni NEW, non è stata osservata crescita sotto ai film e non è stato riscontrato alone di inibizione. Dalla Figura 4.19 si nota, una zona di rilascio di colore attorno ai campioni. L'ampiezza della zona tende a diminuire all'aumentare della concentrazione di ZnO. E' quindi possibile ipotizzare che l'ossido di zinco legghi le sostanze che vengono rilasciate.

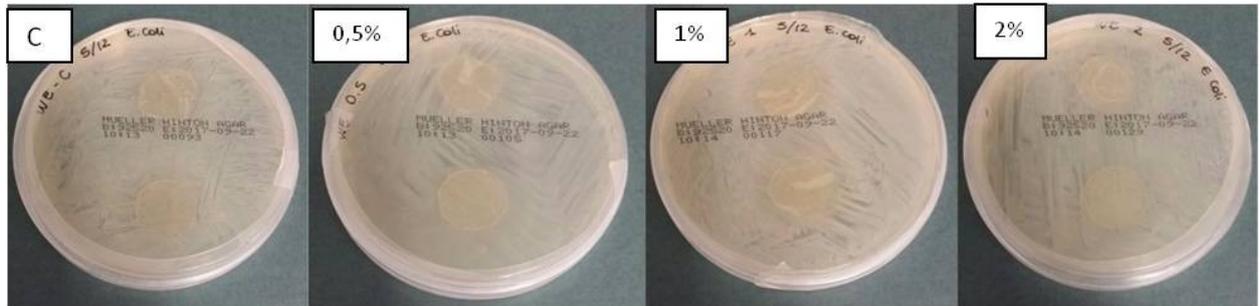


Figura 4.17 - Campioni WE dopo 24 ore a concentrazioni crescenti di ZnO

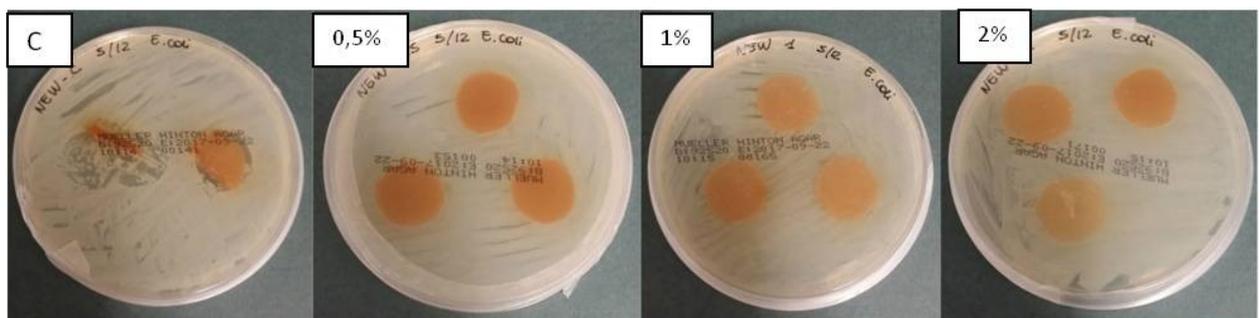


Figura 4.18 - Campioni NEW dopo 24 ore a concentrazioni crescenti di ZnO

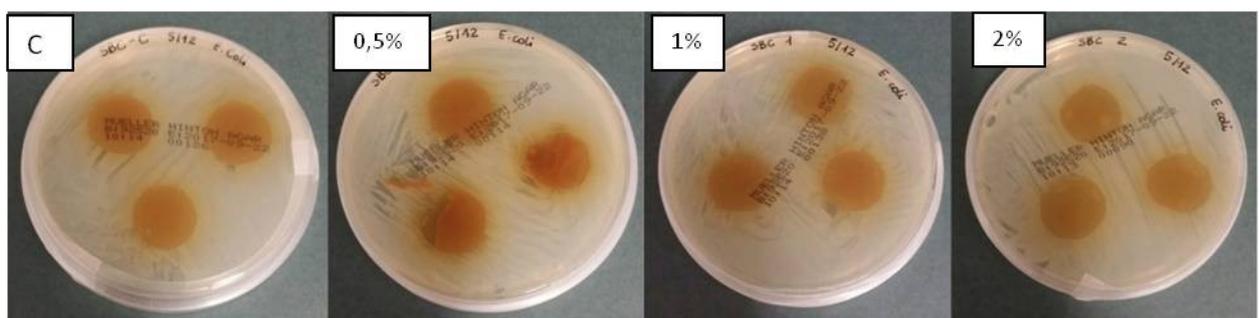


Figura 4.19 - Campioni SBC dopo 24 ore a concentrazioni crescenti di ZnO

In Figura 4.20 è possibile osservare che nella piastra con i campioni del film NEW C c'è una zona in cui il batterio non è cresciuto. Nell'allestimento della prova, cercando di distendere il campione NEW C, esso ha toccato in più punti la superficie del terreno agarizzato: dove il

film è stato a contatto con il terreno, il batterio non è cresciuto. In Figura 4.21 si osserva che il campione SBC 0,5% ZnO, risulta essersi spezzato e spostato: dove il film era appoggiato non è avvenuta crescita. Questo dimostra che il solo contatto del film con il terreno inoculato ha inibito la crescita. In generale, nei due film estratti a pH alcalino, è stata inibita la crescita del microrganismo anche dove il campione risulta essersi rialzato. Ciò potrebbe essere in accordo con quanto osservato nel paragrafo 4.2.2 “Test di rilascio in terreno liquido” dove la sostanza liberata dai film, è stata rilasciata immediatamente.

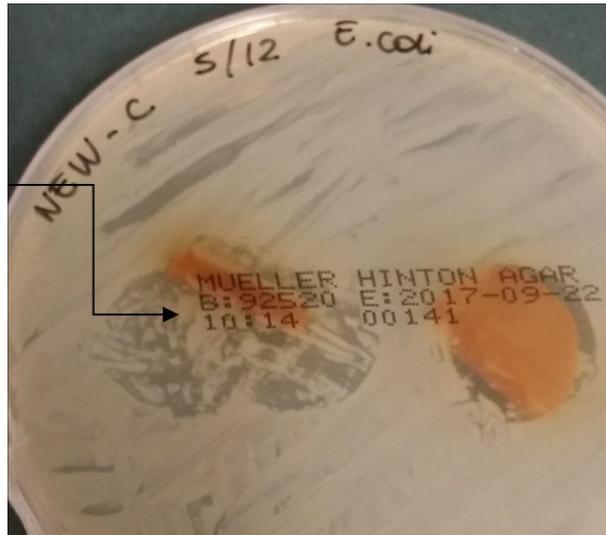


Figura 4.20 - Particolare del campione NEW C dopo 24 h

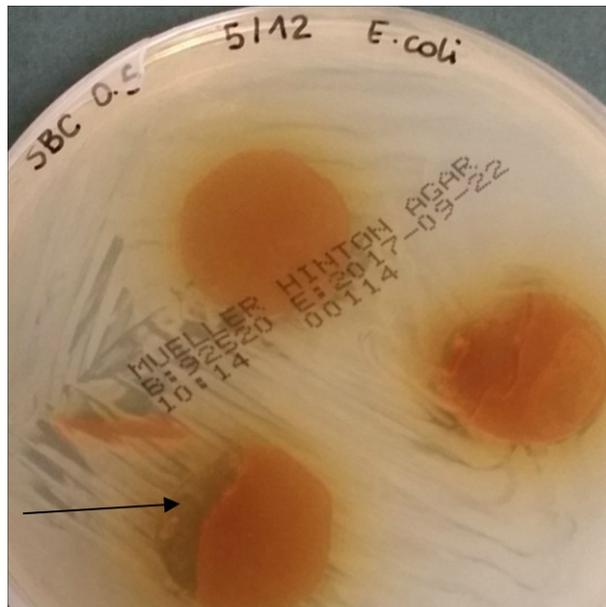


Figura 4.21 - Particolare del campione SBC 0,5 % ZnO dopo 24 h

Staphylococcus epidermidis (LMG 10474)

In questo caso, l'adesione dei campioni al terreno solido è risultata migliore e nessun film si è spezzato.

Nelle Figure 4.23 (campioni WE), 4.24 (campioni NEW) e 4.25 (campioni SBC) sono riportate le immagini delle piastre al tempo zero.

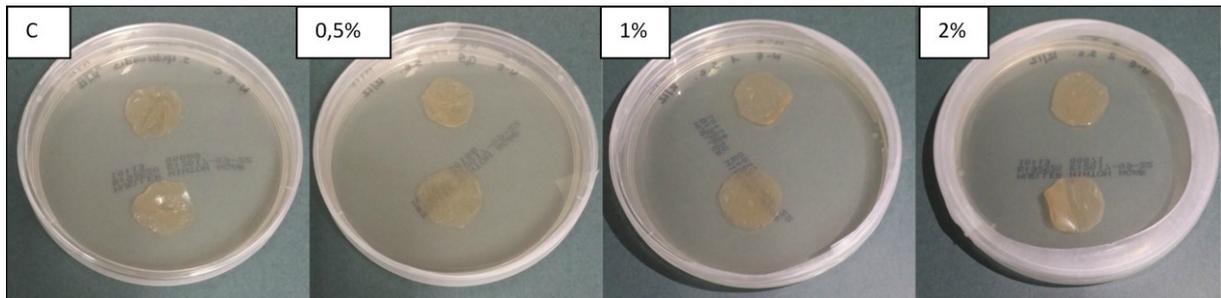


Figura 4.22- Campioni WE a concentrazioni crescenti di ZnO al tempo zero

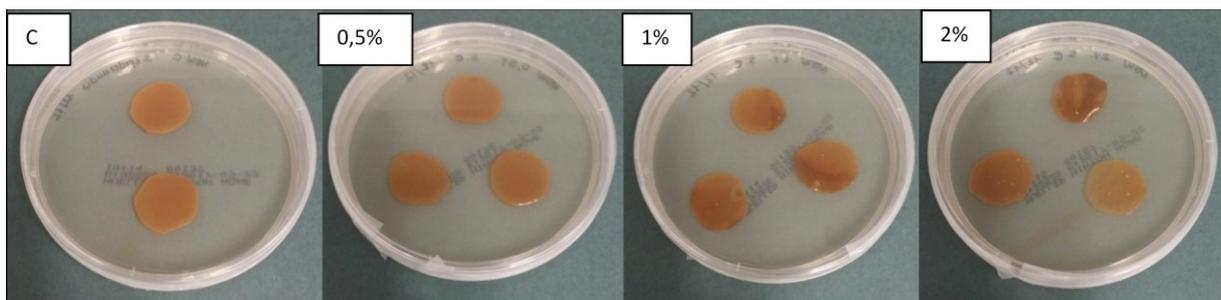


Figura 4.23 - Campioni NEW a concentrazioni crescenti di ZnO al tempo zero

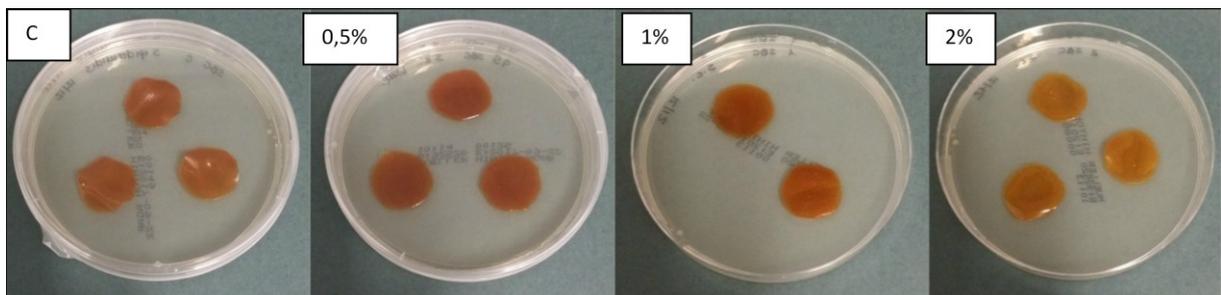


Figura 4.24 - Campioni SBC a concentrazioni crescenti di ZnO al tempo zero

Dopo 24 ore, in tutte le piastre è stata osservata una buona crescita batterica e dal punto di vista antimicrobico, è stato possibile effettuare le seguenti considerazioni:

