

POLITECNICO DI TORINO

Facoltà di Ingegneria

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Biomedica**

Tesi di Laurea Magistrale

**Sintesi e caratterizzazione di rivestimenti antibatterici
a base di oli essenziali**



Relatori

Prof. Silvia Spriano
Dott. Martina Cazzola
Dott. Sara Ferraris

Candidato

Francesco Gabriele RUGGIO

Dicembre 2018

A mia zia Rosina

So che nella vita mi hai amato e sostenuto...

So che nei ricordi sbiaditi della tua malattia

hai conservato sempre traccia di me...

So che ora, oltre il cielo infinito,

mi guardi e sorridi!

INDICE

Introduzione.....	4
Capitolo 1: Proprietà antibatteriche e antifungine degli oli essenziali .6	.6
1.1 Biofilm: formazione e sviluppo	6
1.2 Funghi	8
1.3 Meccanismi di resistenza del biofilm	9
1.4 Gli oli essenziali: generalità	10
1.5 Gli oli essenziali: composizione	10
1.6 Gli oli essenziali: attività antibatterica e antifungina	12
Bibliografia.....	21
Capitolo 2: Tossicità e citocompatibilità degli oli essenziali.....	24
2.1 Misurazioni della tossicità	31
2.1.1 Test di citotossicità	31
2.1.2 Tossicità orale acuta	32
2.1.3 Tossicità dermica acuta	33
Bibliografia.....	37
Capitolo 3: Rivestimenti antibatterici per dispositivi medici	39
3.1 Superfici anti – adesive, batterio – repellenti e battericide	40
3.1.1 Approcci basati sulla modifica della chimica superficiale	42
3.1.2 Approcci basati sulla modifica della topografia superficiale	45
3.2 Rivestimenti basati sul rilascio di agenti antimicrobici	45
3.2.1 Modalità di deposizione	46
3.2.2 Cinetica di rilascio	47
3.2.3 Approcci passivi e attivi	47
3.3 Molecole che interferiscono con il quorum sensing	48
3.4 Nanoparticelle	49

3.5 Materiali bio – ispirati	50
3.5.1 Superfici superidrofobiche ispirate alla natura	50
3.5.2 Peptidi antimicrobici	51
3.5.3 Enzimi batteriolitici.....	52
3.5.4 Rivestimenti basati sugli oli essenziali.....	52
3.6 Legislazione relativa ai dispositivi medici con agenti antimicrobici	54
3.6.2 Normative riguardanti i dispositivi medici	55
3.6.2 Normative riguardanti gli oli essenziali	57
Bibliografia.....	58

Capitolo 4: Materiali e metodi 62

4.1 Preparazione dei campioni in Ti6Al4V e acciaio 316L	62
4.2 Funzionalizzazione e coating con olio essenziale di mentha piperita di Pancalieri	64
4.3 Funzionalizzazione con trans – cariofillene	65
4.4 Rilascio in acqua	66
4.5 Influenza della rugosità superficiale	67
4.6 Resistenza alla pulizia.....	67
4.7 Microscopio ottico	68
4.8 Misura dell’angolo di contatto	68
4.9 XPS (X-ray photoelectron spectroscopy).....	69
4.10 FTIR (Fast Fourier transform infrared spectroscopy)	69
4.11 Analisi gas – cromatografica	70
4.12 Microscopia a fluorescenza	70
4.13 Tape test	71
Bibliografia.....	73

Capitolo 5: Risultati 74

5.1 Osservazioni macroscopiche relative ai campioni rivestiti dal coating di olio essenziale di mentha piperita di Pancalieri	74
5.2 Misura dell’angolo di contatto	75

5.3 XPS	75
5.4 FTIR	79
5.4.1 FTIR: confronto tra i campioni rivestiti con e senza distacco	89
5.4.2 FTIR: confronto tra i campioni funzionalizzati con trans- cariofillene con e senza distacco	90
5.4.3 FTIR: confronto tra i campioni funzionalizzati con e senza distacco	92
5.5 Analisi gas – cromatografica	93
5.6 Microscopia a fluorescenza	94
5.7 Tape test	96
5.8 Resistenza alla pulizia	104
5.8.1 FTIR	105
5.8.2 Tape test	107
Bibliografia.....	108
Conclusioni.....	109

INTRODUZIONE

I dispositivi medici – impiantabili/invasivi e non impiantabili – sono scientificamente esposti al rischio di contaminazione batterica, seguita dalla formazione di biofilm a cui è associata l'insorgenza di infezioni che non solo ostacolano il corretto funzionamento del dispositivo ma, soprattutto, possono aggredire il paziente arrecando danni più o meno gravi alla sua salute. Oltre all'impatto epidemiologico (morbilità e mortalità), questo problema ha, altresì, una ricaduta economica sui servizi e sui costi della sanità pubblica (perdita di vite, prolungamento delle degenze, maggiore utilizzo di procedure diagnostiche, perdita di giornate lavorative).

Nasce, da qui, la necessità di sviluppare strategie efficaci e preventive, di attivare una costante azione di vigilanza in modo da eliminare o minimizzare il pericolo infettivo, facendo sì che il dispositivo rimanga allo stesso tempo funzionale e possa contribuire al beneficio e tutela della salute del paziente.

I metodi tradizionali sono basati sull'efficacia della terapia antibiotica che, indubbiamente, ha riscosso notevole successo in vista dei risultati ambiti; tuttavia, con il tempo, l'abuso di questo approccio, dato dall'eccessivo e a volte scorretto utilizzo, ha portato alla manifestazione di problemi collaterali e alla graduale perdita di validità terapeutica, correlate alla diffusione della resistenza batterica.

Il presente lavoro, nato nel contesto di studio dei bio – materiali, è stato sviluppato nell'ottica ed esigenza di studiare e promuovere metodologie scientifiche alternative che possano risolvere il problema delle infezioni associate ai dispositivi medici.

Una particolare attenzione è stata rivolta all'utilizzo che, negli ultimi decenni, è stato fatto degli oli essenziali (OE) che, date le loro proprietà antibatteriche, antifungine e antiossidanti, hanno costituito un approccio innovativo al fine di produrre rivestimenti antibatterici applicabili in campo biomedico. Ciononostante, pur essendo prodotti naturali che godono di un relativo grado di sicurezza, un impiego inappropriato può causare potenziali pericoli, per cui, prima dell'applicazione di un olio essenziale in clinica, è indispensabile lo studio per valutarne l'eventuale tossicità, gli effetti collaterali e le possibili interazioni con l'organismo animale e umano.

L'obiettivo della tesi è quello di testare e caratterizzare il rivestimento a base di olio essenziale di *mentha piperita* di Pancalieri su differenti tipi di materiali: acciaio, lega di titanio e la stessa lega trattata con processo chimico brevettato, per valutarne l'uso nella produzione di dispositivi medici con proprietà antibatteriche.

Il rivestimento con olio essenziale è stato ottenuto tramite due differenti tecniche: la prima si basa sulla polimerizzazione diretta dell'olio sulla superficie del campione, la seconda riguarda la funzionalizzazione in una soluzione con il 50% di olio essenziale con etanolo. Quest'ultimo trattamento è stato svolto per funzionalizzare la superficie della lega di titanio trattata chimicamente con trans - cariofillene, un componente minoritario dell'olio, risultato molto affine a questo tipo di substrato.

È stata valutata la stabilità del *coating* per diversi tempi di rilascio in acqua.

La caratterizzazione superficiale è stata eseguita mediante differenti analisi: spettroscopia FTIR, spettroscopia XPS, microscopia a fluorescenza, misura dell'angolo di contatto per stimare bagnabilità, *tape test* per quantificare il grado di adesione del rivestimento.

Sono stati svolti testati differenti lavaggi per valutare la resistenza alla pulizia del *coating*.

La tesi è articolata in cinque capitoli: il primo capitolo illustra le fasi di formazione e di sviluppo del biofilm e i relativi meccanismi di resistenza batterica e introduce le generalità degli oli essenziali, facendo riferimento alla loro composizione e alle proprietà antibatteriche e antifungine che li contraddistinguono.

Nel secondo capitolo è affrontato la disamina della tossicità associata all'utilizzo degli oli essenziali, evidenziando i possibili effetti collaterali.

Il terzo capitolo presenta una panoramica dei principali metodi di progettazione per l'ottenimento di superfici antibatteriche per i dispositivi medici, congiuntamente alla considerazione delle normative che regolano i prodotti trattati.

Nel quarto capitolo sono riportati i materiali e i metodi utilizzati per realizzare i rivestimenti sui campioni di materiale differente, i metodi di caratterizzazione superficiale dei campioni ottenuti e i test antibatterici svolti.

Infine, nel quinto sono esposti e discussi i risultati ottenuti.

A seguito dello studio e dell'indagine svolta, vengono riportate le relative conclusioni.

Capitolo 1

Proprietà antibatteriche e antifungine degli oli essenziali

1.1 Biofilm: formazione e sviluppo

L'adesione batterica sulla superficie di un *device*, con successiva formazione di biofilm batterico, è una delle principali problematiche nell'applicazione dei dispositivi medici.

I biofilm sono comunità batteriche strutturate, racchiuse in matrice extracellulare autoprodotta e adesiva, che tendono a svilupparsi principalmente su superfici inerti o su tessuto morto, ma ci sono casi in cui crescono su tessuto vivente. [1] La loro evoluzione in generale è lenta e può avvenire in una o più sedi; il che rende difficile la prevenzione in quanto non ci sono fin da subito sintomi manifesti e rilevabili [2].

La formazione del biofilm prevede i seguenti passaggi: adesione superficiale, aggregazione cellulare, crescita del biofilm, maturazione e dispersione come riportato in figura 1.1.

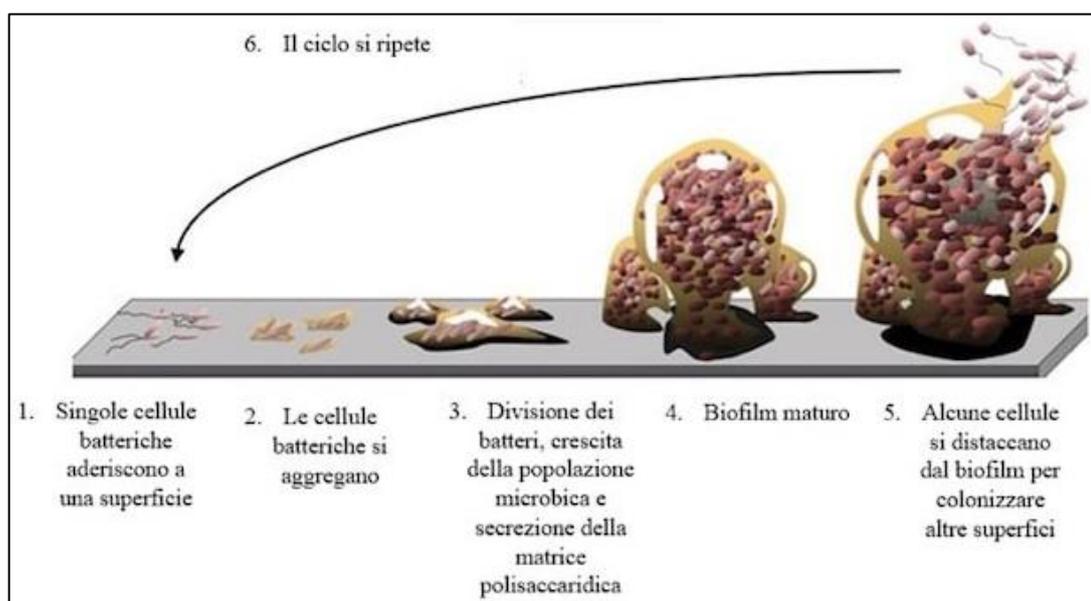


Figura 1.1: Stadi dell'evoluzione del biofilm [3].

L'adesione batterica è stata separata in due fasi: primaria, adesione reversibile e dinamica, talvolta indicata come *docking*, e secondaria, adesione irreversibile e completa, talvolta indicata come ancoraggio [4].

Alcuni fattori facilitano il primo processo di adesione, quali incremento delle forze di taglio, motilità batterica e interazioni elettrostatiche tra il microrganismo e la superficie. [5]

Sulla base di osservazioni esperite, a proposito dello sforzo di taglio, è stato individuato, per sforzi di taglio basso, un modello di adesione a singola cellula e uno di adesione a grappolo conseguentemente all'incremento del taglio. Quindi gli aggregati formati aumentano progressivamente di dimensione in relazione all'aumento del taglio [6]. Sforzi di taglio elevate comportano la formazione di biofilm più compatti e densi, mentre con sforzi inferiori la struttura diviene più eterogenea, con molti pori e protuberanze [7].

A seguito della fase di adesione, inizia quella di lenta moltiplicazione cellulare; per via di fenomeni interattivi sia con il substrato che tra le cellule stesse, si formano aggregati cellulari che portano alla formazione di micro - colonie [4].

Durante il periodo di crescita, inoltre, i batteri secernono matrice extracellulare che garantisce l'integrità del biofilm e la coesione cellulare.

Un altro elemento fondamentale per lo sviluppo del biofilm è il sistema di comunicazione sviluppato dai batteri al suo interno, noto come *quorum sensing* (QS). Esso si basa sul rilascio, da parte dei batteri, di segnali chimici (autoinduttori), la cui concentrazione aumenta al crescere della densità del biofilm. Superata la soglia di massima concentrazione, si verificano alterazioni nell'espressione genica che portano a una serie di processi fisiologici fino alla completa maturazione del biofilm [5].

Il biofilm maturo è una struttura complessa e multicellulare, ricca di canali che consentono l'apporto di nutrienti e la rimozione dei prodotti di scarto [8], e costituisce una barriera protettiva per i batteri che vivono al suo interno, rendendo difficile l'azione del sistema immunitario e di eventuali trattamenti antibiotici. In altri termini, le cellule batteriche del biofilm rilasciano antigeni che stimolano l'intervento del sistema immunitario dell'ospite, ma spesso gli anticorpi non sono in grado di rimuovere in modo efficace i batteri, per cui possono, a loro volta, arrecare danno ai tessuti circostanti. La terapia antibiotica, oltretutto, può risultare insufficiente per rimuovere ed estirpare completamente il biofilm. Per questo motivo, le infezioni dovute al biofilm, dopo cicli di terapia antibiotica, continuano a

mostrare tipici sintomi ricorrenti finché la popolazione sessile venga rimossa completamente dal corpo [2].

Dopo il raggiungimento della maturazione, il biofilm si disperde, si distaccano di frammenti o singole cellule che possono avviare ulteriori formazioni di biofilm, con conseguente aumento del rischio di infezione persistente e cronica [5].

Ad avviare la dispersione concorrono molteplici fattori comprendenti le variazioni di nutrienti, la temperatura e i livelli di ossigeno, nonché l'intervento di tossine. La presenza di altri microrganismi all'interno del biofilm può influenzare la dispersione attraverso segnali chimici, come i lattoni di acilomoserina, gli acidi grassi diffusibili e i peptidi, coinvolti nella comunicazione batterica [5].

1.2 Funghi

Oltre alle specie batteriche, anche i funghi sono annoverati tra i responsabili dello sviluppo di infezioni di dispositivi medici. Essi possono formare biofilm da soli oppure in combinazione con batteri. L'origine dei biofilm fungini è correlata a funghi patogeni quali *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides* e *Pneumocystis* [9].

Essendo, però, eucarioti, differentemente dai batteri, è molto più complesso combatterne le infezioni in quanto gli agenti antifungini sono spesso tossici anche verso le cellule eucariote dell'organismo ospite [10].

Il meccanismo di formazione e sviluppo del biofilm fungino è molto simile a quello batterico: aderenza delle cellule di lievito alla superficie del dispositivo (fase precoce), formazione di una matrice (fase intermedia), fino ad arrivare ad una definita architettura tridimensionale (fase di maturazione) [11].

L'adesività fungina è correlata con l'azione delle adesine, le quali possono agire tramite meccanismi aspecifici, come legami idrofobici o interazioni elettrostatiche, oppure per mezzo di uno specifico riconoscimento di recettori cellulari, come quelli delle cellule epiteliali o della superficie delle mucose. [12]

Un altro fattore influente sulla patogenicità è il dimorfismo, ovvero la capacità di molti funghi di variare la propria struttura, in modo reversibile, in relazione alle condizioni ambientali, soprattutto in base alla temperatura. Sia i lieviti (es. *Histoplasma*) che le ife (es. *Candida*) possono assumere forme

difficilmente aggredibili dalla fagocitosi oppure in grado di sfuggire alla risposta immunitaria, crescendo all'interno dei macrofagi. [12]

1.3 Meccanismi di resistenza del biofilm

Esistono diversi meccanismi tramite i quali i batteri, all'interno del biofilm, risultano essere molto più resistenti agli agenti antimicrobici di quanto non lo siano nello stato planctonico [5].

Un primo meccanismo di resistenza alle sostanze antibiotiche riguarda l'impossibilità di un agente di penetrare in profondità nel biofilm, la cui matrice extracellulare svolge, in questo caso, un ruolo fondamentale, fungendo da barriera fisico - chimica e limitando drasticamente la diffusione di antibiotici [13].

Una seconda ipotesi riguarda la presenza all'interno del biofilm di 'cellule persistenti', caratterizzate da *slow-growing* o *no-growing*, che forniscono la resistenza agli antibiotici i quali, nel colpire cellule in divisione attiva, diventano poco efficaci [2].

Altri meccanismi riguardano la presenza di pompe di efflusso che, attivamente, provocano la fuoriuscita dell'antibiotico dalla cellula, impedendo che la sua concentrazione sufficientemente efficace per colpire il batterio. Esistono diversi tipi di pompe attive alcune sono specifiche (es. tetracicline, macrolidi, chinoloni), mentre altre sono dette 'multifarmaco', data la loro azione più ampia [14].

Un altro elemento che contribuisce alla resistenza batterica rispetto agli antibiotici e al sistema immunitario dell'organismo ospite è il QS, coinvolto in numerose attività batteriche, quali produzione di biofilm, motilità, resistenza allo stress e virulenza.

Si ritiene, inoltre, che un microambiente alterato all'interno di un biofilm, come l'esaurimento dei nutrienti e la riduzione dei livelli di ossigeno, possa anche ridurre l'efficacia degli agenti antimicrobici [13]. Queste condizioni si verificano principalmente negli strati più profondi e portano ad una riduzione della velocità di crescita batterica, compromettendo l'azione antibiotica.

1.4 Gli oli essenziali: generalità

Gli OE sono complesse miscele di diversi composti aromatici, con varie composizioni e concentrazioni. Essi, a temperatura ambiente, sono generalmente liquidi e incolori, si contraddistinguono per l'odore distintivo e solitamente possiedono una densità inferiore all'unità, un'elevata attività ottica [15] e un indice di rifrazione compreso tra 1,43 e 1,61 [16]. Sono estratti tramite distillazione a vapore (comunemente usata per la produzione commerciale [15]), idro - distillazione o estrazione con solvente [17].