- WE (Figura 4.25): non si è notata alcun tipo di crescita al di sotto del film sia nel controllo sia alle diverse concentrazioni di ossido di zinco. Attorno ai campioni non è presente alone di inibizione, inoltre dove il film si è rialzato, il batterio è cresciuto.
- NEW (Figura 4.26): il film, indistintamente se trattato o meno con ZnO, ha inibito la crescita di *S. epidermidis* sotto il campione. Nemmeno in questo caso è presente alone di inibizione della crescita. Nel film con il 2% di ZnO si osserva che dove il disco si è rialzato c'è stata crescita batterica.
- SBC (Figura 4.27): si osserva che il microrganismo non è cresciuto al di sotto del film in nessun caso, compreso il campione non trattato con ZnO. In questo caso, è evidente un alone di inibizione la cui ampiezza è inversamente proporzionale alla concentrazione di ossido di zinco. Infatti, l'alone risulta essere minore nel campione con il 2% di ZnO rispetto a quello con lo 0,5%. Potrebbe essere l'inibizione della crescita batterica sia dovuta all'azione sinergica tra lo ZnO e i β -glucani. E' possibile che a minori concentrazioni, l'ossido di zinco diffonda mentre a concentrazioni maggiori si leghi a qualche sostanza contenuta nei film e non riesca a diffondere.

In tutte le tipologie di film si è osservato un alone biancastro attorno ai dischi: questo potrebbe essere dovuto al rilascio di colore (paragrafo 4.2.1) che, con la crescita del batterio, ha assunto questa colorazione.

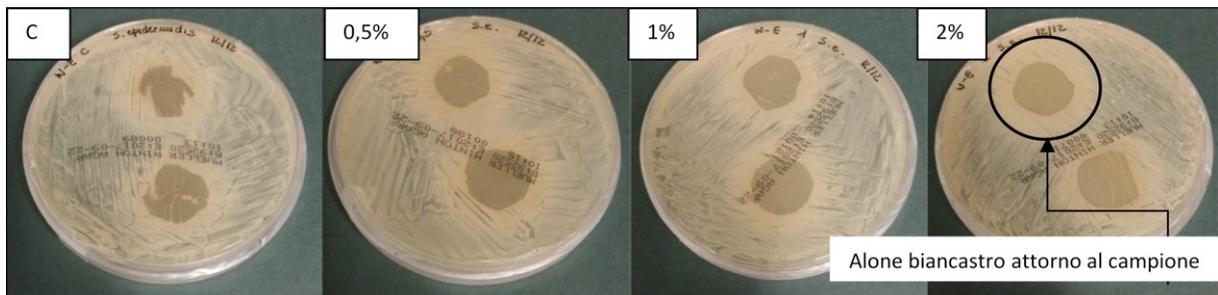


Figura 4.25 - Campioni WE dopo 24 ore a concentrazioni crescenti di ZnO

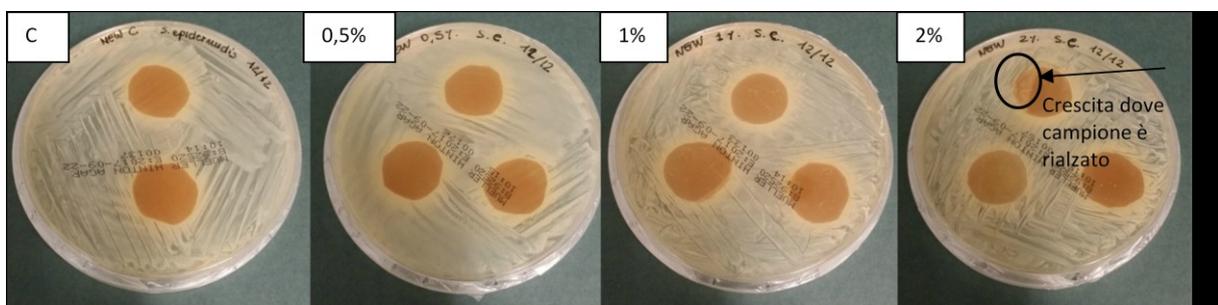


Figura 4.26 - Campioni NEW dopo 24 ore a concentrazioni crescenti di ZnO

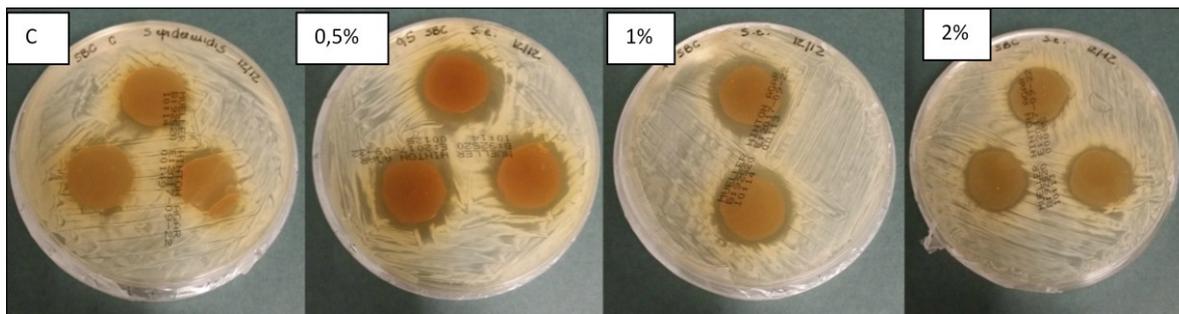


Figura 4.27 - Campioni SBC dopo 24 ore a concentrazioni crescenti di ZnO

Si è inoltre calcolato la larghezza della corona circolare in cui non è avvenuta la crescita del microorganismo (alone di inibizione) per i film SBC:

- SBC C: non presenta alone di inibizione;
- SBC 0,5%: è il campione che mostra un alone di inibizione maggiore: corona circolare in cui non è avvenuta crescita pari a 4 mm;
- SBC 1%: ha una corona circolare di 3,25 mm;
- SBC 2%: è il film con un minor alone di inibizione: corona circolare pari a 1 mm.

Confronto tra i risultati ottenuti con *E. coli* e con *S. epidermidis*

In relazione ai risultati ottenuti e riportati nei sottoparagrafi *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* nel paragrafo 4.3.1 “Metodo dell’alone di inibizione”, possono essere evidenziate alcune differenze relative all’efficacia antimicrobica dei film nei confronti dei batteri Gram- (*Escherichia coli*) e Gram+ (*Staphylococcus epidermidis*). Più precisamente è possibile affermare che, a 24 ore, l’efficacia antimicrobica dei film risulta essere maggiore nei confronti dei batteri Gram positivi: infatti in nessuna tipologia di film il microorganismo è cresciuto al di sotto del campione, mentre con *E. coli* nei film WE è stata osservata una crescita (Figura 4.28). Inoltre, a differenza di *E. coli*, con *S. epidermidis* è stato osservato un alone di inibizione nel caso dei film SBC. (Figura 4.29).



Figura 4.28 - Campione WE 2% ZnO, a sinistra, con *E.coli* a destra, con *S. epidermidis*

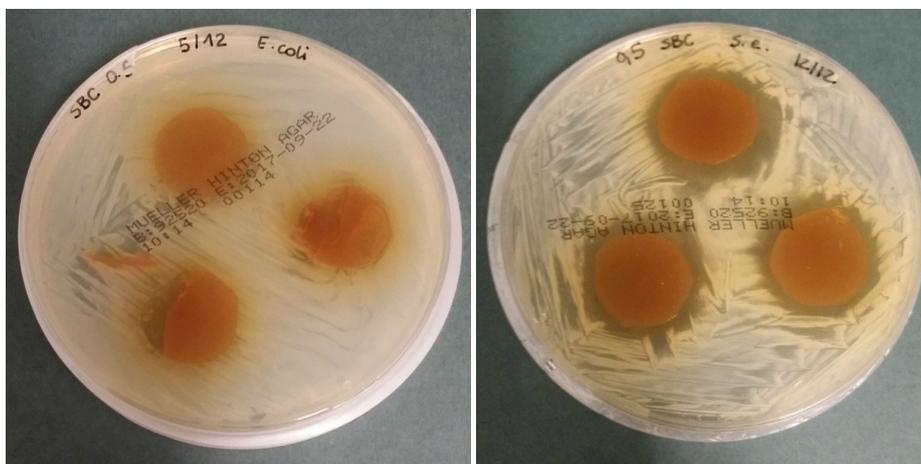


Figura 4.29 – Campione SBC 0,5% ZnO: a sinistra con *E. coli* a destra con *S. epidermidis*

4.3.2. Metodo delle strisce parallele

Una seconda valutazione dell'efficacia antimicrobica dei film WE, NEW e SBC, è stata effettuata con il metodo delle strisce parallele (metodo standard AATCC-147, descritto nel paragrafo 3.2.2.2 “Metodo delle strisce parallele” nel capitolo 3), utilizzato per campioni che non rilasciano alcuna sostanza. Anche in questo caso la prova è stata realizzata sia con batteri Gram negativi (*E. coli*) che con Gram positivi (*S. epidermidis*).

E. coli (LMG 08063)

In queste prove sono stati utilizzati dei vetrini per favorire l'adesione dei film al terreno agarizzato, questo poiché i campioni, SBC in particolare, avevano mostrato nei test precedenti una scarsa propensione ad aderire alla superficie.

Inoltre, in queste prove, per *E. coli* non è stata usata la temperatura ottimale di crescita del ceppo (20° C), adottata per il metodo dell'alone di inibizione, bensì la temperatura di 37° C (corporea), ipotizzando l'applicazione di questi film come medicazioni ad uso epidermico.