Si ritiene che il termine "olio essenziale" derivi dal nome coniato nel XVI secolo dal riformatore svizzero di medicina, Paracelso von Hohenheim, che chiamò la componente efficace di una medicina *Quinta essentia* [18].

L'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) definisce un olio essenziale come "un prodotto ottenuto per distillazione con acqua o vapore o mediante lavorazione meccanica o tramite distillazione a secco di materiali naturali". (ISO/ D1S9235.2)

Si conoscono circa 3000 OE, di cui circa 300 commercialmente importanti, destinati principalmente al mercato degli aromi e dei profumi. Gli OE sono ottenuti da materiale di origine vegetale (fiori, germogli, semi, foglie, ramoscelli, corteccia, erbe, legno, frutta e radici) e di solito si trovano nei condotti della resina, ghiandole o tricomi delle piante [19].

In natura, gli OE svolgono diversi ruoli importanti: difendono le piante dagli erbivori, conferiscono resistenza ad attacchi microbici, proteggono dagli insetti aggressivi e dannosi, sollecitano l'attrazione di insetti ed animali impollinatori [20].

Date le proprietà biologiche che li caratterizzano - essendo antimicrobici, antivirali, antimutageni, antitumorali, antiossidanti, antinfiammatori, immunomodulanti - gli OE sono suscettibili di potenziale utilizzo nel campo biomedico e alimentare [19]. Infatti, recentemente, sono nati nuovi studi per sfruttare le proprietà degli OE sia come nuovi agenti antibatterici e antifungini onde limitare il rischio di infezioni dovute a microorganismi sempre più aggressivi e farmacoresistenti sia come conservanti degli alimenti.

1.5 Gli oli essenziali: composizione

Gli OE sono miscele complesse e concentrate di sostanze chimiche, costituite da 20 - 100 diversi metaboliti e appartenenti ad una varietà di classi [21]. La

percentuale di componenti degli OE è mutevole ed è determinata da diversi fattori tra cui la posizione geografica, l'ambiente, la fase di maturità e il metodo di estrazione, oltre che correlata alle differenze nell'espletamento delle attività biologiche [20].

I composti che li caratterizzano possono essere suddivisi in due gruppi: gli idrocarburi insaturi (-CH-), costituiti esclusivamente dai terpeni, e i composti ossigenati (-CHO-), tra cui alcoli, aldeidi, chetoni, esteri, fenoli, ossidi; possono essere presenti anche composti contenenti zolfo o azoto, acidi e fenilpropanoidi [22].

I terpeni sono idrocarburi insaturi, ciclici o aciclici, costituiti da multipli dell'unità isoprene ($C_5 H_8$), con varie caratteristiche chimiche e biologiche [23]. Essi sono sintetizzati nel citoplasma delle cellule vegetali attraverso la via dell'acido mevalonico a partire da acetil - coenzima A. I principali terpeni sono i monoterpeni ($C_{10} H_{16}$) e i sesquiterpeni ($C_{15} H_{24}$), le cui strutture si evincono dalla rappresentazione in figura 1.3, ma esistono anche catene più lunghe come diterpeni ($C_{20} H_{32}$), triterpeni ($C_{30} H_{40}$), ecc. [20]

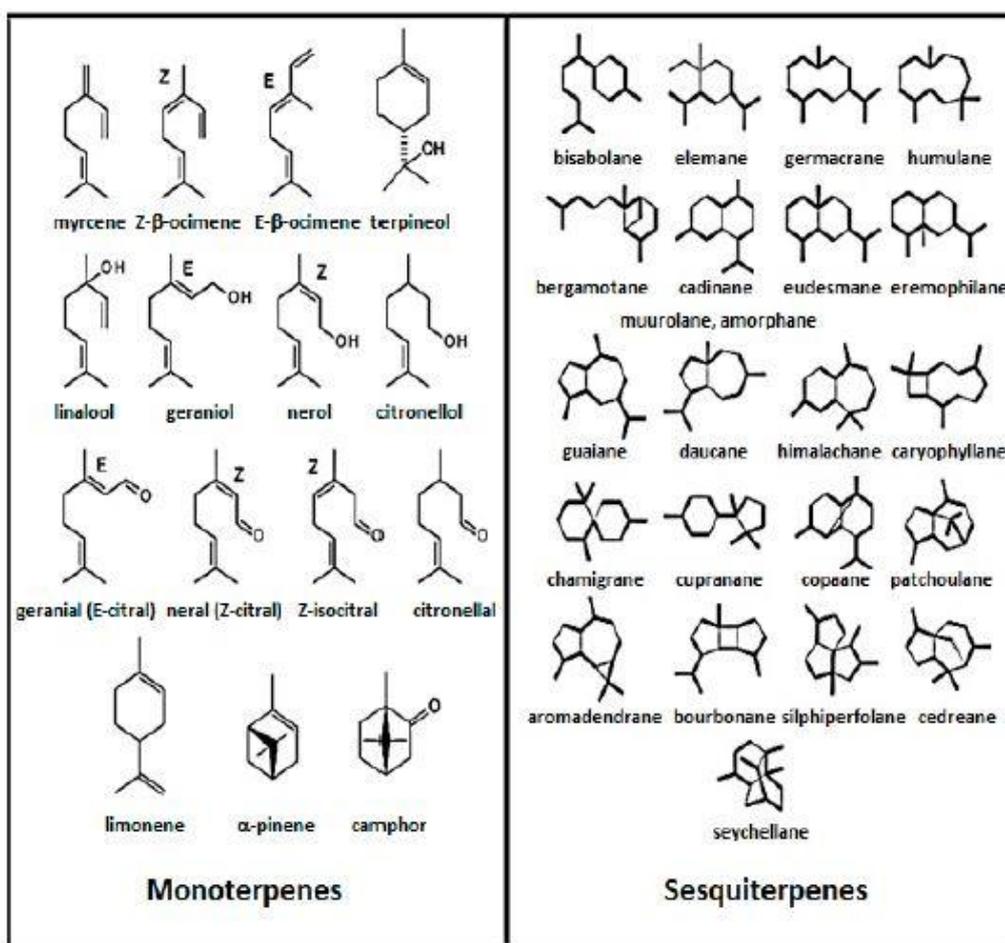


Figura 1.3 Strutture chimiche dei principali monoterpeni e sesquiterpeni [20].

I monoterpeni, ottenuti dall'accoppiamento di due unità di isoprene, costituiscono il 90% degli OE e garantiscono, dunque, la grande varietà strutturale. Alcuni dei principali composti includono monoterpeni idrocarburi (quali limonene, ρ - cymene, α - pinene, e α - terpinene), e monoterpeni ossigenati (come carvacrolo, timolo e canfora) [20].

I sesquiterpeni sono formati da una catena, ottenuta dall'assemblaggio di tre unità di isoprene, la cui estensione della catena aumenta il numero di ciclizzazioni permettendo un'ampia molteplicità di conformazioni. La struttura e la funzione dei sesquiterpeni sono paragonabili a quelle dei monoterpeni [20]. Tra i più rappresentativi ci sono il camazulene, α -bisabololo, β -cariofillene, β -farnesene, cardinene [22].

I terpenoidi sono composti ottenuti dall'aggiunta di gruppi funzionali o riarrangiamento dei terpeni; tra i più noti timolo, carvacrolo, linalile acetato, linalolo, piperitone, citronella, geraniolo e mentolo [20].

I fenilpropanoidi sono sintetizzati a partire dall'acido shikimico e possiedono una struttura costituita da un'unità fenolica legata ad un'unità propanoica; i più comuni presenti negli OE sono i lattoni, le cumarine e le furanocumarine [24].

Le cumarine, in particolare, rappresentano una classe di composti aromatici aventi in comune la struttura benzopiranic. Quelle più complesse sono le furanocumarine che possono causare fotosensibilità, come nel caso del bergaptene contenuto nell'OE di bergamotto [25].

L'effetto bioattivo dell'OE è dovuto ai componenti principali oppure si ottiene grazie all'azione sinergica di più componenti dell'OE, compresi quelli minori. (Si rimanda al paragrafo 1.4)

1.6 Gli oli essenziali: attività antibatterica e antifungina

L'azione antibatterica degli OE può avere due effetti: batteriostatico, ovvero inibizione della crescita batterica, oppure battericida, con diminuzione del numero di cellule batteriche. Mentre, la prima è reversibile, cioè dopo la neutralizzazione dell'agente i batteri sono nuovamente in grado di riprodursi, al contrario quella battericida è irreversibile, dal momento che, dopo la neutralizzazione, le cellule perdono la loro capacità di riprodursi [15].

I test effettuati per valutare l'azione antimicrobica degli OE sono fatti su popolazioni microbiche e non su singole cellule, quindi ci si trova in condizioni dinamiche con la coesistenza di cellule che si riproducono e altre che sono già morte. Da ciò la difficoltà nel valutare quale dei due effetti l'OE analizzato svolga sul batterio bersaglio [26].

Nella figura 1.4 sono rappresentate le curve di crescita. Il grafico A mette a confronto la curva di crescita normale a) e quelle b) e c) in cui si nota l'effetto batteriostatico che minimizza o annulla la riproduzione batterica. Nel grafico B, invece, sono rappresentate le curve di sopravvivenza marcando l'effetto battericida, infatti passando da d) a f) si può notare come il tasso di mortalità aumenti notevolmente [26].

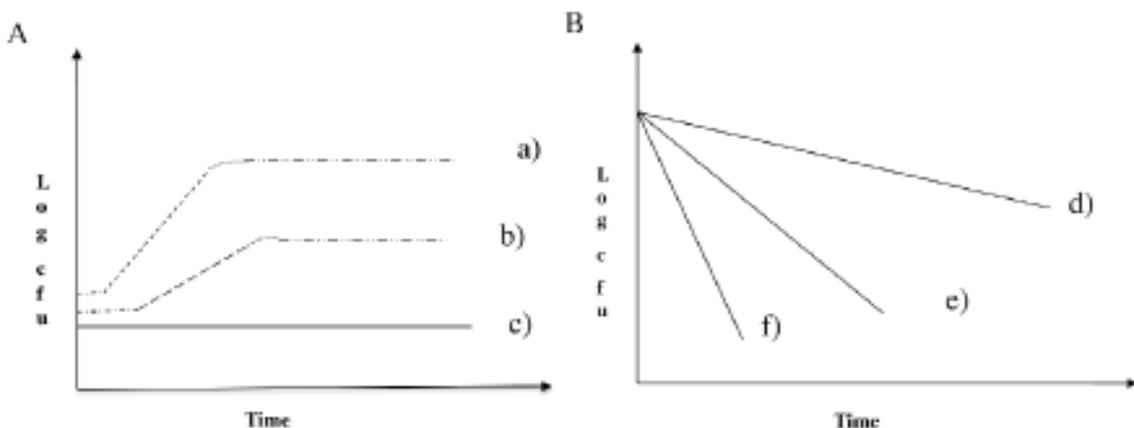


Figura 1.4: curve di crescita (A) e curve di sopravvivenza (B) [26].

I test che di norma si svolgono per valutare le proprietà antimicrobiche possono essere classificati in metodi di diffusione, diluizione o bioautografia [27].

I metodi di diffusione sono basati sull'utilizzo di un *reservoir*, solitamente un disco di carta da filtro, caricato con l'agente antimicrobico da testare, che è collocato su una piastra ricoperta da agar, in cui è inculato il microrganismo di prova. L'agente diffonde attraverso l'agar e svolge la sua azione inibendo la crescita batterica. Dopo l'incubazione, vengono misurati i diametri dell'alone di inibizione formatosi intorno al disco. Questa tecnica può essere usata per ottenere gli antibiogrammi che forniscono una misura qualitativa classificando i batteri come sensibili, intermedi o resistenti all'agente testato. I principali vantaggi sono relativi alla semplicità, a basso costo, la possibilità di verificare enorme numero di microrganismi e agenti antimicrobici, e la facilità di interpretare risultati forniti. Le tecniche di diluizione sono test svolti in agar o in brodo di coltura

(microdiluizione o macrodiluizione) e possono essere utilizzati per valutare quantitativamente l'attività antimicrobica in vitro contro i batteri e i funghi [27,28].

I metodi di diluizione liquida, microdiluizione o macrodiluizione, consistono nella diluizione seriale dell'agente antimicrobico testato in un medium di coltura in provette o in pozzetti, inoculate con il patogeno analizzato e incubate a 37°C per 24h. La torbidità del medium è un indicatore della densità batterica: un medium limpido indica un'efficace attività antimicrobica, al contrario la sua torbidità indica che la crescita del patogeno non è stata inibita adeguatamente [27,28].

I test su agar comportano l'incorporazione di concentrazioni variabili dell'agente in un agar, seguita dall'inoculazione dei batteri. Data la sua velocità e semplicità, metodo agar diluizione è spesso preferito diluizione in brodo [27,28].

La bioautografia è il metodo di rilevazione per i composti antimicrobici nuovi o indefiniti. Viene prima svolta la cromatografia su strato sottile (TLC). La piastra ottenuta è immersa o spruzzata con una sospensione microbica e incubata a 25° per 48h in condizioni umide. Per visualizzare la crescita batterica sono usati, normalmente, sali di tetrazolio (l'attività della deidrogenasi mitocondriale provoca a comparsa di formazano violetto, proporzionale al numero di cellule vive), che vengono spruzzati sul bioautogramma che viene incubato nuovamente per a 25 ° C per 24 h o a 37 ° C per 3 - 4 h [27,28].

Tuttavia, non esistendo un test standardizzato, occorre fare attenzione ad una serie di fattori che possono influenzare e inficiare i risultati di un test, come la composizione del terreno di coltura, i microrganismi testati, il metodo estrattivo, il pH, la solubilità del campione nel terreno di coltura, ecc. [27]. Da qui la necessità di promuovere lo sviluppo e l'attuazione di test standardizzati per la valutazione dell'attività antibatterica degli OE [26].

Come indice di prestazione per il confronto dell'attività antimicrobica dei diversi OE solitamente viene usata la concentrazione inibitoria minima (MIC), la cui definizione tra le pubblicazioni in letteratura risulta diversificata, ragion per cui il confronto tra gli studi non è convergente.

Generalmente la MIC è definita come la concentrazione minima di un composto antimicrobico che inibisce la crescita di un microrganismo [29]. La MIC di un OE non è fissa ma varia in base al ceppo batterico testato e alle condizioni del laboratorio in cui è svolto il test.

A seguire vengono considerati anche alcuni fra i diversi test che ineriscono all'indagine antibatterica sui biomateriali.

Come test antibatterico per biomateriali, sono utilizzabili i metodi di conta batterica diretti, basati sull'utilizzo di camere di conta e di microscopio, tramite il quale vengono visualizzate e contate le cellule.

La camera di Petroff – Hausser è un esempio di camera di conta, consistente in un vetrino in cui è incisa una griglia di dimensioni note. Essa consente, attraverso microscopio ottico, di effettuare il conteggio dei batteri; considerando quelli presenti su ogni cella e moltiplicando per il volume totale del campione si ottiene la stima del numero totale di batteri presenti. [30]

Altri metodi alternativi sono il DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique), basato sull'utilizzo di coloranti fluorescenti (fluoresceina) che permettono di distinguere le cellule vive da quelle morte, e il FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization), che permette un conteggio selettivo tramite l'utilizzo di sonde a fluorescenza. [31]

Un'altra possibilità è la misurazione della biomassa, in cui i microrganismi vengono isolati dalla superficie del campione, per mezzo di filtrazione o centrifugazione, quindi, essiccando e pesando la biomassa, è possibile stimare la quantità di batteri presenti sul substrato [31].

Lo standard ASTM E2149-10, ancora, è un test per determinare l'attività antimicrobica di un agente antibatterico immobilizzato sulla superficie di un biomateriale in condizioni dinamiche, ottenute per effetto di una continua agitazione. I campioni sono aggiunti in una soluzione a basso contenuto di nutrienti di E. Coli e, dopo 1h dal contatto, si procede alla conta dei batteri in vita. [32]

Riprendendo il discorso sugli OE, la loro attività antibatterica non è da attribuire ad un singolo meccanismo d'azione ma ci sono diversi bersagli nella cellula batterica [19].

La principale azione battericida è la destabilizzazione della membrana batterica, effetto che sfrutta la caratteristica idrofobicità degli OE, permette loro di inserirsi nella membrana cellulare e, interagendo con polisaccaridi, acidi grassi e fosfolipidi, aumenta notevolmente la sua permeabilità e fluidità, causando danni significativi alla struttura e la perdita del contenuto intracellulare [15, 17].

Anche se in un primo momento le cellule sono in grado di tollerare una perdita iniziale, senza privazione di vitalità, in seguito essa diventa critica e l'uscita di molecole e/o ioni conduce alla morte della cellula [15]. I batteri, in linea di massima, possono utilizzare pompe ioniche per contrastare questi effetti, evitando la morte cellulare, ma per far ciò utilizzano una grande quantità di energia e la crescita batterica viene comunque compromessa [33].

A causa dell'alterazione della membrana, molti processi vitali sono gravemente a rischio, come l'energia per processi di conversione, l'elaborazione dei nutrienti, la sintesi di macromolecole strutturali e la secrezione di molti enzimi chiave per la crescita. Una membrana alterata non è più in grado di garantire la corretta omeostasi del pH per via dei danni subiti e la notevole permeabilità non consente di bloccare la fuoriuscita ionica. In cellule batteriche esposte a OE è stata verificata una significativa riduzione del pH [26].

Dato il coinvolgimento della parete cellulare nella produzione di ATP, un'ulteriore conseguenza della sua alterazione è lo squilibrio ATP intracellulare e quella esterna. La diminuzione dell'ATP intracellulare può avvenire anche per idrolisi dovuta alla perdita di fosfato inorganico attraverso la membrana resa permeabile o a causa degli sforzi compiuti dalla cellula per recuperare il gradiente elettrochimico per estrusione di protoni spinti dalla ATPasi, stabilendo un aumento di idrolisi. [26]

Anche la configurazione chimica dei singoli costituenti dell'olio e la presenza di gruppi funzionali hanno una notevole incidenza sui meccanismi d'azione nell'attività antimicrobica [19].

I composti fenolici, come carvacrolo e timolo, posseggono effetti antimicrobici simili, ma si comportano in modo diverso in base alle posizioni di uno o più gruppi funzionali nei confronti di G+ o G- batteri [19]. Di particolare importanza il gruppo ossidrilico e la presenza di elettroni delocalizzati spesso determinano il livello della loro attività antimicrobica dei composti fenolici sui batteri diversi [33].

Essendo l'OE un mix multicomponente, è necessario tenere conto delle interazioni che possono avvenire tra i costituenti e gli effetti che ne derivano.

Si parla di effetto 'additivo' quando la combinazione è uguale alla somma dei singoli effetti; di 'antagonista' quando l'effetto di un costituente è inferiore quando vengono testati insieme rispetto a quando vengono applicati

separatamente; 'sinergico' se incrementato a seguito della combinazione delle sostanze, in questo caso si parla di effetto sinergico [15].

Alcuni studi hanno dimostrato che l'uso OE, nella sua interezza, fornisce un effetto maggiore di quello delle principali componenti usate insieme [15]. Ciò suggerisce, quindi, che anche le componenti minori sono indispensabili per l'attività e permettono un effetto sinergico.

Un altro meccanismo di antibattericità riguarda l'azione degli OE e dei suoi componenti con il QS, il sistema di comunicazione tra le cellule batteriche all'interno del biofilm. Esso è densità - dipendente e si basa sull'accumulo di molecole segnale diffusibili rilasciate dai batteri, note come autoinduttori [34].

Ci sono tre tipi principali di autoinduttori che vengono utilizzati per il QS, ovvero lattoni acil - omo-serina (AHL), piccoli polipeptidi e autoinduttore-2 (AI-2). I batteri gram negativi biosintetizzano le AHL; quelli gram positivi usano oligopeptidi modificati come molecole autoinduttrici; invece le AI-2 possono essere prodotte da entrambi i tipi di batteri [33].

Ogni sistema QS è specifico per ciascun batterio, tuttavia è possibile individuare un meccanismo comune composto da tre passaggi: sintesi del segnale, accumulo del segnale e sua rilevazione. Perciò l'OE e/o i suoi componenti dovrebbero agire in uno di questi passaggi per interferire nella comunicazione batterica. Eugenolo e carvacrolo sono i componenti che hanno suscitato maggiore interesse per la loro azione disturbatrice nel QS [33].

Infine, si può osservare un effetto antimicrobico più marcato nei confronti dei batteri gram positivi piuttosto che su quelli gram negativi. Ciò è giustificato dalla differenza strutturale tra queste due tipologie di batteri: i gram positivi presentano una parete cellulare costituita da una membrana lipidica e uno strato superiore spesso costituito da peptidoglicani, facilmente penetrabile dalle molecole idrofobiche dell'olio, i gram negativi, invece, possiedono un involucro avente anche una membrana esterna che circonda la parete cellulare [35] limitante la diffusione dei composti idrofobi attraverso questo rivestimento lipolisaccaride [19].

I funghi, invece, essendo eucarioti e quindi simili all'organismo ospite, sono più difficili da individuare e trattare rispetto alle infezioni batteriche. L'obiettivo principale dell'azione antifungina resta la parete cellulare a causa della sua struttura contenente chitina, assente nelle cellule umane, e perciò resa un bersaglio specifico [20].

La chitina viene sintetizzata con una reazione catalizzata dalla chitina – sintasi ed un elemento indispensabile per la costruzione della parete cellulare. Riuscendo ad inibire questa reazione di polimerizzazione, si è in grado di influire la corretta maturazione della parete cellulare [20].

Un altro composto specifico della membrana è l'ergosterolo che svolge un ruolo importante per il mantenimento dell'integrità e la funzionalità della cellula fungina; l'assenza o la presenza ridotta di questo elemento nelle membrane provoca instabilità osmotica e metabolica della cellula, compromettendo la sua attività infettiva [20].

Come già chiarito per i batteri, anche per i funghi, gli OE ricchi di terpeni o terpenoidi, grazie alla loro natura altamente lipofila e a basso peso molecolare, sono in grado di interrompere la membrana cellulare, causando la morte cellulare o l'inibizione della riproduzione [20].

Alcuni OE possono influenzare la corretta funzionalità dei mitocondri inibendo l'azione delle deidrogenasi mitocondriali, coinvolti nella biosintesi di ATP [20].

Un altro bersaglio per l'azione antifungina sono le pompe di efflusso H⁺ - ATPasi, che svolgono un ruolo centrale nella regolazione del gradiente elettrochimico transmembrana, necessario per l'assorbimento dei nutrienti, nella regolazione del pH intracellulare e nella crescita cellulare dei funghi. Inibendo la loro funzione, si può indurre l'acidificazione intracellulare e la morte della cellula [20].

In tabella 1.1 sono riportati i valori di MIC di alcuni OE testati contro 10 ceppi patogeni (*Acinetobacter baumannii* NCTC 7844, *Aeromonas sobria* ATCC 9071, *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* NCTC 8213, *Escherichia coli*

NCTC 10418, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 11228, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Serratia marcescens* NCTC 1377 e *Staphylococcus aureus* NCTC 6571). Tutti gli oli sono stati sottoposti a test antibatterici seguendo il metodo della microdiluizione seriale. [36]

Tabella 1.1: MIC di oli essenziali selezionati contro 10 differenti microrganismi [36]

Details of plant oils and extracts				Test organism									
Plant species	Common name	Extract type *	Source †	<i>A. baumannii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Aniba rosaeodora</i>	Rosewood	EO	W	0.1 2	0.1 2	0.2 5	0.5	0.1 2	0.5	>2. 0	0.2 5	0.5	0.2 5
<i>Apium graveolens</i>	Celery seed	EO	S	>2. 0	1.0	1.0	2.0	2.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	1.0
<i>Boswellia carterii</i>	Frankincense	EO	R	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	1.0
<i>Cananga odorata</i>	Ylang ylang	EO	FL	1.0	0.5	1.0	2.0	2.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	1.0
<i>Cedrus atlantica</i>	Cedarwood	EO	W	>2. 0	>2. 0	>2. 0	0.5	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0
<i>Citrus aurantifolia</i>	Lime	EO	FR	1.0	1.0	2.0	>2. 0	1.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	2.0
<i>Citrus aurantium</i>	Orange	EO	P	>2. 0	1.0	1.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	2.0
<i>Citrus aurantium</i>	Petitgrain	EO	LT	0.5	0.5	0.2 5	2.0	0.2 5	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	0.5
<i>Citrus aurantium</i> var. bergamia	Bergamot	EO	P	2.0	2.0	1.0	>2. 0	1.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0
<i>Citrus limon</i>	Lemon	EO	P	>2. 0	1.0	2.0	2.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	2.0
<i>Citrus x paradisi</i>	Grapefruit	EO	P	>2. 0	1.0	1.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0
<i>Citrus reticulata</i> var. madurensis	Mandarin	EO	P	>2. 0	>2. 0	2.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0
<i>Commiphora myrrha</i>	Myrrh	EO	R	>2. 0	>2. 0	>2. 0	0.2 5	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	0.5
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriander	EO	S	0.2 5	0.2 5	0.2 5	1.0	0.2 5	0.5	>2. 0	1.0	0.5	0.2 5
<i>Cucurbita pepo</i>	Pumpkin	FO	S	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cypress	EO	LT	>2. 0	>2. 0	>2. 0	1.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	2.0
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemongrass	EO	L	0.0 3	0.1 2	0.0 6	0.1 2	0.0 6	0.2 5	1.0	0.2 5	0.2 5	0.0 6
<i>Cymbopogon martinii</i>	Palmarosa	EO	L	0.1 2	0.1 2	0.0 6	0.2 5	0.0 6	0.2 5	>2. 0	0.5	0.2 5	0.1 2
<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronella	EO	L	0.2 5	nd	0.1 2	1.0	0.5	1.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	0.2 5
<i>Daucus carota</i>	Carrot seed	EO	S	>2. 0	>2. 0	2.0	2.0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	>2. 0	1.0
<i>Eucalyptus polybractea</i>	Eucalyptus	EO	LT	1.0	0.5	1.0	2.0	1.0	2.0	>2. 0	>2. 0	1.0	2.0
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fennel	EO	S	1.0	0.5	0.5	>2. 0	0.5	>2. 0	>2. 0	1.0	>2. 0	0.2 5
<i>Gaultheria procumbens</i>	Wintergreen	EO	H	0.2 5	0.2 5	0.2 5	>2. 0	0.5	1.0	>2. 0	0.5	0.5	2.0

<i>Juniperus communis</i>	Juniper	EO	B	>2· 0	1·0	2·0	2·0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	2·0	>2· 0	2·0
<i>Lavandula angustifolia</i>	French lavender	EO	FL	1·0	nd	0·5	>2· 0	0·5	2·0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	1·0
<i>Lavandula angustifolia</i>	Tasmanian lavender	EO	FL	0·5	0·5	0·2 5	2·0	0·2 5	>2· 0	>2· 0	>2· 0	2·0	1·0
<i>Macadamia integrifolia</i>	Macadamia	FO	NT	>2· 0									
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Tea tree	EO	LT	0·2 5	0·5	0·5	2·0	0·2 5	0·5	>2· 0	0·5	0·5	0·5
<i>Melaleuca cajuputi</i>	Cajuput	EO	LT	1·0	1·0	1·0	2·0	1·0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	2·0	1·0
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Niaouli	EO	LT	0·2 5	0·2 5	0·2 5	1·0	0·2 5	0·5	>2· 0	0·5	0·5	0·5
<i>Mentha x piperita</i>	Peppermint	EO	H	0·5	nd	0·5	2·0	0·5	1·0	>2· 0	1·0	2·0	1·0
<i>Mentha spicata</i>	Spearmint	EO	H	0·2 5	0·2 5	0·1 2	2·0	0·2 5	0·5	>2· 0	0·5	0·2 5	0·2 5
<i>Ocimum basilicum</i>	Basil	EO	H	0·5	0·5	0·5	>2· 0	0·5	2·0	>2· 0	2·0	>2· 0	2·0
<i>Oenothera biennis</i>	Evening primrose	FO	S	>2· 0									
<i>Origanum majorana</i>	Marjoram	EO	H	0·2 5	0·2 5	0·2 5	2·0	0·2 5	0·5	>2· 0	0·5	0·5	0·5
<i>Origanum vulgare</i>	Oregano	EO	H	0·1 2	0·1 2	0·1 2	0·2 5	0·1 2	0·1 2	2·0	0·1 2	0·2 5	0·1 2
<i>Pelargonium graveolens</i>	Geranium	EO	H	0·2 5	0·2 5	0·1 2	0·5	0·2 5	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	0·2 5
<i>Pimpinella anisum</i>	Aniseed	EO	S	0·5	0·2 5	0·5	2·0	0·5	>2· 0	>2· 0	2·0	1·0	0·2 5
<i>Pimenta racemosa</i>	Bay	EO	L	0·1 2	0·1 2	0·1 2	0·5	0·1 2	0·2 5	1·0	0·2 5	0·2 5	0·2 5
<i>Pinus sylvestris</i>	Pine	EO	N	2·0	2·0	2·0	>2· 0	2·0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0
<i>Piper nigrum</i>	Black pepper	EO	B	>2· 0	>2· 0	>2· 0	1·0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0
<i>Pogostemon patchouli</i>	Patchouli	EO	L	>2· 0	>2· 0	0·5	0·1 2	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	0·2 5
<i>Prunus armeniaca</i>	Apricot kernel	FO	S	>2· 0									
<i>Prunus dulcis</i>	Sweet almond	FO	S	>2· 0									
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	EO	H	1·0	0·5	1·0	>2· 0	1·0	2·0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	1·0
<i>Salvia officinalis</i>	Sage	EO	H	0·5	0·5	0·5	2·0	0·5	2·0	>2· 0	2·0	1·0	1·0
<i>Salvia sclarea</i>	Clary sage	EO	H	>2· 0									
<i>Santalum album</i>	Sandalwood	EO	W	>2· 0	>2· 0	0·0 6	0·2 5	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	0·1 2
<i>Syzygium aromaticum</i>	Clove	EO	BD	0·2 5	nd	0·1 2	0·5	0·2 5	0·2 5	>2· 0	>2· 0	0·2 5	0·2 5
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	EO	H	0·1 2	0·1 2	0·1 2	0·5	0·1 2	0·2 5	>2· 0	>2· 0	0·2 5	0·2 5
<i>Vetiveria zizanioides</i>	Vetiver	EO	L	>2· 0	>2· 0	0·1 2	0·1 2	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	>2· 0	0·0 6
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	EO	RH	>2· 0	2·0								

* EO, essential oil; FO, fixed oil; R, resin.

† B, berry; BD, bud; FL, flower; FR, fruit; H, herb; L, leaf; LT, leaves and twigs; N, needles; NT, nut; P, peel; RH, rhizome; S, seed; W, wood.

Bibliografia

- [1] <https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/580848> (24/08/2018).
- [2] J. W. Costerton, Philip S. Stewart, E. P. Greenberg, "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections", *Science*, 21 maggio 1999, vol. 284(5418), pp. 1318-22.
- [3] <https://www.chimica-online.it/biologia/batteri.htm> (28/08/2018).
- [4] David R. Soll, Karla J. Daniels, "Plasticity of *Candida albicans* Biofilms", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, settembre 2016, vol. 80(3), p. 567.
- [5] S. L. Percival, L. Suleman, C. Vuotto, G. Donelli, "Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control", *Journal of Medical Microbiology*, 2015, vol. 64(4), pp. 323-334.
- [6] T. Saur, E. Morin, F. Habouzit, N. Bernet, R. Escudié, "Impact of wall shear stress on initial bacterial adhesion in rotating annular reactor", *PLoS ONE*, 2017, 12(2): e0172113.
- [7] M.C.M.van Loosdrecht, D.Eikelboom, A.Gjaltema, A.Mulder, L.Tijhuis, J.J.Heijnen, "Biofilm structures", *Water Science and Technology*, 1995, vol. 32(8), pp. 35-43.
- [8] http://www.treccani.it/enciclopedia/biofilm_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/ (30/08/2018).
- [9] S. Fanning, A. P. Mitchell, "Fungal Biofilms", *PLoS Pathogens*, vol. 8, aprile 2012, vol. 8(4), pp. 1-4.
- [10] C. Giles, S.J. Lamont-Friedrich, T.D. Michl, H.J. Griesser, B.R. Coad, "The importance of fungal pathogens and antifungal coatings in medical device infections", *Biotechnology Advances*, gennaio 2018, vol. 36(1), pp. 264-280.
- [11] C. von Eiff, B. Jansen, W. Kohnen, K. Becker, "Infections Associated with Medical Devices Pathogenesis, Management and Prophylaxis", *Drugs*, vol. 65(2), 2005, pp. 179-214.
- [12] F. Mondello, *Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive*, Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2008. (Rapporti ISTISAN 08/10).

- [13] I. Francolini, G. Donelli, "Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections", *FEMS immunology and medical microbiology*, vol. 59, aprile 2010, pp. 227–238.
- [14] www.uniroma2.it/didattica/MICROGEN/deposito/1213_MG-16.pdf (30/08/2018)
- [15] W. Dhifi, S. Bellili, S. Jazi, N. Bahloul, W. Mnif, "Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review", *Medicines*, Basel, 2016, vol. 3(4), pp 1-16.
- [16] C. Valnet, *Oli essenziali e Aromaterapia*, 2014.
- [17] J. S. Rault, S. M. Karuppaiy, "A status review on the medicinal properties of essential oils", *Industrial Crops and Products*, 2014, vol.62, pp 250–264.
- [18] E. Guenther, *The Essential Oils*, D. Van Nostrand, New York, 1948.
- [19] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94(3), 2004, pp. 223– 253.
- [20] F. Nazzaro, F. Fratianni, R. Coppola, V. De Feo, "Essential Oils and Antifungal Activity", *Pharmaceuticals* 2017, vol. 10(4), pp 1-20.
- [21] C. Carson, K. Hammer, "Chemistry and Bioactivity of Essential Oils", *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*, United Kingdom: John Wiley & Sons, 2011, pp. 203-238.
- [22] <https://www.alkemillacosmetici.it/it/content/11-gli-oli-essenziali> (3/11/2018)
- [23] <http://www.treccani.it/enciclopedia/terpeni/> (3/11/2018)
- [24] <https://it.wikipedia.org/wiki/Fenilpropanoide> (3/11/2018)
- [25] <https://it.wikipedia.org/wiki/Cumarina> (3/11/2018)
- [26] M. L. Faleiro, "The mode of antibacterial action of essential oils", *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, gennaio 2011, pp. 1143-1156
- [27] J.L. Rios, M.C. Recio, A. Villar, "Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature", *Journal of Ethnopharmacology*, luglio 1988, vol. 23(2-3), pp 127-149.

- [28] M. Balouri, M. Sadiki, S. K. Ibnsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, vol.6(2), pp. 71-79.
- [29] https://it.wikipedia.org/wiki/Concentrazione_minima_inibitoria (28/08/2018)
- [30] https://it.wikipedia.org/wiki/Crescita_batterica (7/11/2018)
- [31] <http://www2.unibas.it/parente/wordpress/wp-content/uploads/CrescitaST.pdf> (7/11/2018)
- [32] <https://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/E2149-10.htm> (7/11/2018)
- [33] F. A. Omonijo, L. Ni, J. Gong, Q. Wang, L. Lahaye, C. Yang, "Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production", *Animal Nutrition*, 2018, vol.4(2), pp 126-136
- [34] T.R. de Kievit, B.H. Iglewski, "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships ", *Infection and Immunity*, settembre 2000, vol. 68(9), pp. 4839- 4849.
- [35] J. C. Lopez-romero, H. González-ríos, A. Borges, and M. Simões, "Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, vol. 2015, pp. 1-9.
- [36] K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley, "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts", *Journal of Applied Microbiology*, 1999, vol. 86(6), pp.

Capitolo 2

Tossicità e citocompatibilità degli oli essenziali

Gli OE sono stati classificati dalla *Food and Drug* (FDA) nella categoria delle sostanze generalmente riconosciute come sicure (GRAS).

Sono di frequente usati nell'industria alimentare e molti dei loro costituenti – tra cui linalolo, timolo, eugenolo, carvone, cinnamaldeide, vanillina, carvacrolo, citrale, e limonene – ritenuti sicuri dalla Commissione Europea, vengono utilizzati come aromatizzanti e anche come possibili conservanti alimentari, sebbene – in questo caso – impiegati limitatamente in quanto, al fine mantenere una sufficiente attività antimicrobica, occorrerebbe adoperare concentrazioni più elevate di olio [1].

È necessario, tuttavia, considerare i potenziali rischi legati ad un uso inappropriato degli OE; quindi, prima di ogni applicazione, e soprattutto in campo clinico, è indispensabile valutare l'eventuale tossicità, gli effetti collaterali o le interazioni che essi possono avere con l'organismo umano.

In generale, la tossicità di una sostanza è definita come la quantità necessaria per renderla velenosa e quindi in grado di recare danno all'organismo [2]. Molti fattori condizionano l'effetto tossico di una sostanza, quali la quantità e la concentrazione usata, la frequenza d'uso, le interazioni della sostanza con l'organismo ricevente e sensibilità individuale [2], la quale, a sua volta, può variare considerevolmente a seconda di età, sesso, profilo genetico, stato nutrizionale e stato di salute [3].

L'effetto tossico può essere locale o sistemico e si distinguono tossicità acuta e cronica, in base all'immediatezza o al ritardo dei sintomi. La tossicità locale acuta si verifica nel sito di contatto tra l'agente tossico e il sistema biologico, coinvolge solitamente un organo responsabile dell'assorbimento o dell'eliminazione della sostanza, come stomaco, intestino, pelle, fegato, polmoni o reni [4]. La tossicità sistemica invece si manifesta dopo l'assorbimento da parte dell'organismo dell'agente tossico, che viene distribuito nei tessuti e può raggiungere target specifici danneggiandoli. Si può presentare in forme diverse come carcinogenità, danneggiamento del sistema immunitario, perdita di peso e può portare nei casi estremi alla morte dell'individuo [3,4].