Dopo 24 ore di incubazione a 37° C, sono state effettuate le seguenti osservazioni dal punto di vista delle proprietà antimicrobiche:

- WE (Figura 4.30): in questo caso non si ha crescita al di sotto del film, non è stata notata una zona di inibizione. *E. coli* è cresciuto sia dove il film si è rialzato, sia lungo i bordi del campione. Non si sono osservate differenze tra il controllo e i campioni a diverse concentrazioni di ZnO. Il campione con concentrazione di ossido di zinco pari al 2% ha presentato una crescita maggiore.
- NEW (Figura 4.31): anche su questa tipologia di film, sia il controllo che i campioni con ossido di zinco si sono comportati allo stesso modo. Sotto al film non è cresciuto il batterio ma non è presente alone di inibizione. La crescita può essere notata lungo i bordi dei film, ma in maniera meno evidente rispetto ai campioni della tipologia WE.
- SBC (Figura 4.32): sono gli unici campioni a presentare un alone di inibizione che, anche in questo caso, è confrontabile con il colore rilasciato dal film. La zona inibita è presente in tutti i campioni di questa tipologia, anche nel controllo (senza ZnO). Inoltre il batterio non è cresciuto al di sotto del campione e neanche lungo i bordi.

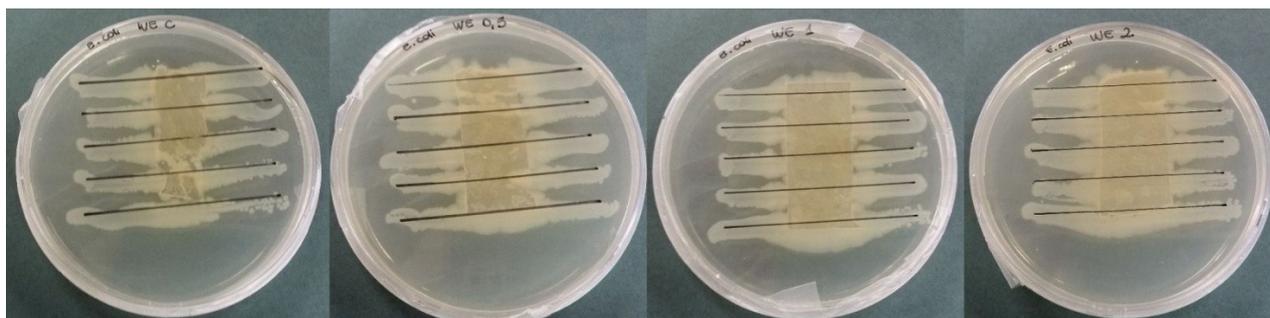


Figura 4.30 - Campioni WE a concentrazioni crescenti di ZnO dopo 24 ore

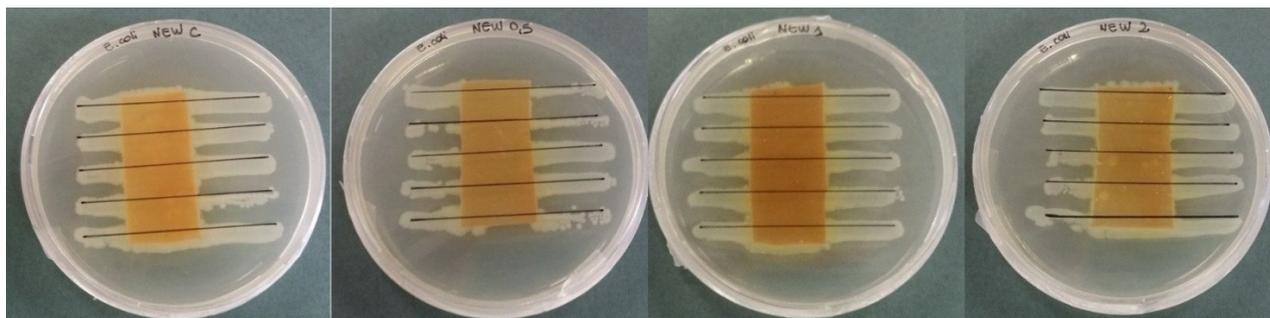


Figura 4.31 - Campioni NEW a concentrazioni crescenti di ZnO dopo 24 ore

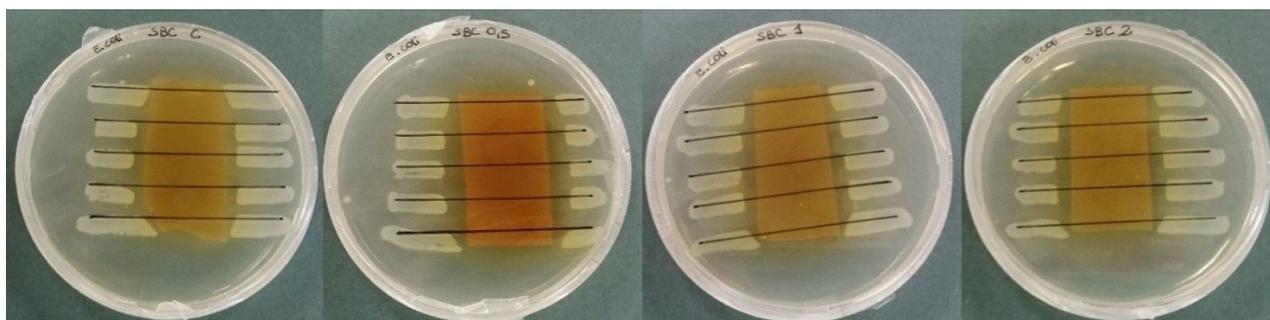


Figura 4.32 - Campioni SBC a concentrazioni crescenti di ZnO dopo 24 ore

L'alone di inibizione è stato calcolato, utilizzando la formula riportata nel capitolo 3 "Materiali e metodi", nel paragrafo 3.2.2.2, soltanto sui film SBC, essendo gli unici a presentare una zona inibita calcolabile. Viene riportato l'istogramma (Figura 4.33) contenente le medie e le deviazioni standard. I valori numerici del calcolo della larghezza della zona in cui non è avvenuta crescita batterica sono riportate nelle Tabelle 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 in appendice nel capitolo 6.

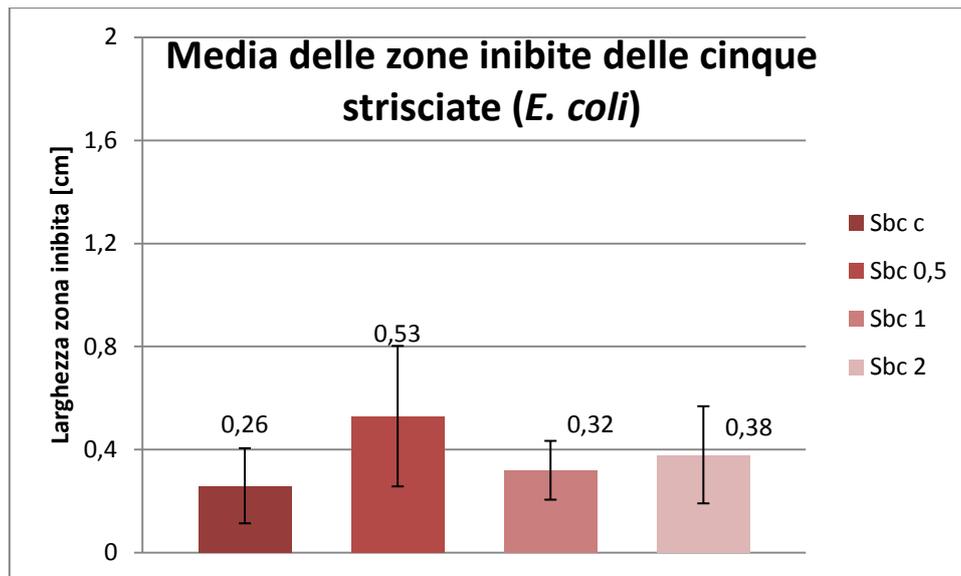


Figura 4.33 - Larghezze zone inibite per film SBC a diverse concentrazioni di ZnO

Nel grafico rappresentato in Figura 4.33 è rappresentata la media delle zone inibite dei campioni. Si osserva che la zona inibita più ampia è stata ottenuta con il campione SBC 0,5 % ZnO. Il campione SBC C mostra una zona inibita minore rispetto a tutti gli altri campioni. In ogni caso esso pur non presentando al suo interno ossido di zinco ha comunque evidenziato un'ampiezza della zona inibita pari a 0,26 cm. Ciò dimostra che i β -glucani sono antibatterici di per sè: rilasciano una sostanza che inibisce la crescita batterica anche senza ossido di zinco.

S. epidermidis (LMG 10474)

Anche in questo caso, è stato osservato che i campioni Sbc hanno avuto maggiori problemi a rimanere adesi alla superficie della piastra nonostante il vetrino posto sopra. Per i campioni NEW e WE, invece, non si sono riscontrate particolari difficoltà nell'adesione dei film al terreno agarizzato.

Dopo 24 ore dall'incubazione a 37° C, è stato possibile effettuare le seguenti osservazioni:

- WE (Figura 4.34): a primo impatto è stato osservato che non è presente alcuna zona di inibizione, *S. epidermidis* è cresciuto sia lungo i bordi del film che al di sotto. Questo fenomeno si è verificato in tutti e quattro i campioni, sia in quelli non trattati che quelli in cui è stato aggiunto l'ossido di zinco. La crescita sotto ai campioni non risulta ben evidente, con qualche difficoltà si intravedono le strisce in cui è presente il batterio (in Figura 4.35 si mostra un particolare ingrandito di un campione WE);
- NEW (Figura 4.36): in questo caso è stato notato un alone di inibizione. Infatti la crescita del batterio si è arrestata ad una certa distanza dal campione. Sotto al film e lungo i bordi del campione il microrganismo non è cresciuto. Osservando con attenzione si può affermare che, in questo caso, l'inibizione del batterio è

proporzionale alla concentrazione di ossido di zinco. Anche nel controllo *S. epidermidis* non è cresciuto.

- **SBC** (Figura 4.37): sono i campioni che hanno presentato un'inibizione maggiore, è stato rilevato che, sotto ai film e lungo i bordi non è presente crescita batterica. Si è osservata un'interruzione della crescita di *S. epidermidis* sia nei campioni trattati con ossido di Zinco che con il controllo. Quest'ultimo sembra visivamente essere quello con una zona inibita minore. Inoltre si può notare che l'alone di inibizione risulta coincidere con l'alone di rilascio di colore giallino (Figura 4.38).