L'azione tossica sui normali processi fisiologici, inoltre, può essere reversibile o irreversibile in base alla capacità che l'organismo possiede di riparare il danno subito, ma comunque può portare ad una riduzione o perdita della vitalità cellulare e della capacità rigeneratrice [3].

La tossicologia studia gli effetti delle interazioni tra un organismo e uno xenobiotico, cioè di una sostanza estranea alla normale nutrizione e al normale metabolismo di un organismo vivente, in particolare concentrandosi sugli effetti dannosi o collaterali che esso causa. Si può asserire che non tutti gli effetti xenobiotici sono avversi, ma precisare pure quanto sia difficile una corretta classificazione [2,4].

Nel caso specifico degli OE, le sostanze estranee sono i loro costituenti chimici che potrebbero avere effetti negativi sull'uomo. Le principali aree di studio riguardano la tossicità dermica e irritazioni della pelle, allergie, fototossine, infiammazioni chimiche, nefrotossine, epatotossine, neurotossine [2].

Poiché gli OE sono fatti di un gran numero di componenti chimici, è molto difficile estrapolare la loro tossicità dai dati di uno dei composti che si suppone essere tossico.

I principali fattori che influenzano la sicurezza di un OE sono:

- qualità dell'olio essenziale: la purezza dell'OE è molto importante, la contaminazione aumenta la possibilità che avvengano delle risposte indesiderate;
- composizione chimica: l'uso di OE ricchi di fenoli e aldeidi può causare reazioni cutanee, perciò si consiglia sempre di diluirli prima dell'applicazione sulla pelle.
- metodo di applicazione: solitamente sono applicati direttamente sulla pelle, per inalazione o diffusione. Tuttavia, ogni modalità non è esente da problemi.
- dosaggio/diluizione: la pericolosità della dose utilizzata varia a seconda dell'olio, dell'area di applicazione e di fattori legati alla sensibilità dell'individuo.
- età: i neonati, le donne in gravidanza, gli anziani e le persone malate sono i soggetti che presentano maggiore sensibilità cutanea, quindi sono quelli più a rischio [5].

Il fattore più controllabile prima dell'applicazione di un OE è il dosaggio; essendo prodotti sintetici, si deve scegliere la dose opportuna affinché gli effetti benefici siano predominanti rispetto a quelli collaterali. La scelta è

effettuata in modo che non si superi il limite di tossicità, che dipende non solo dalla quantità e dalla concentrazione della sostanza ma anche dalla sua intrinseca tossicità, dovuta alle sue caratteristiche tossico – cinetiche (movimento dell'agente tossico nel sito di danno) e tossico – dinamiche (azioni dell'agente tossico nel sito di danno). Inoltre, si deve anche considerare la possibilità che la tossicità scaturisca dalle sostanze in cui viene metabolizzato l'OE dall'organismo [4].

Gli OE possono esercitare un'azione citotossica sulle cellule eucariote, che quindi rappresenta un rischio anche per le cellule sane dell'organismo stesso.

Il bersaglio principale è la membrana citoplasmatica, la cui struttura può essere alterata e resa permeabile. Si verificano molteplici conseguenze che portano alla perdita di alcune funzioni vitali per la cellula, come l'omeostasi ionica e la catena di trasporto degli elettroni [6].

Un'azione simile può essere esercitata anche sulle membrane mitocondriali, interne ed esterne, inducendo la morte cellulare per apoptosi e necrosi [7].

In generale alcoli, aldeidi e costituenti fenolici sono i maggiori responsabili della citotossicità di OE [8].

L'effetto citotossico non è esclusivamente negativo, infatti può essere sfruttato in applicazioni chemioterapiche contro una varietà di virus, batteri e funghi [9].

Considerando tutti i pericoli correlati all'utilizzo degli OE è bene ribadire che, prima di una loro applicazione clinica, occorre tracciare i loro diversi profili di tossicità, nonostante l'operazione risulti piuttosto complessa, poiché la tossicità di un OE specifico può variare in base alla sua composizione, che a sua volta scaturisce da molti fattori interdipendenti [10].

Va inoltre precisato che valutare la tossicità di un singolo componente isolato dell'OE non sia sufficiente poiché, essendo l'OE una miscela di elementi, è fondamentale considerare le interazioni che avvengono tra i vari costituenti che quindi possono variare l'effetto del singolo elemento preso isolatamente.

Gli studi sulla tossicità sono disponibili sotto forma di semplici casi clinici e studi su animali per un OE o un costituente purificato [11].

Gli studi preliminari per la valutazione del livello di tossicità vengono effettuati tramite prove in vitro o su animali (in vivo) [5].

Un indice che viene spesso utilizzato per tale scopo è la dose letale mediana DL50, ovvero la dose che provoca, in un'unica somministrazione, la morte del

50% della popolazione campione, in un determinato periodo di tempo [5]. Questo parametro è importante per riuscire a stabilire con una certa approssimazione il dosaggio in cui la sostanza diviene tossica.

Per quanto riguarda i test su animali, sono stati condotti esperimenti su topi per determinare la variazione della tossicità dell'OE di *Salvia officinalis* in base alla stagione, calcolando la sua DL50 in seguito a iniezione intraperitoneale, constatando una certa differenza tra le varie stagioni (l'estratto primaverile è quello meno tossico, al contrario di quello invernale che è quello più tossico, causando convulsioni). Dopo esami gascromatografici, è stato notato che il livello di canfora e α β tujone influiva sulla tossicità [11]. Un altro esempio riguarda la cura della dermatosi per gatti e cani trattati con OE di *tea tree*, gli animali testati hanno sviluppato debolezza e tremori muscolari scomparsi tre giorni dopo lo stop dell'applicazione [12].

I risultati ottenuti sull'animale di laboratorio, però, non riflettono esattamente ciò che succederebbe nell'uomo. Infatti, la tossicità varia tra le specie e anche in base al sesso nella stessa specie [9]. Si possono inoltre osservare sintomi, a breve o a lungo termine, nell'uomo che invece nell'animale non si verificano [5]. Quindi è molto complesso sulla base di questi studi risalire ai reali livelli di tossicità negli esseri umani.

Gli OE restano sicuri se il loro utilizzo avviene a basse concentrazioni, ma, qualora usati ad alte concentrazioni, nell'uomo risultano rischiosi [13]. Gli episodi di tossicità nell'uomo dovuti agli OE, afferiti all'essere umano, sono legati principalmente a fenomeni di sensibilizzazione o irritazione della pelle, irritazione della membrana mucosa, ingestione accidentale, nonché ad uso inadeguato o improprio.

La sensibilizzazione cutanea, nelle varietà delle sue manifestazioni soggettive, è un tipo di reazione allergica. L'OE può fungere da agente sensibilizzante, da cui scaturisce dapprima un effetto locale e circoscritto, ma successivamente si può manifestare con una reazione infiammatoria sul soggetto molto più evidente, estesa e grave causata dalle cellule del sistema immunitario (linfociti T) [6]. Quando si verifica questo evento dovuto ad uno specifico OE, il soggetto rimarrà molto probabilmente sensibile ad esso per lungo tempo.

Come prevenzione, occorre evitare di applicare gli stessi OE per lunghi periodi di tempo [5] e come avvertenza considerare, anche dopo aver individuato l'allergene, la difficoltà di evitarlo completamente, dal momento

che è possibile che non sia specificato nella lista degli ‘ingredienti’ di cosmetici o detergenti, in quanto potrebbe essere presente come contaminante oppure al di sotto del livello di registrazione richiesto [13].

In modo qualitativo, il grado di sensibilizzazione degli OE può essere definito severo, a forte rischio, leggero rischio, rischio negoziabile. In tabella 2.1 sono riportati gli OE suddivisi secondo questa classificazione.

Tabella 2.1: Classificazione degli OE in base al grado di sensibilizzazione cutanea [14].

A: Severe				
Do not use on skin or mucous membrane.				
Costus	Elecampane	Tea	Verbena	
B: Strong				
Best avoided on both skin and mucous membrane. Do not use unless diluted to suitable concentration – percentages shown are maximums to avoid sensitization. Do not use at all on hypersensitive, diseased or damaged skin, or on infants.				
Cassia (<0.1%)	Fennel (bitter, oxidized)	Garlic (patch test first at 0.1%)	Oakmoss (<0.6%)	Verbena (<0.1%)
Cinnamon bark (<0.1%)	Fig leaf		Treemoss (<0.6%)	
Also oxidized oils, especially pine and spruce oils.				
C: Slight risk				
Anise	Laurel leaf	Melissa	Perilla	Star anise
Catnip	Lavender	Myrrh	Pine (dwarf)	Ylang-ylang
Khella	Lemongrass	Onion	Pine (Scotch)	
	May chang			
D: Negotiable risk				
Almost certainly will not cause skin sensitization.				
Abies alba (cones)	Cedarwood (atlas)	Fir needle (Siberia)	Marjoram (Spanish)	Rosemary
Abies alba (needles)	Cedarwood (TX)	Fouve	Marjoram (sweet)	Rosewood
Ale	Cedarwood (VA)	Frankincense	Mastic	Rue
Almond (bitter)	Chamomile (Germn)	Galbanum	Methyl salicylate	Sage (Dalmation)
Almond (bitter) FFPA	Chamomile (Roman)	Geranium (Algerian)	Mimosa	Sage (Spanish)
Ambrette seed	Celery seed	Geranium (Moroccan)	Myrrh	Sandalwood
Angelica root	Cinnamon leaf	Geranium (Reunion)	Myrtle	Sassafras
Angelica seed	Clary sage (French)	Ginger	Narcissus	Sassafras (Brazilian)
Armoise	Clary sage (Russian)	Grapefruit	Neroli	Savory (Summer)
Basil	Clove bud	Guaiacwood	Nutmeg	Snakeroot
Bay (W. Indian)	Clove leaf	Gurjun balsam	Orange (bitter)	Spearmint
Benzoin	Clove stem	Hay	Orange (sweet)	Spike Lavender
Bergamot	Copaiba	Ho leaf	Orange flower	Spruce
Bergamot mint	Coriander	Honeysuckle	Oregano	Star anise
Birch (sweet)	Cornmint	Hyacinth	Orris	Taget
Birch tar	Cubeb seed	Hyssop	Palmarosa	Tangelo
Boldo leaf	Cumin	Immortelle	Parsley leaf	Tangerine
Broom	Cypress	Jasmine	Parsleyseed	Tansy
Cabreuva	Davana	Jonquil	Patchouli	Tarragon
Cade	Deertongue	Juniper	Pennyroyal (Eur.)	Tea Tree
Cajeput	Dill seed	Karo karounde	Pepper (black)	Terebinth
Calamus	Dill weed	Labdanum (cistus)	Peru balsam	Thuja
Camphor (brown)	Eau de brotus	Lavandin	Peruvian pepper	Thyme
Camphor (yellow)	Elemi	Lavender	Petitgrain (Bigrade)	Tobacco leaf
Camphor (white)	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lemon	Petitgrain (Parguay)	Tonka
Cananga	<i>Eucalyptus citriodora</i>	Lemon leaf	Phoenician juniper	Turmeric
Caraway	Fennel (bitter, oxidized)	Lime (distilled)	Pimento leaf	Vetiver
Cardamon	Fennel (sweet)	Linaloe	Rose (French)	Violet leaf
Carrot seed	Fenugreek	Lovage	Rose (Bulgarian)	Wormseed
Cascarilla	Fir needle (Canada)	Madarin	Rose (Morrocan)	Wormwood
			Rose (Turkish)	
Possible risk of sensitization				
These oils have not been tested for sensitization. Their composition suggests that they may cause sensitization but the risk is very small.				
Combava (leaf)	Hinoki (root)	St. John's Wort	<i>Eucalyptus staigeriana</i>	

Ma l'OE può esercitare anche un'azione irritante sulla pelle, effetto immediato che si manifesta con un evidente arrossamento dermico, la cui gravità varia a seconda della concentrazione dell'OE applicato. Risulta, pertanto, necessario utilizzare soluzioni diluite per gli OE ed evitare una loro applicazione sulla pelle aperta o danneggiata, la cui sensibilità potrebbe essere molto pronunciata [5]. La tabella 2.2 mostra la suddivisione degli OE in relazione al proprio potere irritante, alla massima concentrazione utilizzabile sull'uomo (tra 1% e 3% in base all'OE).

Tabella 2.2: Classificazione degli OE in base al grado di irritazione cutanea [14].

A: Severely irritant	Horseradish	Mustard
B: Strongly irritant		
Cade (rectified) Garlic ?	Massoia Onion ? Pine (dwarf) (only if oxidized)	Terebinth (only if oxidized)
C: Moderately irritant	Clove bud Clove leaf Clove stem Fennel (sweet) Fig leaf Fir needle (Siberian) Hyacinth Laurel <i>Ocimum gratissimum</i> Oregano	Flouve Parsley leaf Parsleyseed Pimento berry Pimento leaf Rue Sage (dalmation) Sassafras Savory (summer) Savory (winter) Spruce hemlock Taget Tarragom Tejpat ? Thyme Thyme (wild) ? Verbena Wintergreen
D: Very mildy irritant	Eucalyptus citriodora Elemi Fennel (bitter) Fenugreek Flouve Frankincense Galbanum Geranium (Algerian) Geranium (Bourbon) Geranium (Maroc) Ginger Graperfruit Guaiacwood	Lime (distilled) Linaloe Lovage Mace Mandarin(expressed) Marjoram (Spanish) Mastic May chang Mimosa Myrtle Narcissus Nutmeg
Abies alba (needles) Ale Almond (bitter) Angelica root Angelica seed Anise Armoise Basil ? Basil (W.Indian) Benzoin ? Bergamot Bergamot mint Birch (sweet) Birch tar Cubeb Boldo Buchu? Cabreuva Camphor (white) Camphor (yellow) Cananga Carraway Carrot seed Cedarwood (AT) Cedarwood (TX)	Cedarwood(VA) Chamomile(Ger) Chamomile(Rom) Citronella Clary sage (Fr.) Copaiba Coriander Costus (severe sensitizer) Cumin Cypress Davana Dill seed Eu de brotus Eucalyptus ? Elecampane (severe sensitizer) Juniper Karo karounde Labdanum Lavandin Lavender Lemon Lemon leaf Lemongrass	Petitgrain (Paraguay) Rose Abs. Rose otto Rosemary ? Sandalwood Savin ? Spearmint Spike lavender Spruce Star anise Tangelo Tangerine Tansy Tea Tree Thuja Tobacco leaf Tonka Tumeric Valerian ? Verbena Vetiver Wormseed Wormwood Yarrow ? Ylang-ylang
E: Non-irritant	Cascarilla Celery seed Clary sage (Russian) Cornmint Deertongue Dill weed Fir needle (Canadian) Gurjun balsam Hyssop Jasmine	Juniperus phoenicea Labdanum Marjoram (sweet) Myrrh Neroli Phoenician juniper Orris Pine (scotch) Rosewood Sage (Spanish) Snakeroot Violet leaf

Un altro effetto dannoso sulla pelle avviene se l'OE è un fotosensibilizzante; in tal caso, qualora il soggetto sia esposto al sole o luce simile, può provocare bruciore o modifica della pigmentazione della pelle. Quindi la reazione può essere un lieve abbronzatura ma si può giungere a bruciature in profondità [5]. In tabella 2.3 sono riportati i livelli massimi da non oltrepassare per non avere una reazione fototossica e il relativo grado di criticità.

Tabella 2.3: Classificazione degli OE secondo il rischio di fotosensibilizzazione [14].

A: Severe It is recommended that these oils are not used on the skin, or in any aromatherapy products intended for retail.	
Fig leaf absolute	Verbena oil 6
B: Strong We recommend that treated skin should not be exposed to sunlight or UV lamps for at least 12 hours, if used at levels higher than those indicated. Retail products should not contain these oils at levels higher than those indicated.	
Taget	0.05%
Verbena absolute	0.2%
Bergamot	0.4%
Cumin	0.4%
Lime (expressed)	0.7%
Angelica root	0.78%
Rue	0.78%
Opopanax	No level set
C: Moderate We recommend that treated skin should not be exposed to sunlight or UV lamps for at least 12 hours, if used at levels higher than those indicated. Retail products should not contain these oils at levels higher than those indicated.	
Orange (bitter, expressed)4	1.4%
Lemon (expressed)	2.0%
Grapefruit (expressed)	4.0%

Gli OE possono inoltre produrre irritazioni alla membrana mucosa, con un effetto di riscaldamento o di essiccazione sulle mucose della bocca, degli occhi, del naso e degli organi riproduttivi [5]. La classificazione degli OE secondo questo parametro è riportata in tabella 2.4.

Tabella 2.4: Classificazione degli OE relativa al grado di irritazione delle mucose [14].

A: Severely irritating Recommendation—do not use on mucous membrane.	Horseradish	Mustard
B: Strongly irritating Recommendation—do not use at more than 1% concentration on mucous membrane.	Clove leaf Clove stem Massoia Oregano	Pimento leaf Savory Thyme Thyme (wild)
C: Moderately irritating Recommendation—do not use at more than 3% concentration on mucous membrane. * These oils rated here for their irritant effects, can also cause powerful allergic reactions	Bay leaf (W. Indian) Caraway Cassia Cinnamon Bark Pimento berry	Cinnamon leaf Clove Bud Cornmint Laurel Peppermint Spearmint
D: Non-irritant Caution—some oils may occasionally cause irritation if used undiluted.	Angelica root Anise Basil Bergamot Buchu Cardamom	Carrot seed Cedarwood (atlas) Cedarwood (VA) Chamomile (German) Chamomile (Roman) Clary Sage
Citronella Coriander Cumin Cypress Dill seed	Eucalyptus Fennel (bitter) Fennel (sweet) Frankincense Galbanum	Geranium Grapefruit Hyssop Immortelle Juniper
Lavender Lemon Lemongrass Marjoram (sweet) Myrrh Neroli Nutmeg Orange	Parsley herb Parsley seed Petitgrain Pine (dwarf) Rose A. Rose otto Rosewood Rue	Sage (Dalmation) Sandalwood Sassafrass Tarragon Tea Tree Vetiver Wintergreen Yarrow, Ylang-Ylang

2.1 Misurazioni della tossicità

2.1.1 Test di citotossicità

I test di citotossicità sono uno strumento per valutare il danno cellulare e permettono di ottenere una stima dello stesso, la misura della crescita cellulare e di altri parametri (come morfologia o migrazione delle cellule).

I metodi in vitro sono basati sull'utilizzo di linee cellulari, scelte a seconda dell'applicazione del campione testato, e di un medium di coltura appropriato [15].

Si possono effettuare tramite contatto diretto ovvero esponendo la totale superficie del campione alle cellule; con test di diffusione su agar, che permette di valutare l'incidenza delle sostanze che il composto rilascia in ambiente biologico, o utilizzando un estratto del campione (metodo di eluizione), utilizzato come nutriente aggiuntivo nelle soluzioni fisiologiche in cui, in seguito, è svolta la coltura cellulare [16, 17].

Questi test prevedono di fare esposizioni in ambiente biologico del materiale testato dove crescono le cellule e si fanno confronti con un materiale di controllo positivo (tossico) e uno di controllo negativo (biocompatibile) [16].

Nei test di citotossicità rientrano i test per la misura della vitalità cellulare, come ad esempio il test MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) che consiste in un saggio colorimetrico che valuta l'efficacia dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi nel ridurre MTT in formazano, causando la variazione del colore del composto, dal giallo al blu-violetto intenso. Questa attività metabolica può avvenire solo nelle cellule vive, perciò è possibile stimare la vitalità cellulare in funzione dell'intensità della colorazione della soluzione, misurabile tramite spettrofotometria, alla lunghezza d'onda di 570nm [18, 19].

I test di citotossicità in vivo si effettuano su un modello animale e valutano i danni biologici provati dal campione in prova sull'animale [17]. Esistono diversi tipi di test, ad esempio la valutazione della tossicità orale o dermica.

2.1.2 Tossicità orale acuta

La misurazione convenzionale della tossicità orale acuta è DL50, ovvero la dose che uccide il 50% di un gruppo di animali preso come campione o dose letale mediana [20].

Con il test OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), viene testata la tossicità orale attraverso la somministrazione della sostanza ad un gruppo di tre animali per volta, aventi lo stesso sesso (di solito si preferisce quello femminile in quanto più sensibile) [21].

Occorre selezionare la specie testata, il sesso e il numero di individui coinvolti, il periodo di osservazione e i livelli di dosaggio.

I risultati sono tabulati evidenziando il numero di animali testati, il numero di decessi e la descrizione degli effetti tossici manifestati e le osservazioni necroscopiche. Inoltre, particolare attenzione, in questo caso, viene riservata al decorso temporale degli effetti tossici e ai tempi di recupero. Il dosaggio

viene aumentato solo quando risulta certa la sopravvivenza degli animali rispetto livello di dose precedente [21].

Solitamente gli animali testati in laboratorio per effettuare questo tipo di esame sono ratti o topi. Emergono, però, delle differenze piuttosto marcate tra le diverse specie. Ad esempio, per l'olio di epazote il valore DL50 nei ratti è 255mg/kg e 380mg/kg per i topi, mentre è 415 nei conigli [20].

Poiché la dose letale effettiva di una sostanza varia in base alle dimensioni del corpo, l'unità di misura scelta per DL50 è mg di sostanza per kg di peso corporeo. Quindi ad un suo più basso valore corrisponde una maggiore tossicità dell'olio essenziale [20].

LD50, però, è solo una misura approssimativa della tossicità in quanto considera la dose estrema che causa la morte dell'individuo, senza quindi evidenziare i rischi collaterali che l'olio può generare [20].

In tabella 2.5 sono riportati gli OE e i relativi valori di tossicità orale.

2.1.3 Tossicità dermica acuta

Si sceglie, anche per la tossicità dermica acuta, LD50 come parametro di misura, tenendo in considerazione, però, la marcata dipendenza dall'assorbimento percutaneo di un OE, variante da specie in specie [20].

Sulla base di questo aspetto, molti test sono effettuati sui conigli che presentano delle caratteristiche di assorbimento più simile agli uomini e che quindi possono fornire informazioni utili e funzionali [20].

In test con sei sostanze – tra cui caffeina e cortisone – il tasso di assorbimento nei conigli è più alto rispetto all'uomo. Sebbene nessuna delle sostanze testate era un OE, esse rappresentano un ampio *range* di tipi chimici ed è probabile che molti costituenti degli OE si comporteranno similmente. Come per la tossicità orale, le differenze tra umani e roditori sono importanti [20].

Attraverso il test OECD, La sostanza testata è applicata con dosaggi graduali su gruppi di animali destinati alla sperimentazione. Dopo circa 5 giorni, necessari per permettere all'animale di ambientarsi alle condizioni di alloggio e alimentazione, viene rasato di almeno il 10% della superficie dove verrà applicata la sostanza, in forma di un film sottile e uniforme, il cui contatto con la pelle viene garantito dall'utilizzo di una garza e un nastro non abrasivo.

È sempre necessario avere cura di selezionare la specie testata, il genere, il

numero degli individui interessati, nonché la durata di osservazione e i livelli di dosaggio della sostanza. I risultati sono tabulati mettendo in rilievo il numero di animali testati, l'indice di mortalità e la descrizione degli effetti tossici emersi, sempre con le opportune osservazioni necroscopiche [22].

In tabella 2.5 sono riportati gli OE e i relativi valori di tossicità dermica.

Tabella 2.5: Tossicità degli OE [23].

			g/kg	g/kg
			Oral	Dermal
Common name	Latin name	Part extracted	LD₅₀	LD₅₀
Angelica	<i>Angelica archangelica</i>	root	>2.2	>5.00
Anise	<i>Pimpinella anisum</i>	seed	2,17	>5.00
Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	flowering plant	1,40	>5.00
Black Pepper	<i>Piper nigrum</i>	seeds	>5.00	
Cajuput	<i>Melaleuca cajuputi</i>	leaf	2,48	>5.00
Camphor (White)	<i>Cinnamomum camphora</i>	leaf	>5.00	>5.00
Camphor (Yellow)	<i>Cinnamomum camphora</i>	bark	3,73	>5.00
Cardamom	<i>Ellettaria cardamomum</i>	seed	5,00	>5.00
Cassia	<i>Cinnamomum cassia</i>	bark	2,80	0,32
Cedarwood	<i>Cedrus atlantica</i>	wood	>5.00	>5.00
Chamomile, German	<i>Matricaria chamomilla</i>	flower	>5.00	>5.00
Chamomile, Roman	<i>Anthemis nobilis</i>	flowers	>5.00	>5.00
Chamomile, Roman	<i>Chamaemelum nobile</i>	flower	>5.00	>5.00
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	bark	2,65	>5.00
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	leaf	3,40	0,69
Citronella	<i>Cymbopogon nardus</i>		7,20	4,70
Clary Sage	<i>Salvia sclarea</i>	leaves	2,60	>5.00
Clove	<i>Syzygium aromaticum</i>	bud	2,65	

Clove	<i>Syzygium aromaticum</i>	leaves	1,40	1,20
Clove	<i>Syzygium aromaticum</i>	stem	2,03	
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i>	seed	4,13	0,50
Cornmint / Peppermint	<i>Mentha arvensis</i>	fresh leaves	1,24	>5.00
Cumin	<i>Cuminum cyminum</i>	fruit	2,50	3,56
Cypress	<i>Cupressus sempervirens</i>	leaf	>5.00	>5.00
Dill Weed	<i>Anethum graveolens</i>	seed	4,00	>5.00
Dill Weed	<i>Anethum graveolens</i>	herb	4,00	>5.00
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	leaf	2,48	2,48
Eucalyptus	<i>Eucalyptus radiata</i>	leaf	2,48	>2.00
Eucaplyptus	<i>Eucalyptus citriodora</i>	leaf	2,48	2,48
Fennel	<i>Foeniculum vulgare</i>	seed	3,00	5,00
Fennel, Sweet	<i>Foeniculum vulgare dulce</i>	seed	4,50	>5.00
Fir, Canada	<i>Abies balsamea</i>	needle	>5.00	>5.00
Geranium, Bourbon	<i>Pelargonium graveolens</i>	flowering plant	>5.00	>5.00
Ginger	<i>Zingiber officinale</i>	root	>5.00	>5.00
Grapefruit	<i>Citrus grandis</i>	peel	>5.00	>5.00
Ho Oil	<i>Cinnamomum camphora</i>	leaf	3,80	>5.00
Hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i>	flowering plant	1,40	5,00
Immortelle	<i>Helichrysum angustifolium</i>	flowering plant	4,40	>5.00
Jasmine	<i>Jasminum grandiflorum</i>	flowers	>5.00	>5.00
Juniper	<i>Juniperus mexicana</i>	needle/wood	>5.00	>5.00
Lavandin	<i>Lavandula hybrida</i>	flowering plant	>5.00	>5.00
Lavender	<i>Lavandula angustifolia</i>	flowering plant	>5.00	>5.00
Lavender, Spike	<i>Lavandula latifolia</i>	flowering plant	4,00	2,00
Lemon	<i>Citrus medica limonum</i>	peel	>5.00	>5.00
Lemon Verbena	<i>Aloysia triphylla</i>	fresh herb	5,00	5,00
Lemongrass	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	cut herb	>5.00	>5.00

Lime	<i>Citrus aurantifolia</i>	peel	>5.00	>5.00
Mandarin	<i>Citrus reticulata</i>	peel	>5.00	>5.00
Marjoram, Sweet	<i>Origanum majorana</i>	Flowering plant	>5.00	>5.00
Myrrh	<i>Commiphora myrrha</i>	resin	1,70	
Neroli	<i>Citrus aurantium dulcis</i>	flower	5,70	5,00
Nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>	fruit	2,60	>10.00
Orange, Bitter	<i>Citrus aurantium amara</i>	peel	5,00	>5.00
Orange, Sweet	<i>Citrus aurantium dulcis</i>	peel	5,70	5,00
Orange, Sweet	<i>Citrus sinensis</i>	peel	5,00	>5.00
Oregano, Green	<i>Origanum vulgare</i>	flowering top	1,85	0,32
Palmarosa	<i>Cymbopogon martini</i>	cut herb	>5.00	>5.00
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i>	plant	>5.00	>5.00
Peppermint	<i>Mentha piperita</i>	fresh leaves	4,40	
Perilla	<i>Perilla frutescens</i>	leaves/flowers	5,00	
Peru Balsam	<i>Myroxylon pereirae</i>	resin	>5.00	>10.00
Petitgrain	<i>Citrus aurantium amara</i>	leaf/twig	>5.00	>2.00
Pimento	<i>Pimenta dioica</i>	berries/leaves	3,60	
Pine	<i>Pinus nigra</i>	needle	2,70	>2.00
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	flowering plant	5,00	>10.00
Sage	<i>Salvia officinalis</i>	flowering plant	2,60	>5.00
Sage, Spanish	<i>Salvia lavandulaefolia</i>	leaves	>5.00	>5.00
Sandalwood	<i>Santalum album</i>	wood	>5.00	>5.00
Sassafras	<i>Sassafras albidum</i>	root bark	1,95	>5.00
Spearmint	<i>Mentha spicata</i>	fresh leaves	5,00	>5.00
Tagetes	<i>Tagetes minuta</i>	flowering herb	3,7	>5.00
Tangerine	<i>Citrus reticulata</i>	peel	>5.00	>5.00
Tea Tree	<i>Melaleuca alternifolia</i>	leaves	1,90	5,00
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	flowering plant	2,84	>5.00
Valerian	<i>Valeriana officinalis</i>		>5.00	
Wintergreen	<i>Gaultheria procumbens</i>		1,40	2,80
Ylang Ylang	<i>Cananga odorata</i>	flower	>5.00	>5.00

Bibliografia

- [1] M. Hyldgaard, T. Mygind, R.L. Meyer, "Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components", *Frontiers in microbiology*, 2012, vol. 3(12), pp. 1-24.
- [2] J. Buckle, *Clinical Aromatherapy: Essential Oils in Healthcare*, United Kindom, 2014.
- [3] J. C. Lopez-romero, H. González-ríos, A. Borges, and M. Simões, "Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, vol. 2015, pp. 1-9.
- [4] http://www.treccani.it/enciclopedia/tossicita_%28Universo-del-Corpo%29/ (10/09/2018)
- [5] <https://naha.org/explore-aromatherapy/safety> (10/09/2018)
- [6] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, "Biological effects of essential oils – a review", *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, pp. 446-475.
- [7] J.S. Armstrong, "Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death", *Bioassays*, 2006, vol.28, pp. 253-260.
- [8] R. Bruni, A. Medici, E. Andreotti, C. Fatin, M. Muzzoli, M. Dehesa, C. Romagnoli, G. Sacchetti, "Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos*(lam.) Kosterm flower calices", *Food Chemistry*, 2004, vol.85, pp. 415-421.
- [9] J. S. Rault, S. M. Karuppaiy, "A status review on the medicinal properties of essential oils", *Industrial Crops and Products*, 2014, vol.62, pp 250-264.
- [10] M. Vigan, "Essential oils: renewal of interest and toxicity", *European Journal of Dermatology*, 2010, vol. 20, pp. 685-692.
- [11] B. Ali, N. A. Al-Wabel, S. Shams, A. Ahamad, S. A. Khan, F. Anwar, "Essential oils used in aromatherapy: A systemic review", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015, vol. 5(8), pp. 601-611.
- [12] D.Villar, M.J. Knight, S.R. Hansen, W.B. Buck, "Toxicity of melaleuca oil and related essential oils applied topically on dogs and cats", *Veterinary and human toxicology*, 1994, vol.36, pp. 139-142.

- [13] S. Sinha *et al.*, "Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes", *Food and Chemical Toxicology*, vol.68, pp. 71-77.
- [14] https://issuu.com/achs/docs/essential_oil_safety-toxicology_and (7/09/2018)
- [15] Appunti ingegneria per la medicina rigenerativa
- [16] Appunti materiali per la bioingegneria
- [17] <http://tesi.cab.unipd.it/44168/1/Tesi.pdf>(9/11/2018)
- [18] https://it.wikipedia.org/wiki/Saggio_MTT(9/11/2018)
- [19] http://tesi.cab.unipd.it/14643/1/Visentin_Silvia.pdf(9/11/2018)
- [20] R. Tisserand, R. Young, "Essential Oil Safety: a guide for health care professionals", 2014.
- [21] https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl423.pdf (9/11/2018)
- [22] <http://oced.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948333.pdf> (9/11/2018)
- [23] www.dweckdata.com/published_papers/essential_oilsv1.01.xls (23/10/2018)

Capitolo 3

Rivestimenti antibatterici per dispositivi medici

I dispositivi medici sono soliti registrare la presenza di microrganismi che tendono a colonizzare la loro superficie, con la conseguenza di comprometterne la corretta funzionalità, oltre che di causare l'insorgenza di infezioni che mettono a rischio la salute del paziente.

Un basso livello igienico dell'ambiente ospedaliero può dare origine a infezioni nosocomiali, che sono perciò secondarie allo stato di salute del paziente [1].

Menzionando il caso specifico di una sala operatoria, sebbene essa possa considerarsi un ambiente a contaminazione controllata, in effetti più fattori incidono sul mantenimento del livello di pulizia e di asetticità sia delle sue superfici interne (porte, pareti, attrezzature, tende, oggetti come i ferri chirurgici, tavolo operatorio) sia dell'aria (inclusi gli impianti), considerata una delle principali cause della colonizzazione batterica sulle superfici dei dispositivi medici [1]. La massima attenzione va, inoltre, riservata – oltre che ai suddetti fattori strutturali – al fattore umano, legato alle norme comportamentali che il personale di una sala operatoria deve garantire, nel rispetto della preparazione, sanitizzazione dell'ambiente prima di ogni intervento medico – chirurgico, sia durante, sia dopo ogni operazione effettuata, tenendo soprattutto conto del livello di criticità degli interventi eseguiti [2].

La procedura standard che viene applicata per prevenire questo tipo di problema è la terapia antibiotica che, però, può non essere sufficiente per garantire la completa sicurezza del paziente.

Il problema delle infezioni associate ai dispositivi medici, recentemente, ha assunto una certa rilevanza per via della presenza di ceppi batterici sempre più resistenti agli antibiotici, con conseguente aumento dei costi di ospedalizzazione e incremento delle percentuali di morbosità e mortalità, oltre al peggioramento delle prestazioni dei dispositivi stessi [3]. Pertanto, sono stati avviati nuovi studi allo scopo di sviluppare, in chiave innovativa, soluzioni più efficaci che minimizzino i rischi per la salute del paziente.

I materiali per la fabbricazione dei dispositivi medici sono stati ottimizzati per ottenere i requisiti fisico – meccanici e di biocompatibilità utili per

l'applicazione clinica finale. Tuttavia, per garantire anche proprietà antinfettive all'interfaccia tra il biomateriale e l'esterno, è necessario focalizzarsi sulle caratteristiche superficiali, facendo attenzione a non alterare le proprietà di massa del materiale [3].

I principali approcci sviluppati, quindi, si basano sulla modifica superficiale ottenuta tramite diverse tipologie di tecniche, quali l'uso di rivestimenti antibatterici, l'impregnazione o l'incorporazione di agenti antimicrobici, il legame covalente sulla superficie di agenti antimicrobici o rivestimenti bio - ispirati.

Quando la superficie di un biomateriale subisce delle modifiche chimico - fisiche, viene inevitabilmente alterata anche l'interazione con l'ospite, modificando la risposta immunitaria. Pertanto, occorre trovare un corretto equilibrio tra gli effetti battericidi voluti e la biocompatibilità [4].

L'obiettivo principale, in generale, è quello di rendere la superficie anti - adesiva o batterio - repellente per bloccare fin dall'origine la formazione del biofilm.

Ulteriori strategie, invece, cercano di interferire con le molecole di segnalazione (autoinduttori) che consentono la comunicazione tra i batteri e regolano diversi processi batterici, come espressione genica, produzione del fattore di virulenza e formazione del biofilm [5].

La natura stessa offre soluzioni da cui trarre ispirazione per la fabbricazione di superfici antibatteriche. Molte superfici esistenti in natura, infatti, sono state individuate per le proprietà antibatteriche come le foglie delle piante, le zampe del geco, la pelle di squalo, le ali degli insetti, le squame dei pesci o la seta del ragno [6].

3.1 Superfici anti - adesive, batterio - repellenti e battericide

È noto che i batteri siano più inclini a colonizzare substrati solidi, piuttosto che rimanere nello stato planctonico [7], per cui è opportuno modificare la superficie dei dispositivi medici per renderla sfavorevole alla colonizzazione batterica, evitando l'adesione iniziale.

I primi meccanismi adesivi sono passivi e avvengono tramite interazioni chimico - fisiche tra il biomateriale e i microrganismi; successivamente si compie il processo di ancoraggio attivo, mediato dalle adesine batteriche [4].

A seconda delle modalità di azione, si distinguono le superfici *antibiofouling* (anti – adesive o batterio – repellenti) e quelle battericide [7]. Le prime sono in grado di resistere o impedire l'attacco batterico, adottando meccanismi non citotossici basati sulla modifica della chimica o della topografia superficiale, rendendola così sconveniente all'adesione dei microrganismi [8]; le superfici battericide, invece, mirano principalmente alla membrana batterica, causando lisi o interruzione, inducendo quindi la morte cellulare [9]. Alcune superfici possiedono entrambe le modalità di azione.

Le superfici anti – aderenti o batterio – repellenti incontrano maggiori difficoltà a causa della rapida contaminazione non specifica di sostanze che ricoprono il rivestimento, disattivando l'effetto antibatterico. Inoltre, il raggio di azione di questo tipo di superfici è molto piccolo e sono quindi efficaci solo in caso di stretta vicinanza con i batteri. L'azione battericida, al contrario, può realizzarsi sia per contatto diretto che tramite il rilascio di agenti antimicrobici dalla superficie [1].