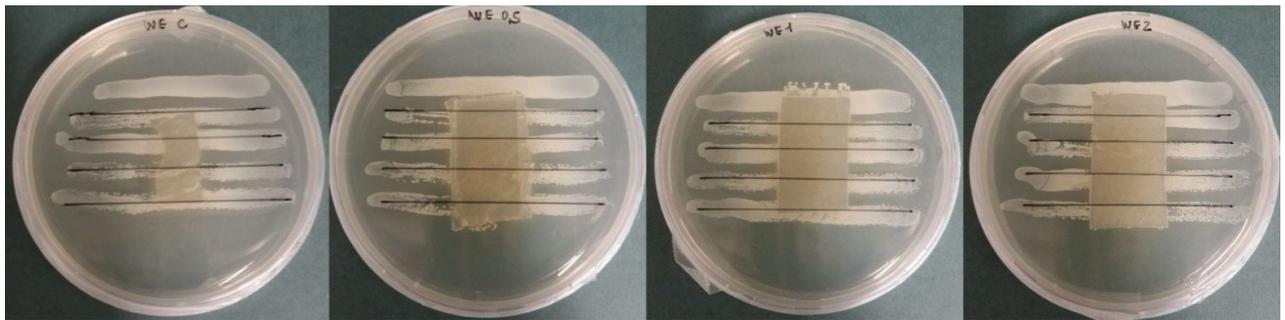


Figura 4.34 - Campioni WE a concentrazioni crescenti di ZnO dopo 24 ore

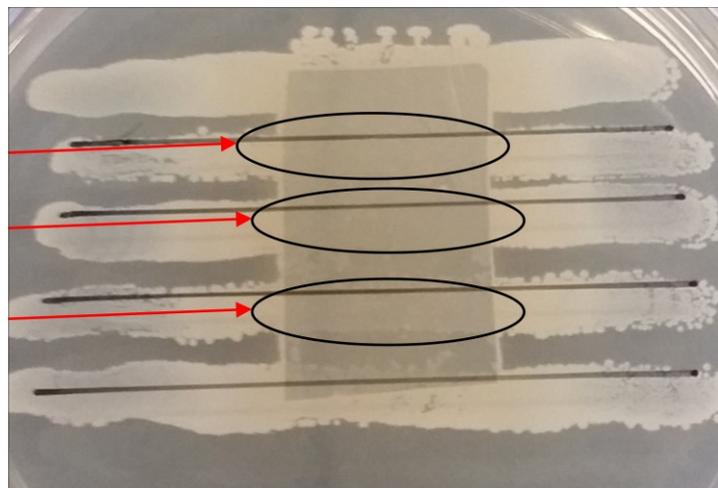


Figura 4.35 - Particolare di un campione WE

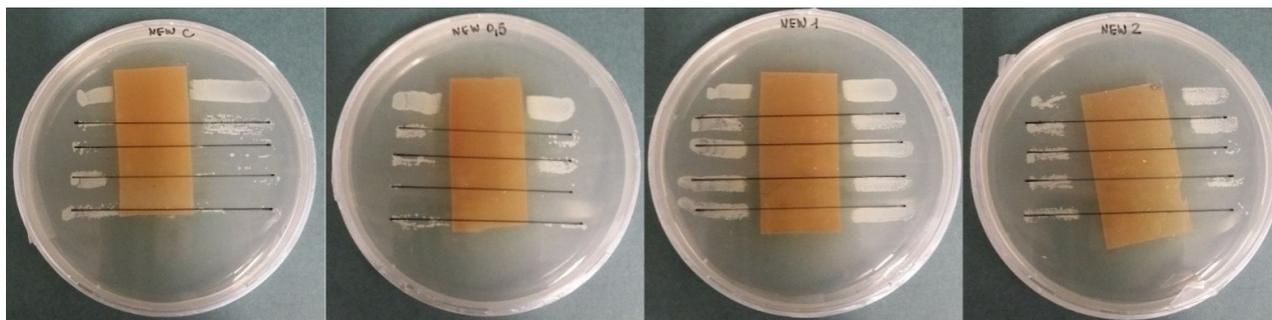


Figura 4.36 - Campioni NEW a concentrazioni crescenti di ZnO dopo 24 ore

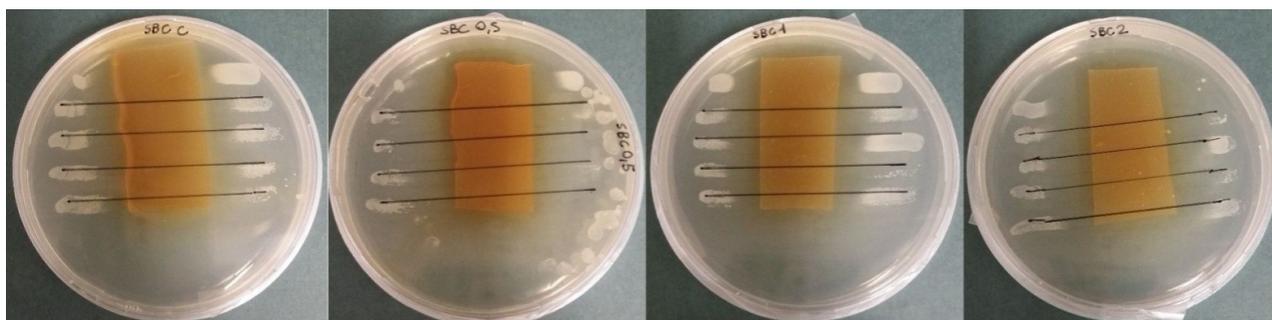


Figura 4.37 - Campioni SBC a concentrazioni crescenti di ZnO dopo 24 ore

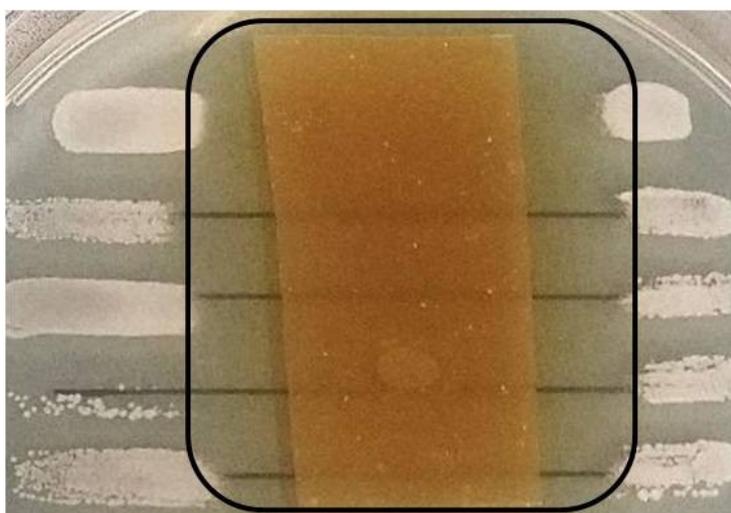


Figura 4.38 - Particolare del campione SBC

Per *S. epidermidis*, con lo stesso procedimento utilizzato nel test con *E. coli*, viene calcolata la larghezza delle zone di inibizione sia per la tipologia di film NEW sia per quella SBC.

Il grafico mostrato nella Figura 4.39 è relativo al confronto tra i campioni NEW, le Tabelle 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11 (capitolo 6 “Appendice”) riportano i valori numerici utilizzati per effettuare il calcolo.

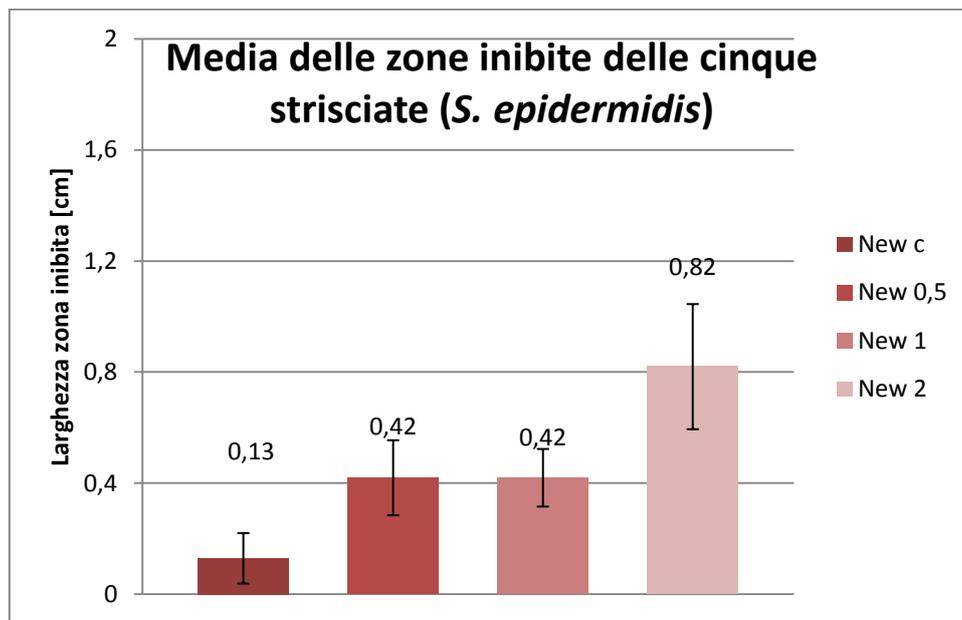


Figura 4.39- Larghezze zone inibite per film NEW a diverse concentrazioni di ZnO

Dal grafico in Figura 4.39 è possibile osservare che la zona inibita cresce proporzionalmente alla concentrazione di ossido di zinco: infatti la barra più chiara, rappresentante il campione NEW 2% ZnO, è maggiore (0,82 cm) rispetto a NEW 0,5% e 1% ZnO (valor medio pari a 0,42 cm). La barra rosso scuro, relativa al campione con inibizione minore (NEW controllo), presenta un valor medio di 0,13 cm.

Nella Figura 4.40 è possibile osservare i valori relativi ai film SBC. Nel capitolo 6 “Appendice”, le Tabelle 4.12, 4.13, 4.14 e 4.15 riportano i valori numerici utilizzati per effettuare il calcolo.

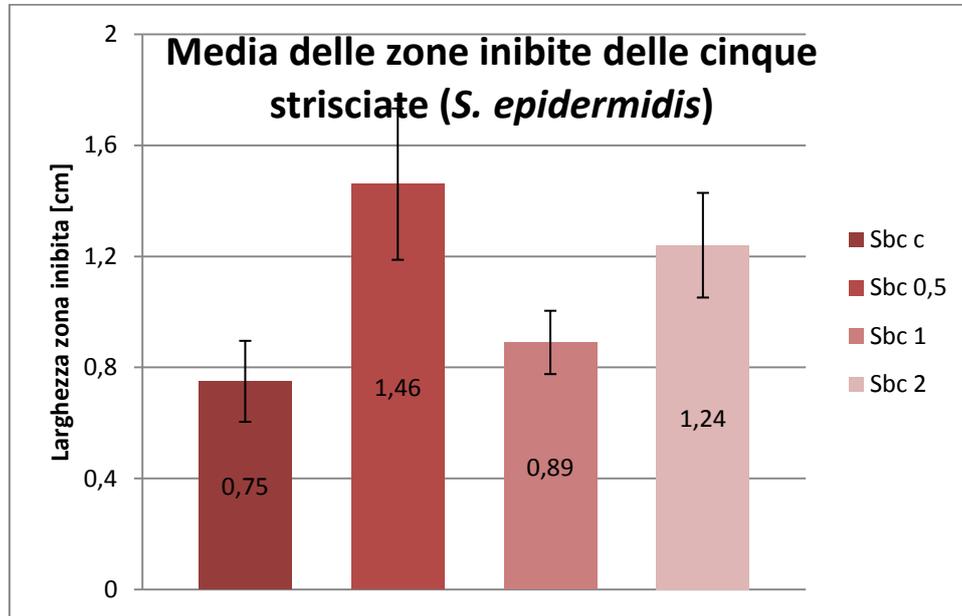


Figura 4.40- Larghezze zone inibite per film SBC a diverse concentrazioni di ZnO

Esaminando il grafico in Figura 4.40, si evidenzia che, anche per questa classe di film, la larghezza delle zone inibite cresce proporzionalmente con la concentrazione dell'ossido di zinco, ad eccezione del campione SBC 0,5% ZnO rappresentato dalla barra rossa nell'istogramma (seconda a partire da sinistra). Questo, pur essendo il film trattato con la minor concentrazione di ZnO, risulta quello con una zona inibita maggiore (valor medio pari a 1,46 cm).

Confrontando i risultati ottenuti per i film NEW e SBC, si può affermare che i primi presentano, in media, un minor rilascio per tutte le concentrazioni di ZnO, infatti prendendo in considerazione il controllo (barra rosso scuro in entrambi gli istogrammi, Figura 4.39 e 4.40) si ha che il campione NEW ha una media di 0,13 cm mentre quello SBC ha un valore di 0,75 cm.

Confronto tra i risultati ottenuti con *E. coli* e con *S. epidermidis*

Da una prima analisi visiva, così come nel test con il metodo dell'alone di inibizione, si può affermare che i film estratti a pH alcalino (NEW e SBC) presentano una attività antibatterica superiore nei confronti dei batteri Gram positivi (quale *S. epidermidis*). Infatti, in entrambi i casi è stato possibile osservare un alone di inibizione. Al contrario, con *E. coli* (Gram negativo), i campioni NEW, indipendentemente dalla presenza di ossido di zinco, hanno presentato una crescita copiosa, anche lungo i bordi del campione. Per i film SBC infine, l'alone di inibizione che si osserva con *S. epidermidis* risulta maggiore rispetto a quello con *E. coli* (Figura 4.41).

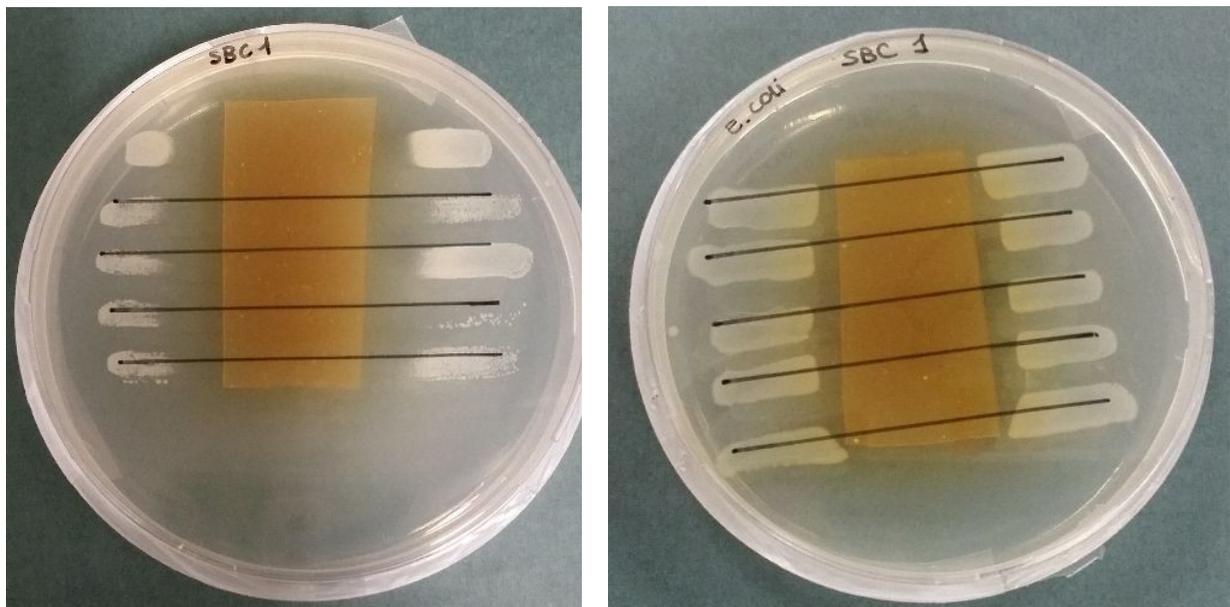


Figura 4.41 - Differenze di alone sulla stessa tipologia di film. A sinistra con *S. epidermidis*, a destra con *E. coli*

4.4.Film a base proteica- Proteine del siero del latte

4.4.1. Preparazione del film a base proteica

Sono state effettuate diverse prove per definire il miglior metodo per la produzione di questi film in laboratorio. Sono state definiti tempo e temperatura ottimali per evitare che il film, una volta formato, si solubilizzasse e conseguentemente, non permettesse l'esecuzione dei test antimicrobici. Il metodo messo a punto è stato riportato nella sezione 3.3.1 del capitolo 3 "Materiali e metodi".

Preparazione del film a base proteica con soluzione ultrafiltrata

Per cercare di ridurre la quantità di lattosio, la soluzione di *whey proteins* (WP) utilizzata è stata sottoposta al processo di ultrafiltrazione (Cut-off 10000 Da) prima di svolgere la normale procedura di preparazione del film. In assenza di lattosio, il film (Figura 4.42 a destra), è risultato, più elastico e con una trasparenza maggiore rispetto al composto filmato senza ultrafiltrazione (Figura 4.42 a sinistra).



Figura 4.42 - Film proteici, a destra di WP con lattosio, a sinistra di WP senza lattosio

4.4.2. Preparazione del film a base proteica con ZnO

Una volta ottimizzata la procedura per la preparazione del film di WP, si è dovuto mettere a punto il metodo di addizione dell'ossido di zinco. L'ossido di zinco infatti, rimane in sospensione a pH neutri. Per migliorare la dispersione della polvere nella soluzione di WP si è usata la disagregazione per ultrasuoni. E' stata aggiunta la concentrazione di ZnO pari all'1% e al 2% w/w (Figura 4.43).

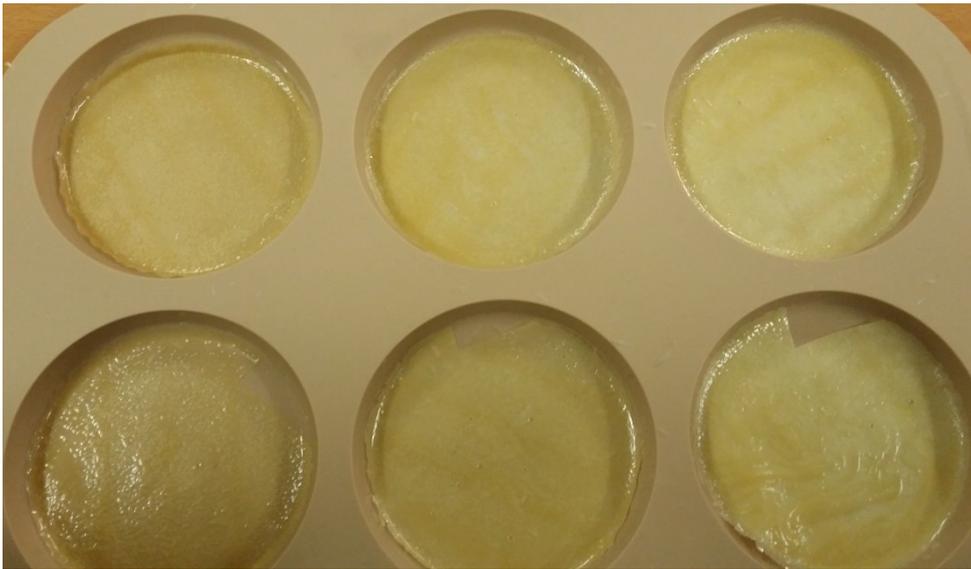


Figura 4.43 - Film proteici a diverse concentrazioni di ZnO, a sinistra senza ZnO, in centro 1% di ZnO e a destra 2% di ZnO

I film con ossido di zinco hanno presentato la faccia inferiore biancastra, molto più evidente a maggiori concentrazioni di ZnO. Nella Figura 4.44 si osserva il confronto tra la faccia inferiore del film senza additivi e la faccia inferiore del film con il 2% w/w di ossido di zinco.



Figura 4.44 - Confronto tra film senza ZnO e con 2% ZnO (destra)

4.4.3. Prove antimicrobiche su film proteici (Metodo strisce parallele)

La valutazione dell'attività antimicrobica del film proteico è stata effettuata tramite il metodo delle strisce parallele (descrizione nel paragrafo 3.2.2.2 in Materiali e metodi). Anche in questo caso, come per i campioni di β -glucani, sono stati testati *E. coli* e *S. epidermidis*. Sono stati testati sia i film tal quali che quelli addizionati con ZnO 1% e ZnO 2% come antimicrobico.

E.coli (LMG 08063)

Sono stati testati entrambi i lati dei film, sia quello superiore, di color caramello, che quello inferiore, più biancastro nel caso della presenza di ossido di zinco. In Figura 4.45 si riportano i campioni testati, da sinistra verso destra: WPC C, WPC 1% ZnO, WPC 2% ZnO.

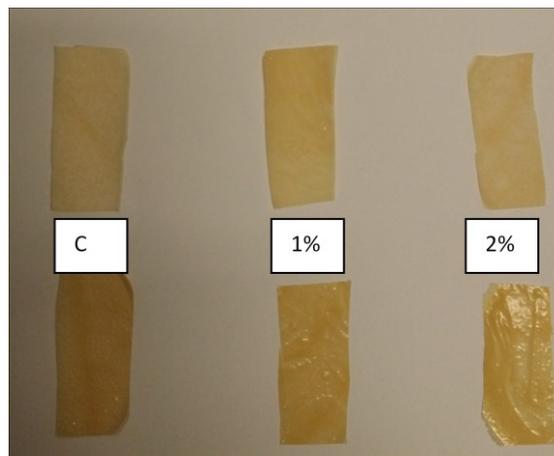


Figura 4.45 - Campioni di film proteici testati, facce inferiori in alto, facce superiori in basso

Dopo 24 ore di incubazione, è stato possibile osservare che:

- WPC C: sia per la superficie superiore (Figura 4.46 a sinistra), sia per quella inferiore (Figura 4.47 a sinistra) a contatto con il terreno agarizzato, è stata notata una crescita molto abbondante. Il microrganismo si è sviluppato sotto e sopra il film, e lungo i bordi dello stesso.
- WPC 1% ZnO: nella piastra con la superficie superiore a contatto con il terreno agarizzato (Figura 4.46 in centro), non è stata rilevata crescita né al di sotto del campione e nemmeno lungo i bordi. Nella piastra con la faccia inferiore (più biancastra) del film a contatto con la superficie del terreno (Figura 4.47 centrale), si è presentata raggrinzita, come se si fosse ritratta, non è rimasta perfettamente adesa alla superficie del terreno. Anche in questo caso, non è stata rilevata crescita al di sotto del film, nemmeno nelle parti di campione non adese alla superficie. Non è stato notato

alone di inibizione: la crescita batterica è stata inibita soltanto attraverso il contatto del film al terreno agarizzato.