Per ottenere una superficie battericida, una possibilità è data dal fissaggio, sulla superficie, dei cosiddetti “biocidi da contatto”, ovvero sostanze che, ancorate alla superficie, esercitano la loro azione a seguito dell'interazione con la membrana batterica, causandone la lisi [10]. Rappresentano, queste, una soluzione interessante per via dell'effetto di auto – sterilizzazione e per un'attività a lunga durata. [4]

Tuttavia, usando questa modalità, si possono manifestare effetti collaterali dovuti alla bassa selettività dei biocidi utilizzati, con il rischio concomitante di danneggiare anche le cellule eucariote dell'ospite.

I composti di ammonio quaternario (QAC), ad esempio, sono composti cationici con spiccata azione battericida che, però, possono indurre fenomeni di corrosione locale, provocati dalla loro natura caustica. La tossicità acuta si manifesta principalmente in presenza di alta concentrazione di composti [11].

Se pur anche i peptidi antimicrobici (AMP) possono avere come bersaglio le cellule dell'ospite, tuttavia la suscettibilità è minore rispetto a quella dei batteri, probabilmente per via della diversa composizione della membrana cellulare, priva di lipidi carichi negativamente, come nel caso delle cellule procariote, e di un minore gradiente transmembrana. Possono comunque essere effettuate modifiche della chimica dei peptidi per ridurre la citotossicità e aumentare la selettività [12].

Per sviluppare la strategia adeguata da utilizzare occorre, in prima analisi, conoscere la via di contaminazione rilevando, in particolare, se essa avvenga allo stato secco oppure tramite aria o via umida. Nei primi due casi è essenziale che venga mantenuta la sterilità dell'ambiente e vengano effettuate procedure asettiche durante la manipolazione dei dispositivi. [13] Se il veicolo invece è un fluido biologico, occorre valutare il suo contenuto proteico. Le proteine, infatti, vengono rapidamente adsorbite in superficie formando uno strato proteico che diventa la vera interfaccia tra dispositivo e batteri [4].

Di conseguenza, in assenza di proteine, è possibile sfruttare superfici con proprietà anti - adesive, inibendo le interazioni tra batteri e superficie. In genere, per questo scopo vengono utilizzati materiali inerti, agendo anche sulle caratteristiche superficiali che influenzano l'interazione con i batteri, quindi al livello della micro/nanotopografia superficiale oppure tramite rivestimenti specifici per la modifica della chimica all'interfaccia con i batteri [4].

Tuttavia, se è presente il film proteico, le interazioni con le adesine batteriche verranno mediate dalle proteine, mascherando l'azione anti - adesiva della superficie. Tra le proteine in gioco che causano batteriemia troviamo collagene, fibrinogeno, fibronectina, laminina e vitronectina [4].

Per limitare il fenomeno dell'adsorbimento proteico, si può agire alternando il potenziale elettrico, in modo da ridurre le interazioni proteine - superficie, o rallentando la velocità di adsorbimento per mezzo di barriere resistenti all'adsorbimento [4].

3.1.1 Approcci basati sulla modifica della chimica superficiale

Tra i principali approcci che coinvolgono la modifica della chimica superficiale del dispositivo ci sono la funzionalizzazione, la derivatizzazione, la polimerizzazione e il trattamento superficiale al plasma.

La funzionalizzazione e la derivatizzazione della superficie sono metodi di modifica della superficie che sono stati sviluppati per migliorare l'efficacia delle superfici antibatteriche. Il passaggio chiave è l'introduzione sulla superficie di gruppi funzionali particolari, come un gruppo contenente ammonio fosfonio o solfonio quaternario, che conferiscono proprietà antibatteriche alla superficie [7].

L'adsorbimento superficiale è il meccanismo più semplice da utilizzare e consiste nell'immersione del campione in una soluzione contenente la biomolecola, per un tempo sufficiente, sfruttando le interazioni chimico-fisiche tra la superficie e la biomolecola. La semplicità e il basso costo lo rendono vantaggioso, sebbene la deposizione sia poco controllabile e risulti, perciò, difficoltoso valutare il quantitativo della biomolecola adsorbito [14].

Un'ulteriore soluzione è immobilizzare la biomolecola legandola alla superficie tramite legame covalente. È necessario rendere la superficie reattiva, facendole esporre i dovuti gruppi funzionali che consentono la formazione del legame, che può essere ottenuto in modo diretto oppure tramite *spacer* bifunzionale. Si ottiene un miglior controllo dell'orientamento della biomolecola, mantenendone un'elevata attività [14].

Infine, un altro metodo di funzionalizzazione prevede di inglobare le biomolecole all'interno di un carrier, solitamente polimerico come l'acido polilattico (PLA) e l'acido poliglicolico (PGA), ottenendo una cinetica di rilascio controllata, in relazione alle caratteristiche del materiale del carrier e al metodo di inclusione usato. Il carrier, però, può risultare svantaggioso in quanto copre la superficie del substrato, mascherando la rugosità e la topografia superficiale [14].

La polimerizzazione di un agente antimicrobico provoca la formazione di un film superficiale, che ne altera la chimica conferendo ad essa le proprietà antimicrobiche desiderate. Solitamente può avvenire tramite meccanismo radicalico o con formazione di legami covalenti con il substrato. Tra i composti che possono essere polimerizzati, i sali di ammonio quaternario mostrano eccellenti proprietà battericide. È stato dimostrato che le catene polimeriche ad alto peso molecolare mostrano un grado maggiore di attività antibatterica rispetto a quelle a basso peso molecolare, tuttavia, per questo tipo di reazione, risulta difficile controllare il peso molecolare e la polidispersione [7].

Il trattamento superficiale al plasma, basato sulla modifica sia della chimica che della morfologia superficiale, costituisce un ulteriore metodo per ottenere superfici antibatteriche, si contraddistingue per la capacità di trasformare un'ampia varietà di substrati e presenta il vantaggio di non utilizzare solventi o altri reagenti tossici. [15]

I plasmi sono gas ionizzati, costituiti da particelle cariche (ioni ed elettroni) che rispondono fortemente ai campi magnetici applicati. [16]

I gas comunemente usati per la modifica della chimica superficiale sono aria, azoto, argon, ossigeno, protossido di azoto, elio, tetrafluorometano vapore acqueo, anidride carbonica, metano e ammoniaca. In seguito all'esposizione a questi plasmi si ottiene la funzionalizzazione superficiale, il cui grado e natura delle funzionalità dipendono dal tipo di biomateriale costituente il substrato e dal plasma usato. Solitamente la funzionalizzazione è svolta come pre - trattamento al fine di attivare la superficie per ulteriori modifiche, come innesto di biomolecole antimicrobiche o altre strutture funzionali [15].

Chang *et al.*, ad esempio, hanno usato un pretrattamento per promuovere l'innesto di chitosano su tessuti di poliestere per ottenere proprietà antibatteriche superficiali. I tessuti sono stati pretrattati con DBD (Dielectric barrier discharge) plasma argon/ossigeno e in seguito immersi in una soluzione contenente chitosano per l'innesto. Il materiale modificato ha presentato proprietà antibatteriche contro *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, mostrando anche una buona biocompatibilità con i fibroblasti [17].

Oltre al *grafting* di composti antimicrobici, si può sfruttare la deposizione al plasma di nanocompositi antibatterici sulla superficie del biomateriale, i quali sono costituiti da una matrice polimerica arricchita di nanoparticelle antimicrobiche, principalmente metalliche, che possono essere incorporate nel volume della matrice oppure in una struttura multistrato [18].

Con questa metodologia, si svolge simultaneamente la polimerizzazione della matrice polimerica e l'incorporazione delle nanoparticelle. Un esempio sono i film sottili in organosilicio con nanoparticelle di argento, ottenuti associando contemporaneamente la polimerizzazione al plasma con lo *sputtering* di argento, usando HMDSO (Esametildisilossano) come precursore [18].

La tecnica multistrato solitamente è eseguita per la formazione di struttura a sandwich, a tre strati, con i composti antimicrobici racchiusi tra due strati polimerici [18].

Vasilev *et al.*, al proposito, hanno sviluppato un rivestimento costituito da due film di n-eptilamina polimerizzati al plasma con all'interno nanoparticelle di argento. Questa procedura ha previsto dapprima la deposizione del primo strato polimerico sul substrato, in seguito è stato caricato con le nanoparticelle di argento, sintetizzate da una locale riduzione di ioni argento attraverso reazioni di solvente, e infine è stato coperto con il secondo strato di polimero plasmatico [19].

Questi tipi di trattamenti godono di una grande versatilità, richiedono un basso consumo di reagenti, garantendo, inoltre, composizione e struttura del film controllabili [7].

3.1.2 Approcci basati sulla modifica della topografia superficiale

Per ottenere superfici antibatteriche, un altro elemento da considerare è la topografia superficiale. In un primo momento, si pensava che la sua azione fosse legata esclusivamente alle proprietà antiadesive superficiale, in seguito è stata valutata anche la sua azione battericida.

Le proprietà *antibiofouling* sono ottenute sviluppando *pattern* superficiale che minimizzi l'area di contatto per l'adesione batterica oppure che miri ad alterare la conformazione 3D delle proteine adsorbite in modo da infierire con le interazioni delle adesine batteriche, che consentono l'ancoraggio batterico. [8]

Tuttavia, questo effetto non sembra che abbia un'azione diretta sulla vitalità delle cellule adese.

Per assicurarsi effetto battericida occorre, invece, ottimizzare alcuni parametri superficiali, come rugosità, densità e disomogeneità delle altezze dei pillar [20], solitamente basandosi su un approccio multiscala, ottenuto da un'architettura composta da micro/nanostrutture inserite all'interno di strutture di dimensione più grande. Per ottenere prodotti con caratteristiche topografiche, con un elevato *aspect ratio*, si possono utilizzare tecniche avanzate come la *nanoimprint* litografia e l'incisione profonda di ioni reattivi (DRIE). L'azione battericida è, in specie, dovuta all'allungamento delle membrane tra i pillar, giungendo a livelli di stress meccanico che causano la lisi cellulare. [21]

3.2 Rivestimenti basati sul rilascio di agenti antimicrobici

Lo sviluppo di rivestimenti in grado di erogare agenti antimicrobici dalla superficie del dispositivo è una delle principali soluzioni sviluppate per limitare la minaccia delle infezioni.

I rivestimenti basati sul rilascio possono essere caricati con uno o più tipi di composti antibatterici che vengono poi rilasciati nel tempo, con la possibilità di colpire sia i batteri adesi sulla superficie che quelli nello stato planctonico. Esistono diverse modalità per ottenere il rilascio: per diffusione in mezzo

acquoso; erosione/ degradazione del rivestimento o idrolisi dei legami covalenti con cui sono ancorati i composti antimicrobici sulla superficie [22].

Rispetto alla tradizionale terapia antibiotica, questa strategia consente di avere un'elevata concentrazione locale dell'agente antibatterico, senza raggiungere i limiti di tossicità ma offrendo un'efficacia maggiore, evitando quindi ripercussioni sistemiche dannose. Tuttavia, poiché il rivestimento è un serbatoio limitato dell'agente antimicrobico, l'azione può essere solo temporanea [3].

Un'altra problematica riguarda la selettività di questi agenti che devono colpire esclusivamente i patogeni, preservando invece le cellule dell'ospite; ciò diventa ancora più complesso se occorre discriminare tra tipi di cellule eucariote, come nel caso delle infezioni fungine [23].

Tradizionalmente per combattere il problema delle infezioni sono stati utilizzati gli antibiotici. Oggi, tuttavia, la ricerca è dedicata ad agenti antimicrobici innovativi per ovviare al problema della resistenza batterica degli antibiotici, come peptidi antibatterici agli antibiotici, metalli (es. Ag, Zn), enzimi (es. acilasi, lisozima), composti organici cationici (es. chitosano) e non cationici (es. furoni), composti inorganici (NO, TiO₂) [1].

3.2.1 Modalità di deposizione

La modalità inizialmente utilizzata per ottenere un rivestimento superficiale con agente antibatterico è stata la semplice impregnazione del materiale. Tramite questa tecnica, però, l'adesione del composto antibatterico è risultata carente, con un veloce rilascio iniziale della sostanza e una rapida riduzione della sua efficacia nel tempo [24]. Di conseguenza, sono stati implementati sistemi di rilascio innovativi basati su nuovi materiali - vettore, ovvero in grado di essere caricati con un agente antibatterico, e nuovi metodi di deposizione [1].

Un approccio che ha avuto notevole successo consiste nella deposizione di multistrati polielettroliti (PEM) sul substrato tramite tecnica *layer-by-layer* (LbL) per la formazione del rivestimento. Questa modalità di deposizione sfrutta l'alternanza di strati di carica opposta: l'agente può essere, quindi, inserito tra due strati oppure può costituire esso stesso parte integrante del rivestimento [1].

Un'altra modalità di deposizione usata è la deposizione al plasma di idrogeli, polimeri o ceramici. La scelta del tipo di materiale con cui produrre il

rivestimento dipende dall'affinità con il substrato, dalla modalità di rilascio desiderata e dal campo di applicazione, quindi dai requisiti richiesti sia dal punto di vista meccanico che da quello biologico [1].

3.2.2 Cinetica di rilascio

Un elemento rilevante e considerevole per i rivestimenti basati sul rilascio di agenti antimicrobici è la cinetica di rilascio. Tipicamente, avviene sempre un *burst release* iniziale seguito da un rilascio finale più lento.

Nel periodo post – operatorio, che è il più critico per il rischio di infezioni, avere un rilascio iniziale con alte dosi di agente antibatterico può essere un punto a favore. Tuttavia, occorre che i dispositivi mantengano le proprietà antibatteriche superficiali anche a lungo termine, in particolare se si tratta di dispositivi impiantabili. Per garantire l'efficacia dell'azione antibatterica, senza causare effetto citotossico per le cellule del paziente, bisogna regolare il rilascio in modo tale che venga mantenuta una dose adeguata del composto antibatterico, per un tempo sufficientemente lungo, all'interno della finestra terapeutica [1].

Affinché il rilascio avvenga in modo oculato e controllato, secondo parametri prestabiliti, e ci sia efficacia nel risultato, bisogna tener presenti diversi fattori su cui agire.

Si può inglobare l'agente all'interno di una matrice polimerica o un *reservoir*, da cui viene rilasciato tramite meccanismi di diffusione; in questo caso, il controllo avviene selezionando l'agente e il materiale in base al coefficiente di diffusione voluto [25].

Altri approcci sfruttano l'attivazione del rilascio a seguito di un innesco specifico, dovuto, ad esempio, a variazioni di temperatura, pH, solvatazione della matrice polimerica [25].

Infine, può essere necessario che l'agente sia veicolato esclusivamente verso un *target* specifico, in cui esso deve esplicare la sua azione [25].

3.2.3 Approcci attivi e passivi

Il rilascio può avvenire passivamente oppure attivato da *trigger* specifici.

Perseguendo un approccio passivo, per ottenere la cinetica di rilascio desiderata, occorre ottimizzare le proprietà dell'antibatterico

(concentrazione, distribuzione, dimensioni, carica), controllare le caratteristiche della matrice di supporto (porosità, rugosità superficiale, gruppi funzionali, etc.), o il grado micro/nanostruttura del rivestimento antibatterico [26, 27].

Nel caso si scelga di attivare il rilascio, si possono sfruttare differenti tipologie di innesco: meccanico, elettrico, magnetico, fototermico. [1]

Per esempio, sono utilizzati rivestimenti con idrogel o polimeri che, subendo variazioni di volume (rigonfiamento, restringimento, piegamento) a seguito di uno stimolo specifico, variano la loro struttura o avviene la rottura di alcuni legami favorendo, di conseguenza, la fuoriuscita dell'agente caricato. [1]

Altri tipi di rivestimenti, invece, sono sensibili al pH e rilasciano solo se sono in contatto o in prossimità dei batteri. Il metabolismo batterico, infatti, produce diverse sostanze acide che causano un abbassamento del pH nell'ambiente circostante, attivando così il rilascio. Solitamente si tratta di rivestimenti PEM che, a seguito della diminuzione del pH, subiscono uno squilibrio per via dell'accumulo di gruppi amminici positivi e rilasciano agenti cationici per mantenere l'elettroneutralità. Questa strategia risulta utile per combattere le infezioni tardive poiché l'agente può rimanere incorporato anche per diversi mesi finché non si verifica la variazione del pH. Tuttavia, i rivestimenti non sono stati testati contro le sfide batteriche ripetute, soprattutto perché non esiste un protocollo standard per tali test. [1]

Il metodo di rilascio attivo ha notevoli potenzialità perché garantisce una durata utile del rivestimento maggiore e applica il suo effetto antibatterico solo su "richiesta". Nondimeno, sono ancora presenti alcuni problemi relativi all'ottimizzazione del rilascio, in modo che avvenga solo in risposta ad uno stimolo specifico e che garantisca una dose significativa per più cicli [1].

3.3 Molecole che interferiscono con il quorum sensing

Un'altra possibilità per ottenere superfici con proprietà antibatterica, quindi, si basa su strategie che sfruttano molecole in grado di interferire con il QS, alterando le funzioni batteriche e ostacolando la formazione del biofilm.

È stata identificata un'ampia gamma di sostanze che possiedono attività di antibiofilm e possono essere innestate su superfici biomateriali o rilasciate mediante sistemi / rivestimenti appropriati [28].

Essendo un insieme variegato di sostanze, esistono diversi meccanismi d'azione: enzimi capaci di degradare selettivamente sostanze polimeriche extracellulari del biofilm (es. Dispersin B, rhDNase I), molecole battericide in grado di uccidere anche cellule batteriche quiescenti metabolicamente all'interno di biofilm (ad es. Lisostafina, certi AMP), molecole che interferiscono con il sistema di rilevamento del QS e inducono la dispersione del biofilm (ad es. furanoni), molecole che riducono l'espressione di sostanze polimeriche extracellulari del biofilm (ad es. N - acetilcisteina) o comunque riducono il metabolismo del biofilm (ad es. hamamelitannin) [4].

L'interesse suscitato verso questo tipo di molecole è dovuto al fatto che la loro azione è improbabile che induca la resistenza batterica poiché non mira ad uccidere i batteri, bensì ad alterare i meccanismi che portano alla formazione del biofilm.

Tuttavia, poiché i batteri di generi e specie diverse sfruttano anche meccanismi di regolazione differenti, è difficile che questi composti abbiano un ampio spettro di attività. Devono, comunque, avere una certa selettività per ottenere un basso impatto sulle cellule dell'ospite. Esistono, però, gli enzimi proteolitici, come la tripsina e la proteinasi, che possono degradare anche le proteine della matrice extracellulare ospite. Per questo motivo, la potenziale citotossicità degli inibitori di QS limita la loro applicazione [22].