- WPC 2% ZnO: il campione appoggiato con la faccia superiore a contatto con la superficie dell'agar (Figura 4.46 a destra), ha presentato un'inibizione della crescita al di sotto del film e lungo i bordi si è osservato un piccolo alone di inibizione. Allo stesso modo, si è osservata inibizione della crescita nel campione con la faccia inferiore (di colore bianco) adesa alla piastra (Figura 4.47 a destra). In questo caso l'alone di inibizione è ben visibile.

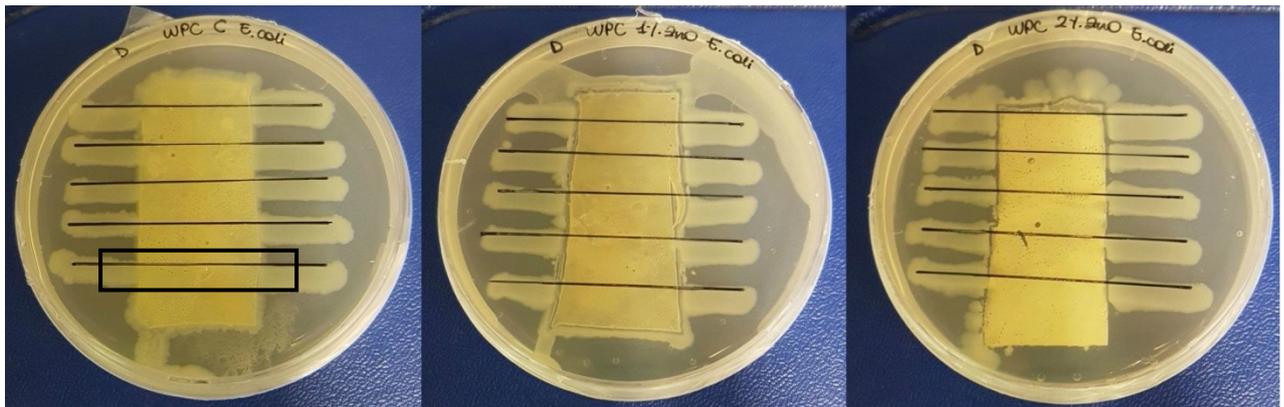


Figura 4.46 - Film di WPC dopo 24 ore, facce superiori a contatto con il terreno. Da sinistra: C (senza ZnO), 1% ZnO e 2% ZnO

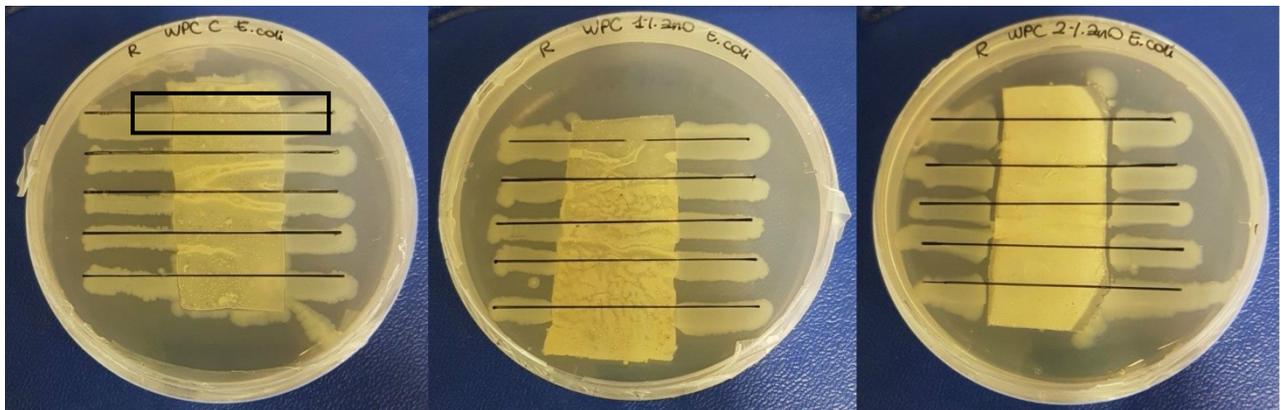


Figura 4.47 - Film di WPC dopo 24 ore, facce inferiori a contatto con il terreno. Da sinistra: C (senza ZnO), 1% ZnO e 2% ZnO

S. epidermidis (LMG 10474)

Il test antimicrobico effettuato con *E. coli* è stato attuato anche con *S. epidermidis*. I campioni analizzati con il metodo delle strisce parallele sono gli stessi riportati in Figura 4.45.

Anche in questo caso sono state testate entrambe le superfici del film.

Dopo 24 ore di incubazione è possibile effettuare le seguenti osservazioni:

- WPC C: nel film senza ZnO è stata notata crescita sia sopra che sotto al film. Non è stata osservata alcuna differenza di comportamento tra le due facce del film: l'inibizione non è stata rilevata né con quella superiore (Figura 4.48 sulla sinistra) né con la superficie inferiore (4.49 sulla sinistra) a contatto con il terreno;
- WPC 1% ZnO: in questo caso non c'è stata crescita del microrganismo al di sotto del film e nemmeno lungo i bordi dei campioni. La superficie inferiore, più chiara, (Figura 4.49 in centro), presenta un'area di inibizione maggiore rispetto alla superficie superiore (Figura 4.48 in centro).
- WPC 2% ZnO: la concentrazione maggiore di ossido di zinco ha mostrato un'efficacia antibatterica più elevata rispetto agli altri campioni. Il microrganismo non è cresciuto né al di sotto del film e nemmeno lungo i bordi, è stato possibile osservare una zona di inibizione per entrambe le superfici del film, zona leggermente più ampia nella faccia inferiore (Figura 4.49 a destra) rispetto alla superficie superiore (Figura 4.48 a sinistra).

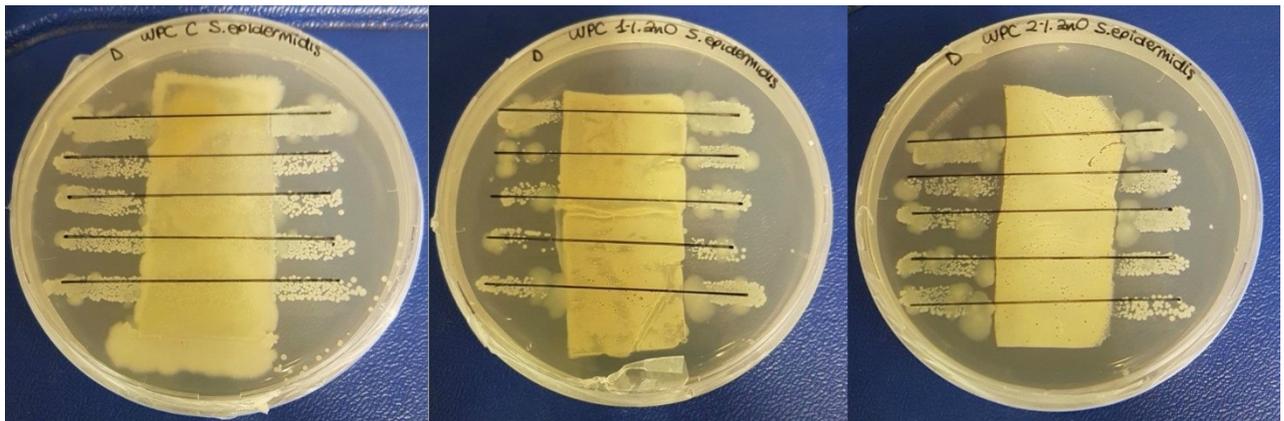


Figura 4.48 - Film di WPC dopo 24 ore, facce superiori a contatto con il terreno. Da sinistra: C (senza ZnO), 1% ZnO e 2% ZnO

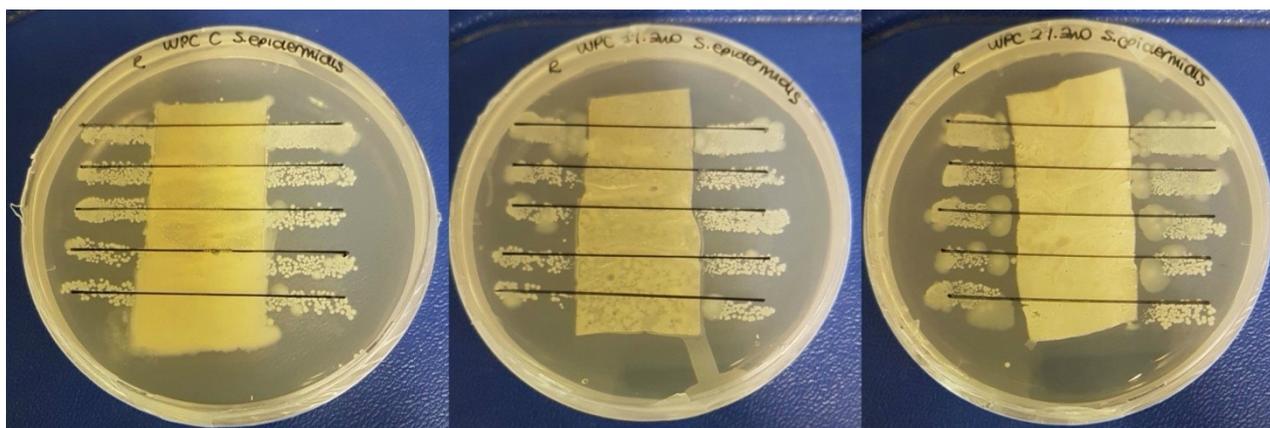


Figura 4.49 - Film di WPC dopo 24 ore, facce inferiori a contatto con il terreno. Da sinistra: C (senza ZnO), 1% ZnO e 2% ZnO

L'azione antibatterica dei film a base di WP, addizionati con ZnO, è risultata superiore nei confronti di *S. epidermidis*, pertanto, solo in questo caso è stata calcolata la larghezza delle zone inibite. Inoltre la larghezza delle zone inibite è stata calcolata soltanto con i campioni contenenti il 2% di ZnO poiché negli altri così non risultava calcolabile. Come per i film di β -glucani, l'ampiezza delle zone inibite è stata calcolata mediante la formula (2) riportata nel paragrafo 3.2.2.2 "Metodo delle strisce parallele". Nelle Tabelle 4.16 e 4.17 (in appendice) sono riportati i valori numerici utili per il calcolo. Il grafico mostrato in Figura 4.50 mostra, per i film di WP con il 2% ZnO, in media la larghezza delle zone inibite.

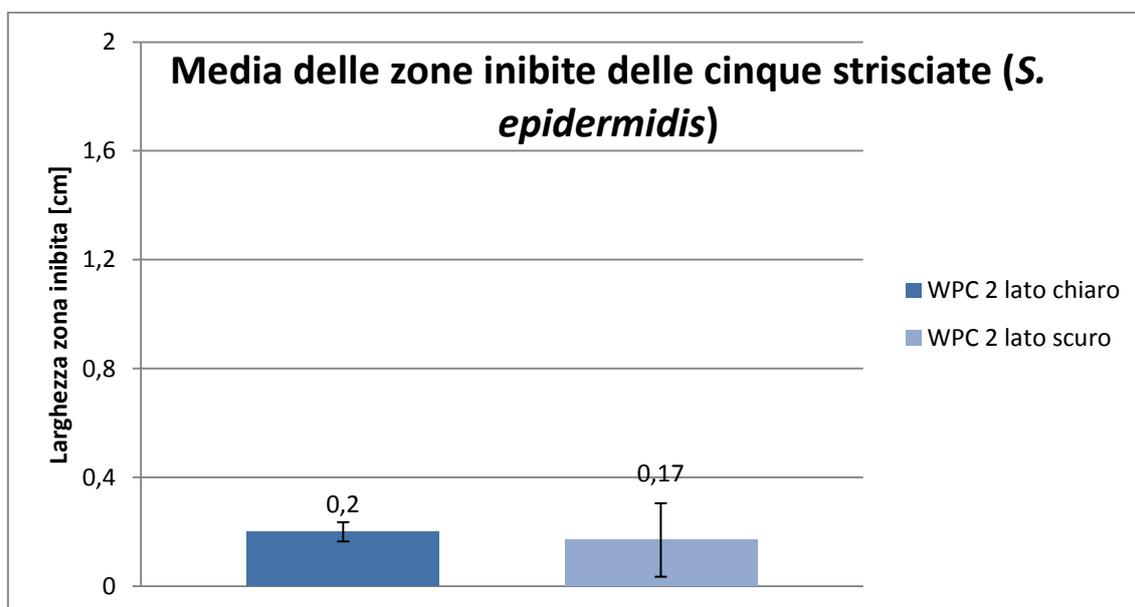


Figura 4.50 - Medie per film WPC 2%ZnO delle larghezze delle zone inibite nelle cinque strisce

Nel grafico in Figura 4.50, rappresentante la media della larghezza delle zone inibite sia per il lato color caramello (barra azzurra) che per il lato bianco (barra blu), si può osservare che la larghezza delle zone inibite per il lato chiaro è leggermente maggiore rispetto al lato scuro. (0,2>0,17). In ogni caso, nei confronti di entrambi i microrganismi non è stata rilevata una sostanziale differenza tra le due superfici del film. Questo dimostra che l'ossido di zinco si è disperso in modo abbastanza omogeneo nella matrice proteica.

Inoltre, si rileva che la larghezza delle zone inibite nel caso di film di WP sono molto inferiori rispetto a quelle dei film β -glucani a parità di concentrazione di ZnO. Forse questa differenza dipende dall'interazione dell'ossido di zinco con la diversa matrice, in un caso polisaccaridica e nell'altro proteica. In letteratura qualcuno ha rilevato che l'ossido di zinco si lega ai peptidi delle proteine: ciò potrebbe limitarne la diffusione. Oppure nel caso dei film polisaccaridici, ci potrebbe essere il rilascio di qualche altra sostanza antimicrobica, diversa da ZnO.

Per i film proteici non si rilevano importanti differenze tra i due batteri: infatti la crescita al di sotto del film senza ossido di zinco è presente sia per quanto riguarda i batteri Gram negativi che per quelli Gram positivi. considerando invece i campioni addizionati di ZnO, si è notato che l'alone di inibizione è leggermente inferiore con *E. coli* (Gram-) che con *S. epidermidis* (Gram+) come già osservato con i film polisaccaridici.

5. Conclusioni

Il lavoro di tesi svolto ha consentito di valutare l'efficacia antimicrobica dello ZnO addizionato a due differenti tipologie di film di origine naturale, uno a base polisaccaridica ed uno a base proteica. Inoltre è stato valutato il possibile potere antimicrobico dei due film tal quali, in assenza di ZnO. L'efficacia antimicrobica di tutti i film è stata testata in presenza di due batteri che si possono trovare sulla cute, *S. epidermidis* (Gram positivo) ed *E. coli* (Gram negativo).

La risposta dei due microrganismi all'agente antimicrobico è risultata differente a seconda della matrice in cui ZnO è stato incorporato.

I film polisaccaridici hanno mostrato una differente efficacia a seconda del metodo di estrazione dei β -glucani. I film WE, derivanti da una estrazione dei β -glucani in acqua, addizionati di ZnO, hanno mostrato un potere antibatterico scarso, evidenziabile solo nei confronti di *E. coli*. Tale risultato è stato ottenuto anche per i film WE tal quali. Migliori risultati sono stati invece ottenuti con i film NEW ed SBC, a base di β -glucani estratti in soluzioni acquose basiche, addizionati con ZnO. Entrambi i film hanno mostrato di avere un potere antimicrobico sia nei confronti del batterio Gram positivo che di quello Gram negativo; la crescita di entrambi i microrganismi è risultata maggiormente inibita in presenza dei film SBC. Inoltre, i film NEW ed SBC hanno mostrato un'efficacia antimicrobica, nei confronti di entrambi i microrganismi, anche in assenza di ZnO.

I film proteici a base di whey protein, addizionati di ZnO, hanno inibito la crescita di entrambi i batteri mostrando, però, una migliore efficacia nei confronti del batterio Gram positivo, *S. epidermidis*. In assenza di ZnO, invece, non è stato possibile evidenziare nessuna proprietà antimicrobica, contrariamente a quanto rilevato per i film a base di β -glucani.

6. Appendice

Si riportano le tabelle dei valori numerici per il calcolo della larghezza della zona in cui non è avvenuta crescita batterica. Queste tabelle sono riferite al grafico in Figura 4.31 del sottoparagrafo 4.3.2 “Metodo delle strisce parallele” in *E. coli* nel capitolo 4 dei “Risultati”.

(Per facilitare la lettura delle tabelle riportate di seguito, si ricorda che: W = larghezza della zona di inibizione, T = larghezza film e zona di inibizione e D = larghezza film.

	T	D	W
SBC C	2,4	2,2	0,1
	3	2,3	0,35
	3,1	2,4	0,35
	3	2,4	0,3
	2,4	2	0,2
MEDIA			0,26
DEV. STANDARD			0,108397

Tabella 4.4- Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film SBC C

	T	D	W
SBC 0,5%	3,6	2,5	0,55
	3,6	2,5	0,55
	3,6	2,4	0,6
	3,5	2,3	0,6
	3	2,3	0,35
MEDIA			0,53
DEV. STANDARD			0,103682

Tabella 4.5- Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film SBC 0,5% ZnO

	T	D	W
SBC 1%	2,6	2	0,3
	2,9	2,1	0,4
	3	2,2	0,4
	3	2,3	0,35
	2,6	2,3	0,15
MEDIA			0,32
DEV. STANDARD			0,103682

Tabella 4.6 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film SBC 1% ZnO

	T	D	W
SBC 2%	2,9	2,2	0,35
	3	2,2	0,4
	3,2	2,2	0,5
	3,1	2,3	0,4
	2,8	2,3	0,25
MEDIA			0,38
DEV.STANDARD			0,09083

Tabella 4.7 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film SBC 2%ZnO

Sono riportate le tabelle 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11 riferite alla Figura 4.37 nel sottoparagrafo 4.3.2 “Metodo delle strisce parallele” in *S. epidermidis* nel capitolo 4 dei “Risultati”.

Vengono mostrati i valori numerici riferiti alla tipologia di film NEW:

	T	D	W
NEW-C	2,4	2,2	0,1
	2,5	2,2	0,15
	2,5	2,2	0,15
	2,7	2,2	0,25
	2,2	2,2	0
MEDIA			0,13
DEV. STANDARD			0,09083

Tabella 4.8 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film NEW C

	T	D	W
NEW 0,5%	2,6	2,1	0,25
	3,1	2,1	0,5
	2,9	2,1	0,4
	3,3	2,1	0,6
	2,8	2,1	0,35
MEDIA			0,42
DEV. STANDARD			0,135093

Tabella 4.9 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film NEW 0,5% ZnO

	T	D	W
NEW 1%	2,7	2,2	0,25
	3,2	2,2	0,5
	3,1	2,2	0,45
	3,2	2,2	0,5
	3	2,2	0,4
MEDIA			0,42
DEV. STANDARD			0,103682

Tabella 4.10 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film NEW 1% ZnO

	T	D	W
NEW 2%	3,4	2,3	0,55
	3,7	2,3	0,7
	4,1	2,3	0,9
	3,9	2,3	0,8
	4,6	2,3	1,15
MEDIA			0,82
DEV. STANDARD			0,225278

Tabella 4.11 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film NEW 2% ZnO

Per la tipologia di film SBC sono riportati i valori numerici utili per il calcolo della zona inibita mostrati nel grafico in Figura 4.38 nel sottoparagrafo 4.3.2 “Metodo delle strisce parallele” in *S.epidermidis* nel capitolo 4 dei “Risultati” nelle Tabelle 4.12, 4.13, 4.14 e 4.15.

	T	D	W
SBC C	3,5	2,4	0,55
	4,1	2,4	0,85
	4,2	2,4	0,9
	4	2,4	0,8
	3,7	2,4	0,65
MEDIA			0,75
DEV. STANDARD			0,145774

Tabella 4.12- Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film SBC C

	T	D	W
SBC 0,5%	4,4	2,2	1,1
	5	2,3	1,35
	5,8	2,2	1,8
	5	2,2	1,4
	5,5	2,2	1,65
MEDIA			1,46
DEV. STANDARD			0,272489

Tabella 4.13 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film SBC 0,5% ZnO

	T	D	W
SBC 1%	3,7	2,2	0,75
	4,2	2,2	1
	4	2,2	0,9
	4,1	2,1	1
	3,6	2	0,8
MEDIA			0,89
DEV. STANDARD			0,114018

Tabella 4.14 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film SBC 1% ZnO

	T	D	W
SBC 2%	4,4	2,1	1,15
	4,8	2,1	1,35
	4,8	2,1	1,35
	5	2,2	1,4
	4,1	2,2	0,95
MEDIA			1,24
DEV. STANDARD			0,188414

Tabella 4.15 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film SBC 2% ZnO

Nelle Tabelle 4.16 e 4.17 sono riportati i valori numerici per il calcolo della zona inibita mostrati nel grafico in Figura 4.50 nel paragrafo 4.4.3 “Test antimicrobico su film proteici (Metodo strisce parallele)”

	T	D	W
WPC 2% lato chiaro	2,6	2,2	0,2
	2,5	2,2	0,15
	2,7	2,3	0,2
	2,6	2,2	0,2
	2,8	2,3	0,25
MEDIA			0,2
DEV. STANDARD			0,03535534

Tabella 4.16 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film WPC 2% ZnO lato chiaro

	T	D	W
WPC 2% lato scuro	2,3	2,3	0
	2,4	2,1	0,15
	2,7	2,2	0,25
	2,9	2,2	0,35
	2,5	2,3	0,1
MEDIA			0,17
DEV. STANDARD			0,13509256

Tabella 4.17 - Valori numerici per il calcolo della larghezza delle zone di inibizione per il film WPC 2% ZnO lato scuro