3.4 Nanoparticelle

All'interno delle nanotecnologie rientrano le strategie basate sull'utilizzo di nanoparticelle (NP) aventi proprietà antibatteriche che scaturiscono da una serie di fattori intrinseci ed estrinseci. I fattori intrinseci comprendono: concentrazione, dimensioni (minore è la dimensione maggiore è l'attività battericida, in particolare se le dimensioni <30 nm), forma e composizione chimica delle NP; i fattori estrinseci includono, invece, fattori ambientali (ad es. ambiente aerobico o ambiente anaerobico, pH), tipo di batteri (gram positivi o gram negativi), fase del ciclo cellulare e metabolico (ad es. batteri planctonici o sessili) e presenza di un biofilm consolidato (esso può esercitare un effetto barriera riducendo l'esposizione delle cellule racchiuse all'interno) [4].

Normalmente, l'azione battericida è attuata attraverso il danneggiamento della membrana batterica e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Molti metalli presentano un'azione battericida ma, essendo eccessivamente tossici da utilizzare come vero e proprio materiale, possono essere sfruttati in forma nanoparticellare. Tra questi l'argento è quello maggiormente impiegato per via del suo ampio spettro d'azione contro numerosi ceppi batterici, funghi e anche alcuni virus [29]. L'azione battericida delle NP di argento sembra derivi dal trasferimento diretto di ioni d'argento dalle nanoparticelle a bersagli biologici come proteine o la membrana cellulare [4].

Le NP possono essere applicate come rivestimento di biomateriali, ma è possibile anche utilizzarle per drogare il biomateriale stesso. La superficie delle NP può anche essere modificata per migliorare proprietà antibatteriche o per limitare la tossicità, per esempio con rivestimento in chitosano [30].

La maggiore preoccupazione sul loro utilizzo in campo biomedico è subordinata ad una conoscenza incompleta, poco esaustiva, della tossicologia dei nanomateriali. I modelli sperimentali non sono stati standardizzati, ne manca la riproducibilità e hanno portato spesso a risultati incoerenti e multilaterali [31].

3.5 Materiali bio - ispirati

In natura sono presenti diverse superfici che mostrano interessanti caratteristiche, come bassa adesività, superidrofobicità, proprietà autopulenti, che sono state studiate per lo sviluppo di sistemi biomimetici.

3.5.1 Superfici superidrofobiche ispirate alla natura

La superficie delle foglie di certe piante – nella fattispecie il loto – manifesta proprietà autopulenti. Questa particolarità si spiega per via delle caratteristiche della superficie, avente una natura cerosa, di per sé idrofobica, ricca di sporgenze micrometriche che amplificano l'effetto idrofobico e minimizzando l'area di contatto tra le gocce d'acqua e la superficie. Le gocce rimangono pressoché sferiche, con un angolo di contatto superiore ai 150°, tendenti, perciò, a rotolare facilmente sulla superficie. I batteri, che popolano la superficie, aderiscono sulla punta dei pillar. Le gocce quindi rotolando ripuliscono la superficie, portando via anche la componente batterica. L'azione della superficie prende il nome di 'effetto loto' [32].

Si possono quindi sviluppare superfici aventi micro/nano asperità in modo controllato per conferire proprietà antibatteriche.

Le ali di alcuni insetti, come la cicala e la libellula, rappresentano un altro esempio indicativo di superficie naturale antibatterica. Il *pattern* superficiale è costituito da nanopillar a forma esagonale che conferisce, oltre all'azione autopulente, anche un effetto battericida. Quando i batteri riescono ad aderire sulla superficie dei nanopillar, le rispettive membrane sono soggette a stretching tra i pillar adiacenti e a causa di questo stress meccanico si assottigliano e possono rompersi [32].

3.5.2 Peptidi antimicrobici

Tra le nuove sostanze candidate per conferire proprietà anti - infettive ci sono i gli AMP, che rappresentano un vasto gruppo di molecole con attività antibatterica.

Essi sono secreti da numerosi organismi viventi per proteggersi dall'attacco microbico. Tali peptidi permeano nelle membrane, possono agire specificamente su patogeni (sia funghi che batteri) e sono uno dei meccanismi delle difese immunitarie innate negli organismi pluricellulari [23].

La loro azione battericida è diretta principalmente verso le membrane cellulari, inducendo la formazione di pori transmembrana che destabilizzano la cellula batterica. L'interazione tra batteri e proteine è di tipo elettrostatico: essendo perlopiù cationici, producono una forte interazione con le membrane batteriche caricate negativamente [7].

Esistono anche altri meccanismi che hanno bersagli intracellulari: l'inibizione della sintesi proteica o delle pareti cellulari e l'interazione con DNA o RNA [5].

Gli AMP presentano molteplici vantaggi: un ampio spettro d'azione, un rapido avvio dell'effetto battericida, un basso livello di resistenza indotta e attività antinfiammatorie. Tuttavia, i principali svantaggi sono: la suscettibilità alla proteolisi, la sensibilità al pH, la sensibilizzazione e le allergie indotte dopo ripetute applicazioni, i costi elevati per la sintesi [5].

Sono stati esplorati e vagliati diversi metodi basati sull'immobilizzazione fisica o chimica degli AMP su superfici solide al fine di preparare rivestimenti antibatterici. Si tratta di immobilizzarli in modo adeguato affinché sia mantenuta l'accessibilità e una corretta azione verso le cellule batteriche circostanti. Le difficoltà di questo approccio, però, dipendono dalla criticità di controllare efficacemente il rilascio di peptidi intrappolati e assicurare che

le condizioni siano tali per ottenere MIC realizzando la funzione antibatterica [7].

3.5.3 Enzimi batteriolitici

Gli enzimi sono un'altra classe di composti bioattivi non tossici con attività antimicrobica, identificati per la produzione di rivestimenti antimicrobici a tossicità ridotta.

In generale, sono proteine che abbassano l'energia di attivazione di una reazione chimica, la loro azione si basa sulla possibilità di interagire con il substrato da trasformare, attraverso un sito attivo.

Gli enzimi possono, ad esempio, danneggiare le proteine o le glicoproteine utilizzate dalle specie batteriche per legarsi alle superfici oppure compromettere lo sviluppo delle cellule batteriche una volta che sono attaccate ad una superficie [5].

Si possono distinguere 4 tipi di enzimi in base alla loro attività antibatterica:

1. enzimi, come la proteasi, che possono impedire l'attaccamento degli organismi idrolizzando i legami peptidici [33];
2. le glicosidasi che spezzano specificatamente i legami esteri dei polisaccaridi, principali costituenti degli adesivi microbici [34];
3. enzimi liasi, come alginasi, che contribuiscono a degradare la matrice, utili in particolare durante la fase di insediamento del biofilm, piuttosto che quando il biofilm è ormai stabile [34];
4. enzimi che possono produrre composti naturali antibiofilm, detti deterrenti, come la glucosio - ossidasi che produce perossido di idrogeno fortemente dannoso per tutti i microrganismi [35].

Qualunque sia l'obiettivo dell'enzima, l'immobilizzazione di queste specie bioattive nei rivestimenti *antibiofouling* è un parametro chiave dal momento che deve preservare la loro attività, mobilità e accessibilità.

Tuttavia, gli enzimi possono anche contribuire alla degradazione indesiderata delle sostanze che circondano il rivestimento superficiale [5].

3.5.4 Rivestimenti basati sugli oli essenziali

Gli oli essenziali – la cui trattazione è stata svolta, in modo più esauriente, nei capitoli 1 e 2 del presente lavoro – sono liquidi oleosi naturali prodotti in varie sezioni delle piante. Alcuni di essi, presentando un ampio spettro

d'azione contro batteri sia gram positivi che gram negativi contribuiscono alla protezione della pianta dai patogeni.

La presenza di una varietà di composizione suggerisce che l'attività non sia dovuta ad un singolo meccanismo d'azione bensì ad una combinazione di più meccanismi con effetti sinergici risultanti. La composizione e la relativa attività, tuttavia, sono molto variabili e dipendenti da diversi fattori tra cui l'ambiente, la posizione geografica e la fase di maturità della pianta, il metodo di estrazione dell'OE. La stabilità nel tempo è limitata dalla temperatura e dall'esposizione a raggi ultravioletti (UV). Una sovraesposizione all'OE può causare reazioni allergiche, nausea, vertigini [36].

Molti OE sono impiegati per la produzione di rivestimenti antibatterici o vengono incorporati in matrici polimeriche. Il maggiore ostacolo è legato alla bassa stabilità dell'olio, per cui il suo impiego necessita lo sviluppo di soluzioni che integrino l'uso di uno stabilizzante tale che preservi le proprietà dell'olio e ne regoli il rilascio [36].

Esistono diversi esempi in letteratura basati sull'incapsulazione degli oli in nanoparticelle di varia natura.

La nanoincapsulazione è una tecnica apprezzabile in quanto garante della protezione delle biomolecole da fattori ambientali, quali pH, radiazione luminosa, ossigeno, e della stabilizzazione dei componenti volatili dell'olio [37].

Sono state progettate nanoparticelle in idrossiapatite rivestite da olio essenziale di lavanda, utilizzate come sistema di somministrazione di basse concentrazioni di quest'agente antimicrobico. Sebbene il film in OE non abbia compromesso la morfologia superficiale delle particelle, è stata notata una riduzione delle loro dimensioni. L'azione antimicrobica è stata valutata sugli *Escherichia coli*, che hanno subito l'alterazione del potenziale transmembrana, compromettendo la loro vitalità. In generale, possiamo affermare che l'attività antibatterica dell'olio, utilizzando tale approccio, sia migliorata, con concentrazioni efficaci minori rispetto a quelle degli oli essenziali testati liberi [38].

Sono stati provati anche sistemi liposomiali polimerici caricati con olio essenziale, che hanno aumentato il tempo di efficacia dell'olio grazie ad un migliore monitoraggio del rilascio. Il rivestimento però non ha prodotto un effetto diretto sull'azione battericida [37].

Nell'industria alimentare, gli OE hanno trovato un più ampio utilizzo come conservanti alimentari, in particolare per la produzione di rivestimento commestibile (*edible coating*). L'olio, secondo questo approccio, viene solitamente inserito nella soluzione di preparazione del polimero per l'ottenimento del *coating* finale. Si deve, comunque, far menzione della necessità di ulteriori studi che possano indirizzare la ricerca e la pratica in modo che vengano preservate le caratteristiche che ineriscono all'alimento, come il gusto o il colore [39].

Film commestibili a base di gelatina e chitosano, incorporanti OE di chiodi di garofano, hanno rivelato attività antimicrobica nei confronti di diversi microrganismi testati e sono stati valutati, per esempio, per la conservazione refrigerata del pesce, caso in cui si è rilevata una drastica riduzione della crescita dei batteri gram-negativi [40].

L'aggiunta di OE e dei loro componenti, può, però, ridurre la resistenza meccanica a rottura del rivestimento, per via della discontinuità strutturale indotta dalla dispersione dell'olio e può alterare trasparenza, lucentezza e colore del rivestimento a seconda della concentrazione dell'olio incorporato o produrre formazione di aggregati nella parte superiore del film, responsabili dell'irregolarità superficiale [39].

3.6 Legislazione relativa ai dispositivi medici con agenti antimicrobici

L'aggiunta di un componente antimicrobico su un dispositivo medico potrebbe imporsi come strategia immediata per il miglioramento dell'igiene superficiale del dispositivo. Occorre, però, valutare attentamente l'effetto dell'agente additivo anche dal punto di vista delle norme, poiché deve essere conforme ai requisiti previsti per i dispositivi medici al fine di essere commercializzati. [41]

Il biocida deve essere efficace ed attivo contro i microrganismi – bersaglio e presente in quantità clinicamente significative sul dispositivo. Bisogna stabilire se l'agente utilizzato sul paziente possa essere considerato un farmaco o avere un effetto affine. In caso positivo, il dispositivo, entrando in contatto con la pelle o all'interno del corpo, può essere ritenuto come un sistema di somministrazione di farmaci e, quindi, è necessario modificare la sua classe a causa dell'aumento del rischio o dell'incertezza [41].

Normalmente, le sostanze antimicrobiche, utilizzate per la produzione di superfici antimicrobiche o disinfettanti, rientrano nella legislazione europea sui biocidi.

Il regolamento sui biocidi – BPR, regolamento (UE) 528/2012 – riguarda l'immissione in mercato e l'uso di biocidi e di materiali o articoli trattati utilizzati per la tutela dell'uomo e degli animali, per combattere organismi nocivi mediante l'azione di principi attivi contenuti nel prodotto biocida. [42] Si distinguono inoltre gli articoli con proprietà battericida, cioè contenenti un battericida per conferire protezione, e quelli con funzione battericida, ossia contenenti un biocida per esercitare un effetto antimicrobico esterno [43].

Se i biocidi sono destinati all'uso per dispositivi biomedicali, come disinfettanti o parte integrante del dispositivo, possono comportare dei rischi aggiuntivi rispetto a quelli contemplati nel suddetto regolamento. In questo caso, infatti, è necessario che siano conformi anche ai requisiti stabiliti dalle normative pertinenti ai dispositivi medici.

Negli Stati Uniti, i biocidi utilizzati come additivi per materiali devono essere registrati presso l'*Environmental Protection Agency* (EPA). Gli articoli trattati sono esentati dalla registrazione, ad eccezioni di quelli trattati per scopi medici, che sono regolati dalla FDA [43].

3.6.1 Normative riguardanti i dispositivi medici

Nell'Unione Europea (UE), la legislazione che regola i dispositivi in campo medico si basa su tre direttive che stabiliscono le norme per la progettazione e i requisiti da soddisfare per l'introduzione sul mercato: la direttiva sui dispositivi medici 93/42 / CEE (MDD), la direttiva sui dispositivi medici impiantabili attivi 90/385 / CEE del Consiglio (AIMDD) e la direttiva 98/79 / CE relativa ai dispositivi medico – diagnostici in vitro [44].

Recentemente, sono stati elaborati due nuovi regolamenti sui dispositivi medici, entrati in vigore il 25 maggio 2017, che sostituiscono le direttive vigenti. Tuttavia, le nuove leggi verranno applicate dopo un periodo di transizione (tre anni per MDD e cinque anni per i dispositivi in vitro). Il rinnovamento è stato necessario per via della veloce innovazione in questo campo, al fine di ottenere un quadro legislativo europeo più solido che possa garantire maggiore protezione della sicurezza dei pazienti e della salute pubblica [45].

I prodotti medicinali e i dispositivi medici operano con sistemi legislativi e regolatori diversi. Nonostante il rinnovamento legislativo, non esiste un'univoca classificazione di "prodotto combinato" e, perciò, si giunge in situazioni *borderline* in cui, data la complessità decisionale, è opportuno lavorare con entrambi i tipi di normative, svolgere diverse prove, contestualizzare e testare caso per caso, onde individuare la principale modalità d'azione per stabilire a quale normativa attendere.

Nello specifico, se l'azione primaria del dispositivo combinato è di natura farmacologica, metabolica, immunologica, si predilige la definizione di 'prodotto medicale'; viceversa, se l'effetto è meccanico, fisico o chimico, l'azione dell'agente è ritenuta accessoria e si segue la definizione di 'dispositivo medico'. In caso dubbio, la definizione di farmaci ha la precedenza secondo l'art. 2(2) direttiva 2001/83 [46].

In generale, i dispositivi medici possono incorporare sostanze che, se utilizzate separatamente, possono essere considerate medicinali. Ciò è specificatamente affrontato nell'art. 1(4) DDM che chiarisce che tali prodotti sono dispositivi, a condizione che l'azione della sostanza sia solo accessoria a quella del dispositivo, come indicato nella dichiarazione sul prodotto e come supportato dai dati scientifici fornito dal produttore dei dispositivi. Essi sono perciò classificati come dispositivi di classe III ai sensi della regola di classificazione 13 dell'allegato IX.

Per quanto riguarda gli USA, la FDA regola sia i farmaci che i dispositivi medici in commercio. Questi ultimi, negli ultimi vent'anni, sono stati regolamentati in modo meno stringente rispetto ai farmaci, con una soglia notevolmente minore in relazione all'efficacia e alla sicurezza. Stesso comportamento è stato assunto per le combinazioni farmaco - dispositivo. Ultimamente, la FDA ha iniziato a considerare i prodotti combinati come una classe normativa unica, in modo che vengano trattati in modo analogo ai farmaci, sia in termini di sicurezza che per i requisiti di efficacia. Per questo motivo hanno istituito un ufficio con competenze di controllo all'interno dell'agenzia [47].

Un rivestimento antibatterico può richiedere un cambiamento legislativo sul prodotto finale, per la cui determinazione occorre inizialmente valutare lo stato normativo del prodotto in assenza del rivestimento e, successivamente, osservare se l'aggiunta del rivestimento abbia un effetto sul soggetto. Sulla base della modalità di azione principale del prodotto rivestito, la FDA stabilisce il quadro normativo da seguire. Ci sono alcuni rivestimenti puramente meccanici che non modificano lo stato normativo di un prodotto;

altri, invece, come i rivestimenti caricati con antibiotici, possono esercitare un'azione sul soggetto aumentando la classe di rischio del prodotto finale [47].

3.6.2 Normative riguardanti gli oli essenziali

L'Agenzia europea delle sostanze chimiche (ECHA) è l'organo preposto per il controllo delle sostanze chimiche in circolo nell'Unione Europea, al fine di tutelare la salute pubblica e l'ambiente. In particolare, essa fornisce assistenza alle società affinché si conformino alla legislazione, promuove l'uso sicuro delle sostanze chimiche, fornisce informazioni riguardo le sostanze chimiche e si occupa delle sostanze potenzialmente pericolose. La legislazione riguardante le sostanze chimiche è applicata in tutti i settori industriali, in cui i principali regolamenti sono: REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), CLP (*Classificazione, etichettatura e imballaggio di sostanze e miscele*), BPR (*Regolamento sui biocidi*) [48].

Il regolamento REACH interessa la registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche; promuove metodi alternativi per la valutazione dei rischi delle sostanze chimiche, cercando di limitare i test su animali; si applica a tutte le sostanze chimiche, comprese le miscele, come gli OE [49].

Il CLP è il regolamento europeo che si basa sul *Globally Harmonized System* (GHS), metodo globalmente concordato per classificare e comunicare i pericoli di sostanze e miscele, informare sulle misure di sicurezza informare sulle misure di sicurezza tutelare allo scopo di prevenire i rischi, informare sulle misure di sicurezza tutelare la salute pubblica e l'ambiente. [50].

I principali organi europei che si occupano nello specifico degli OE sono la Federazione europea degli oli essenziali (*European Federation of Essential Oils*, EFEO) e l'Associazione internazionale dei produttori di profumi (*International Fragrance Association*, IFRA). Essi hanno pubblicato due linee guide da seguire per caratterizzare gli oli essenziali e valutare i rischi ambientali, affinché siano conformi con i regolamenti REACH e CLP [51].