7. Bibliografia

- Abae, A., Mohammadian, M. and Jafari, S. M. (2017) 'Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, 70(October), pp. 69–81. doi: 10.1016/j.tifs.2017.10.011.
- Adamian, A. A. *et al.* (2004) '[Development of new biologically active dressings and methodology of their use].', *Khirurgiia*, (12), pp. 10–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699950>.
- Bosco, F. *et al.* (2013) 'Thermal stability and flame resistance of cotton fabrics treated with whey proteins', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 94(1), pp. 372–377. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.12.075.
- Bruni, N. *et al.* (2016) 'Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine', *Molecules*, 21(6). doi: 10.3390/molecules21060752.
- Cagri, A., Ustunol, Z. and Ryser, E. T. (2001) 'Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids', *Journal of Food Science*, 66(6), pp. 865–870. doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15188.x.
- Chinnu, K. *et al.* (2015) 'Antimicrobial and antifungal activity of isolated betaglucan from chroococcus', (January).
- Dev, V. R. G. *et al.* (2009) 'Dyeing and antimicrobial characteristics of chitosan treated wool fabrics with henna dye', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 75(4), pp. 646–650. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.09.003.
- Elgayyar, M. *et al.* (2001) 'Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants against Selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms', *Journal of Food Protection*, 64(7), pp. 1019–1024. doi: 10.4315/0362-028X-64.7.1019.
- Farjana, A., Zerín, N. and Kabir, M. S. (2014) 'Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria', *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(S2), pp. S920–S923. doi: 10.1016/S2222-1808(14)60758-1.
- Fernández-Pan, I., Royo, M. and Ignacio Maté, J. (2012) 'Antimicrobial Activity of Whey Protein Isolate Edible Films with Essential Oils against Food Spoilers and Foodborne Pathogens', *Journal of Food Science*, 77(7). doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02752.x.
- Freimund, S. *et al.* (2003) 'A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Carbohydrate Polymers*, 54(2), pp. 159–171. doi: 10.1016/S0144-8617(03)00162-0.
- Gilbert, V. *et al.* (2005) 'Characterization and evaluation of whey protein-based biofilms as substrates for in vitro cell cultures', *Biomaterials*, 26(35), pp. 7471–7480. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.085.
- Gutha, Y. *et al.* (2017) 'Antibacterial and wound healing properties of chitosan/poly(vinyl alcohol)/zinc oxide beads (CS/PVA/ZnO)', *International Journal of Biological*

- Macromolecules*. Elsevier B.V., 103, pp. 234–241. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.020.
- Heinlaan, M. *et al.* (2008) ‘Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*’, *Chemosphere*, 71(7), pp. 1308–1316. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.047.
- Jaehrig, S. C. *et al.* (2008) ‘Antioxidative activity of (1→3), (1→6)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media’, *LWT - Food Science and Technology*, 41(5), pp. 868–877. doi: 10.1016/j.lwt.2007.06.004.
- Kofuji, K. *et al.* (2010) ‘Preparation and evaluation of a novel wound dressing sheet comprised of β-glucan-chitosan complex’, *Reactive and Functional Polymers*. Elsevier Ltd, 70(10), pp. 784–789. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2010.07.014.
- Kumar, R. *et al.* (2017) ‘Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review’, *Ceramics International*, 43(5), pp. 3940–3961. doi: 10.1016/j.ceramint.2016.12.062.
- Liu, X. Y. *et al.* (2008) ‘A new isolation method of β-d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*’, *Food Hydrocolloids*, 22(2), pp. 239–247. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.11.008.
- Liu, Y. *et al.* (2009) ‘Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7’, *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), pp. 1193–1201. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04303.x.
- Mogoşanu, G. D. and Grumezescu, A. M. (2014) ‘Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing’, *International Journal of Pharmaceutics*, 463(2), pp. 127–136. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015.
- Mohd Omar, F., Abdul Aziz, H. and Stoll, S. (2014) ‘Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid’, *Science of The Total Environment*, 468–469, pp. 195–201. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.044.
- Mollea, C., Marmo, L. and Bosco, F. (2013) ‘Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry’, in *Food Industry*. doi: 10.5772/53159.
- Morgan, K. R. and Ofman, D. J. (1998) ‘Glucagel, a gelling β-glucan from barley’, *Cereal Chemistry*, 75(6), pp. 879–881. doi: 10.1094/CCHEM.1998.75.6.879.
- Ncube, N. S. *et al.* (2008) ‘Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin : current methods and future trends’, *African Journal of Biotechnology*, 7(12), pp. 1797–1806. doi: 10.4314/ajb.v7i12.58804.
- Ortega-Requena, S. and Rebouillat, S. (2015) ‘Retracted Article: Bigger data open innovation: potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry’, *Green Chem.*, 17(12), pp. 5100–5113. doi: 10.1039/C5GC01428J.
- Pasquet, J. *et al.* (2014) ‘The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide’, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier B.V., 457(1), pp. 263–274. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.05.057.
- Pasquet, J. *et al.* (2015) ‘Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients’, *International Journal of Pharmaceutics*.

- Elsevier B.V., 479(1), pp. 88–95. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.031.
- Pawar A. (2017) ‘Traditional Adhesive Dressings Market 2017 Research Report Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast Opportunities to 2021’ *Newshawk Time*. <http://newshawktime.com/traditional-adhesive-dressings-market-2017-research-report-analysis-size-share-growth-trends-and-forecast-opportunities-to-2021/>
- Qin, Y. (2001) ‘Advanced wound dressings’, *Journal of the Textile Institute*, 92(2), pp. 127–138. doi: 10.1080/00405000108659563.
- Rajendra, R. *et al.* (2010) ‘Use of zinc oxide nano particles for production of antimicrobial textiles’, *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2(1), pp. 202–208. doi: 10.4314/ijest.v2i1.59113.
- Razzaq, H. A. A. *et al.* (2016) ‘Barley β -glucan-protein based bioplastic film with enhanced physicochemical properties for packaging’, *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 58, pp. 276–283. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.03.003.
- Rocha, M. *et al.* (2013) ‘Antimicrobial films- a review’, *Microbial Pathogens and Strategies for Combating them: Science, Technology and Education*, pp. 23–31.
- Rondanelli, M., Opizzi, A. and Monteferrario, F. (2009) ‘[The biological activity of beta-glucans].’, *Minerva medica*, 100(3), pp. 237–245. Available at: <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571787>.
- Rop, O., Mlcek, J. and Jurikova, T. (2009) 'Beta-glucans in higher fungi and their health effects', *Nutrition reviews*, 67, 624-631.
- Sathianarayanan, M. P. *et al.* (2010) ‘Antibacterial finish for cotton fabric from herbal products’, *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 35(1), pp. 50–58.
- Seydim, A. C. and Sarikus, G. (2006) ‘Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils’, *Food Research International*, 39(5), pp. 639–644. doi: 10.1016/j.foodres.2006.01.013.
- Simões, D. *et al.* (2018) ‘Recent advances on antimicrobial wound dressing: a review’, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier, 127(December 2017), pp. 130–141. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.02.022.
- Simoncic, B. and Tomsic, B. (2010) ‘Structures of Novel Antimicrobial Agents for Textiles - A Review’, *Textile Research Journal*, 80(16), pp. 1721–1737. doi: 10.1177/0040517510363193.
- Teufel, L. *et al.* (2006) ‘Testing for Antimicrobial Activity in Textiles – Quick Overview’, 85, pp. 1–4.
- Tricoli, F., (2012) 'Valutazione dell'impiego di proteine del siero di latte',. Politecnico di Torino Tesi specialistica in Ingegneria chimica, aa 2011/2012.
- Zaika, L. L. (1988) ‘Spices and Herbs: Their Antimicrobial Activity and Its Determination’, *Journal of Food Safety*, 9(2), pp. 97–118. doi: 10.1111/j.1745-4565.1988.tb00511.x.
- Zhong, W. (2015) ‘Efficacy and toxicity of antibacterial agents used in wound dressings’, *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 34(1), pp. 61–67. doi: 10.3109/15569527.2014.890939.

Zhu, F., Du, B. and Xu, B. (2016) 'A critical review on production and industrial applications of beta-glucans', *Food Hydrocolloids*, pp. 275–288. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.07.003.

8. Ringraziamenti

Prima di tutto vorrei ringraziare la Professoressa Bosco, relatore di questa tesi, per l'aiuto e per la disponibilità donatami in questo periodo oltre che per la grande fiducia accordatami e per ciò che già nei suoi corsi mi ha saputo insegnare e trasmettere.

Ringrazio la dottoressa Chiara Mollea, che, oltre ad avermi guidato nella stesura di questo lavoro, mi ha trasmesso la passione e l'entusiasmo affinché la tesi prendesse forma giorno dopo giorno.

Ringrazio tutti i tesisti e il personale del laboratorio che hanno fatto in modo che il tempo passasse veloce e che hanno condiviso con me questi mesi di lavoro rallegrandomi quando ero giù di morale.

Un sentito e doveroso grazie alla parte più importante della mia vita, la mia famiglia, che ha reso possibile tutto questo: sostegno economico e morale senza il quale non avrei mai raggiunto questo importante traguardo.

Un ringraziamento speciale va a voi, amici oltre che compagni di studio, che mi avete accolto con voi nel periodo più buio di questo percorso e mi avete spronato in modo che non mollassi mai: ad Elena, Katia, Sasi, Lucrezia e Andrea.

Un enorme grazie anche a coloro che hanno iniziato con me questo percorso dalla triennale: avete reso divertente questi anni universitari, grazie soprattutto a Lorenzo e Jacopo, compagni di "ultima fila", senza di loro le lezioni sarebbero state terribilmente noiose.

Grazie a voi, amici esterni al politecnico, che avete sempre creduto in me nonostante fossi la "regina del pessimismo" e non mi avete mai fatto mancare il divertimento e la compagnia anche quando tutto sembrava andare male: ad Elena, Sofia, Barbara, Cristina, Erica, Guido, Federica.

Ad Alessandro e Martina, per tutti i weekend passati a casa loro a prendere ripetizioni per qualsiasi materia, per il disturbo arrecatoli e per il conforto pre-esame. Senza di loro probabilmente starei ancora cercando di passare gli esami di Analisi 1 e di informatica.

Ringrazio le mie compagne di squadra, che, dopo una giornata stressante o dopo un esame, sono state sempre fonte di aiuto e di distrazione. Grazie anche alla pallavolo, sfogo perfetto che mi ha permesso di conoscere persone fantastiche e a farmi divertire dopo delle giornate pesanti.

Grazie a me stessa, che non ho mai mollato, pur avendo sempre avuto una folle paura di fallire.

Ultimo ma non per importanza, vorrei ringraziare Mattia, mio compagno di viaggi e di avventura, che, mi ha accompagnato in giro per l'Europa e per il mondo con amore affinché la carriera universitaria non rimanesse piatta e infelice. Dal panico del mio primo esame è stato

(quasi) sempre accanto a me; colui che mi ha insegnato a cavarmela da sola e che mi ha sempre riportato con i piedi per terra. Con la speranza che continui a fare tutto ciò a lungo: GRAZIE.

Sperando che questo traguardo sia un punto di partenza e non soltanto un punto d'arrivo.