Bibliografia

- [1] M. Cloutier, D. Mantovani, F. Rosei, “Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities”, *Trends in Biotechnology*, novembre 2015, vol. 33(11), pp. 637-652
- [2] <https://www.asccanews.it/rubriche/focus-su/item/384-sala-operatoria-un-ambiente-sterile-e-classificato-iso> (2/11/2018)
- [3] E. M. Kojic, R. O. Darouiche, “Candida Infections of Medical Devices”, *Clinical Microbiology Reviews*, aprile 2004, vol. 7(2), pp. 255–267.
- [4] D. Campoccia, L. Montanaro, C. R. Arciola, “A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces”, *Biomaterials*, 2013, vol. 34, pp. 8533-8554
- [5] K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, C.M. Pradier, T. Jouenne, “Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches”, *Acta Biomaterialia*, 2012, vol. 8, pp. 1670–1684.
- [6] K. Liu, L. Jiang, “Bio-inspired design of multiscale structures for function integration”, *Nano Today*, 2011, vol. 6, pp 155–175.
- [7] J. Hasan, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, “Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials”, *Trends in Biotechnology*, maggio 2013, vol. 31(5), pp. 295-304
- [8] K.K. Chung, “Impact of engineered surfaces microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*”, *Biointerphases*, 2007, vol. 2, pp 89-94.
- [9] J.C. Tiller, “Designing surfaces that kill bacteria on contact”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, vol. 98, pp 5981-5985
- [10] J.F. Williams, S.D. Worley, “Infection-resistant nonleachable materials for urologic devices”, *Journal of Endourology*, 2000, vol.14(5), pp 395-400.
- [11] <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg022.htm#SectionTitle:2.1%20%20Main%20risk%20and%20target%20organs> (1/11/2018)
- [12] N. Stempel, J. Strehmel, J. Overhage, “Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections”, *Current Pharmaceutical Design*, 2015, vol. 21(1), pp. 67-84.

- [13] K.M. Merolini, H. Zheng, N. Graves, "Most relevant strategies for preventing surgical site infection after total hip arthroplasty", *American Journal of Infection Control*, 2013, vol. 41(3), pp. 221-226.
- [14] Antibacterial-surface-for-implants_ppt (M.Cazzola)
- [15] K. Bazaka, M. V. Jacob, W. Chrzanowski, K. Ostrikov, "Anti-bacterial surfaces: natural agents, mechanisms of action, and plasma surface modification", *RSC Advances*, 2015, vol. 5, pp. 48739-48759.
- [16] http://www.treccani.it/enciclopedia/plasmi_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/ (25/10/2018)
- [17] Y. Chang *et al.*, "A study of chitosan modification of polyester fabrics by atmospheric pressure plasma and its antibacterial effects", *Fibers and Polymers*, 2008, vol. 9(3), pp. 307-311.
- [18] A. Nikiforov *et al.*, "Non-thermal plasma technology for the development of antimicrobial surfaces: a review", *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2016, vol. 49(20), 204002.
- [19] K. Vasilev *et al.*, "Tunable antibacterial coatings that support mammalian cell growth", *Nano Letters*, 2010, vol. 10(1), pp. 202-207.
- [20] J. Hasana, K. Chatterjee, "Recent advances in engineering topography mediated antibacterial surfaces", *Nanoscale*, 2015, vol. 7, pp. 15568-15575.
- [21] S. Wu, F. Zuber, K. Maniura-Weber, J. Brugger, Q. Ren, "Nanostructured surface topographies have an effect on bactericidal activity", *Journal Nanobiotechnology*, 2018, vol 16(1), p. 20
- [22] D. Campoccia, L. Montanato, C.R. Arciola, "A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces", *Biomaterials*, 2013, vol. 34(34), pp. 8533-8554.
- [23] B. R. Coad, H.J. Griesser, A.Y. Peleg, A. Traven, "Anti-infective Surface Coatings: Design and Therapeutic Promise against Device-Associated Infections", *PLoS Pathogens*, giugno 2016, vol. 12(6).
- [24] J.C. Tiller, "Antimicrobial surface", *Bioactive Surfaces*, 2011, pp. 193-217
- [25] <http://win.spazioinfo.com/public/RILASCIO%20CONTROLLATO%20004.pdf> (1/11/2018)
- [26] E.S.Zarie *et al.*, "Solvent free fabrication of micro and nanostructured drug coatings by thermal evaporation for controlled release and increased effects",

- [27] H. Cheng, Y. Li, K. Huo, B. Gao, W. Xiong, "Long-lasting in vivo and in vitro antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles", *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 2014, vol.102(10), pp. 3488-3499.
- [28] C.R. Arciola, L. Montanaro, J.W. Costerton, "New trends in diagnosis and control strategies for implant infections", *The International Journal of Artificial Organs*, 2011, vol. 34(9), pp. 727-736.
- [29] R.M. Donlan, "Biofilms and device-associated infections", *Emerging Infectious Diseases*, 2001, vol. 7(2), 277-81.
- [30] P. Jena, S. Mohanty, R. Mallik, B. Jacob, A. Sonawane, "Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells", *International Journal of Nanomedicine*, 2012, vol.7, pp 1805-1818.
- [31] L. Yildirimer, N.T. Thanh, M. Loizidou, A.M. Seifalian, "Toxicology and clinical potential of nanoparticles", *Nano Today*, 2011, vol. 6(6), pp. 585-607.
- [32] appunti sistemi biomimetici.
- [33] N.D. Rawlings, F.R. Morton, Barrett A.J., "MEROPS: the peptidase database", *Nucleic Acids Research*, 2006, vol.34, pp. 270-272.
- [34] G. Moss, *Enzyme nomenclature*, 2006.
- [35] P.J. Krug, "Defence of benthic invertebrates against surface colonization by larvae: a chemical arms race", *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2006, vol. 42, pp. 1-53.
- [36] L. Sanchez-Gonzalez et al., "Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review", *Food Engineering Reviews*, 2011, vol. 3(1), pp 1-16.
- [37] C. Saviuc *et al.*, "Hybrid Nanosystem for stabilizing essential oils in biomedical applications", *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*, 2011, vol. 6(4), pp. 1657-1666
- [38] D. Predoi, S.L. Iconaru, N. Buton, M.L. Badea, L. Marutescu, "Antimicrobial Activity of New Materials Based on Lavender and Basil Essential Oils and Hydroxyapatite", *Nanomaterials (Basel)*, 2018, vol. 8(5), pii: E291.
- [39] M.D. Antunes, C.M. Gago, A.M. Cavaco, M.G. Miguel, "Edible Coatings Enriched with Essential Oils and their Compounds for Fresh and Fresh-cut

Fruit”, Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 2012, vol. 4(2), pp. 114-122.

[40] J. Gómez-Estaca, A. López de Lacey, M. E. López-Caballero, M.C. Gómez-Guillén, P. Montero, “Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation”, Food Microbiology, 2010, vol. 27(7), pp. 889-896.

[41] <https://www.biocote.com/blog/antimicrobial-legislation-2013/> (28/10/2018)

[42] <https://www.echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation/understanding-bpr> (26/09/2018)

[43] F. Moerman, “antimicrobial materials, coatings and biomimetic surfaces with modified microtopography to control microbial fouling of product contact surfaces within food processing equipment: legislation, requirements, effectiveness and challenges”, Journal of Hygienic Engineering and design, 2014.

[44] M. Rapa, P. Stoica, E. E. Tanase, “Preparation of medical devices with antimicrobial properties”, Optoelectronics and advanced materials-rapid communications, vol. 15(78), pp. 807-816.

[45] https://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/regulatory-framework_en (29/10/2018)

[46] <https://www.samed.org.za/dynamicdata/Events/ConferencePresentations/48.pdf> (25/10/2018)

[47] D. Glocker, S. Ranade, “Medical coatings and deposition technologies”, 2016.

[48] https://it.wikipedia.org/wiki/Agenzia_europea_delle_sostanze_chimiche (11/10/2018)

[49] <https://echa.europa.eu/it/regulations/reach/understanding-reach> (26/09/2018)

[50] <https://echa.europa.eu/it/regulations/biocidal-products-regulation/understanding-bpr> (26/09/2018)

[51] <https://echa.europa.eu/it/support/substance-identification/sector-specific-support-for-substance-identification/essential-oils> (26/09/2018)

Capitolo 4

Materiali e metodi

4.1 Preparazione dei campioni in Ti_6Al_4V e acciaio 316L

Per il lavoro di ricerca, sono stati preparati dei campioni in lega di titanio Ti_6Al_4V (ASTM B348, Gr5), ottenuti a partire da barre cilindriche, tramite una troncattrice automatica (Brillant 220, ATM, in figura 4.1). Il taglio è stato eseguito utilizzando una lama in alluminia messa in rotazione alla velocità di 0.02 m/s.



Figura 4.1: troncattrice Brillant 220, ATM [1].

I campioni acquisiti con tale procedimento sono dischetti aventi spessore di 2mm e diametro di 10mm.

Per i campioni d'acciaio (acciaio 316l) è stata eseguita la medesima operazione ottenendo dischetti di diametro di 14mm e spessore 2mm.

L'identificazione dei campioni – data la bilateralità – è avvenuta per mezzo di incisione di una lettera con penna elettrica, su una faccia, mentre quella opposta, è stata lucidata con fogli di carta abrasiva SiC (120,320,800,1000,2500) al fine di ottenere superfici omogenee aventi la stessa rugosità.

Per rimuovere i residui dovuti ai processi di taglio e lucidatura effettuati, i campioni lucidati sono stati soggetti a lavaggio, prima in acetone per 5min in bagno ultrasonico (mostrato in figura 4.2) e poi per due volte in acqua

ultrapura per 10min sempre in bagno US; infine sono stati asciugati sotto cappa con flusso laminare a temperatura ambiente.



Figura 4.2: SONICA, Soltec S.r.l, Milano, Italia [2].

Una parte dei campioni in lega di titanio è stata sottoposta ad un trattamento chimico, brevettato dal gruppo di ricerca [3,4], allo scopo di renderli bioattivi e funzionalizzabili.

Tale trattamento consiste in un primo attacco acido all'interno di una soluzione di acido fluoridrico diluito e in una successiva riossidazione controllata in acqua ossigenata [3,4]. La superficie finale presenta una micro e nano struttura che induce una buona risposta da parte degli osteoblasti ed è ricca di gruppi ossidrilici superficiali che facilitano la funzionalizzazione con biomolecole. I campioni così ottenuti verranno da ora in poi chiamati "*chemically-treated*" (CT).

Per rendere ulteriormente reattivi i gruppi ossidrilici superficiali e facilitare la successiva funzionalizzazione, si espongono i campioni trattati con irraggiamento UV per 1h.

Dall'aspetto finale si evidenzia la presenza di ossido di titanio in superficie, con una colorazione superficiale che muta in base allo spessore dell'ossido formato, come mostrato in figura 4.3.

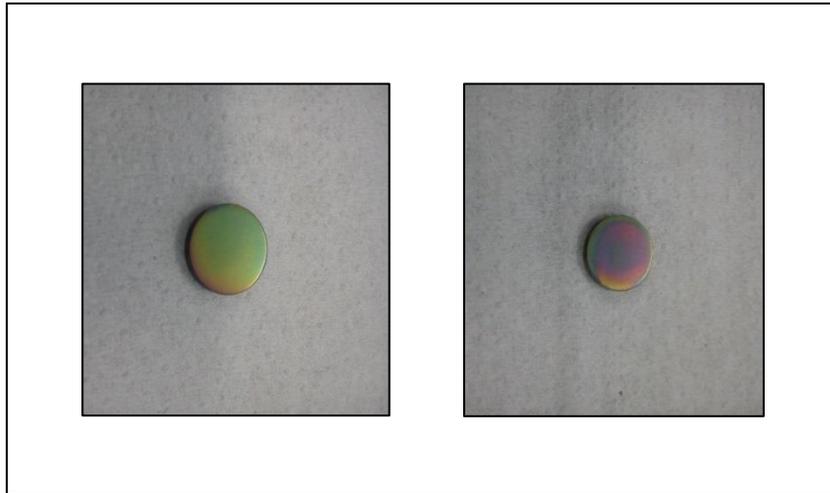


Figura 4.3: Campioni in lega di titanio dopo il trattamento chimico.

4.2 Funzionalizzazione e *coating* con olio essenziale di *mentha piperita* di Pancalieri

Per il rivestimento dei campioni è stato utilizzato l'OE di *mentha piperita* di Pancalieri. Sono stati eseguiti due distinti protocolli: *coating*, che prevede la formazione di uno strato polimerizzato di OE sulla superficie del campione, e *soaking*, che presuppone la funzionalizzazione del campione in una soluzione con OE.

Per effettuare il *coating*, i campioni sono stati posti all'interno di un contenitore coperto da un foglio di alluminio per impedire l'ingresso della luce, in quanto gli UV possono causare la degradazione delle biomolecole. Sulla superficie di ogni campione, servendosi di una micropipetta, sono stati depositati 5 μ L di OE, prestando particolare attenzione affinché l'OE sia omogeneamente distribuito su tutta la superficie. Quindi i campioni sono stati collocati in incubatore a 37°C per 48h per consentire la formazione dello strato polimerizzato di OE. Una volta conclusa la polimerizzazione, i campioni sono stati lavati in un becher contenente acqua ultrapura, utile per eliminare contaminanti o polveri presenti sulla superficie, asciugati sotto flusso laminare e conservati al buio.

Il *coating* superficiale è stato eseguito sui campioni di lega di titanio (Ti6Al4V_menta), lega di titanio trattati chimicamente (CT_menta) e acciaio (steel_menta).

Per quanto riguarda il *soaking*, invece, è stata preparata una soluzione 50% etanolo - 50% OE (1,25 ml ciascuno). I campioni sono stati inseriti nelle

provette in vetro contenenti la soluzione, ricoperte da un foglio di alluminio al fine di ripararle dalla luce, e sono state poi messe in incubatore a 37°C per 48h.

In seguito all'incubazione, sono seguite le fasi di lavaggio, prima in etanolo, per completare la funzionalizzazione e rimuovere le molecole dell'OE non legate, e poi in acqua ultrapura. I campioni sono poi stati fatti asciugare a temperatura ambiente sotto flusso laminare e conservati al buio.

In figura 4.4 sono illustrati i passaggi salienti di entrambi gli approcci utilizzati per trattare i campioni.

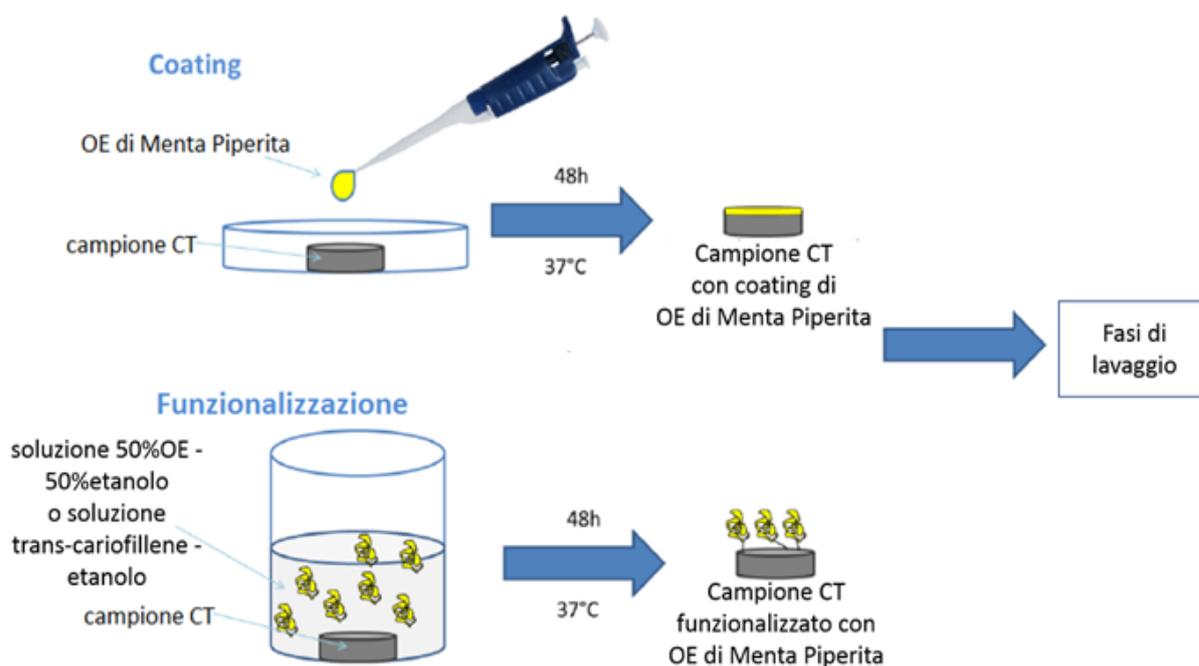


Figura 4.4: Approcci utilizzati per rivestire/funzionalizzare il campione con OE di *mentha piperita* di Pancalieri [5].

4.3 Funzionalizzazione con trans - cariofillene

Il trans - cariofillene, costituente dell'OE di *mentha piperita*, nonostante sia presente in piccolissime quantità, è risultato coinvolto nell'interazione con la superficie dei campioni. Per chiarezza d'intento, un pregresso lavoro di ricerca ha fatto emergere un'affinità della superficie CT verso la suddetta biomolecola, reclamando l'indagine attuale [5].

Perciò, in questo studio, i campioni CT sono stati funzionalizzati in una soluzione contenente trans - cariofillene con una concentrazione 10 volte superiore rispetto al lavoro precedente, per studiare più a fondo l'affinità di questa biomolecola alla superficie.

Per questo tipo di funzionalizzazione sono stati utilizzati i campioni CT, precedentemente prodotti, e sono stati funzionalizzati tramite *soaking*.

A tale scopo, sono state disposte le seguenti tipologie di soluzioni all'interno di provette ricoperte in alluminio:

- soluzione 50% etanolo + 50% menta (1,25 ml di etanolo + 1,25 ml di OE menta);
- soluzione di etanolo + trans - cariofillene (2,5 ml di etanolo + 38 μ L di trans - cariofillene).

In totale, 2 provette per ogni tipo di soluzione.

I campioni sono stati, quindi, introdotti all'interno delle provette e incubati a 37°C per 48 ore.

Ultimata la fase in incubatore, i campioni sono stati sottoposti al lavaggio, prima in etanolo e poi in acqua ultrapura, e, infine, sono stati lasciati asciugare sotto cappa.

Per effettuare l'analisi al cromatografo delle molecole legate alla superficie, si è proceduto al distacco delle stesse dal substrato.

Al fine di consentire il distacco del rivestimento ottenuto e il relativo confronto, un campione per ogni tipo di soluzione è stato inserito in una boccetta contenente 3ml di etanolo e messo in bagno US per 10min.

Sono stati ottenuti i seguenti campioni:

CT_50%menta(*soaking*),

CT_50%menta(*soaking*)_dis,

CT_transcariof(*soaking*),

CT_transcariof(*soaking*)_dis.

4.4 Rilascio in acqua

Per testare la stabilità in ambiente acquoso del *coating*, i campioni rivestiti dal film prodotto dalla polimerizzazione dell'OE, sono stati messi in boccette riempite con 25ml di acqua ultrapura, ricoperte da foglio di alluminio, come protezione dalla luce, e lasciati in incubatore a 37°C per differenti tempi: 3 ore, 7 ore, 3 giorni e 7 giorni.

Sono stati ottenuti i seguenti campioni in acciaio (steel_menta_ril3h, steel_menta_ril7h, steel_menta_ril3d, steel_menta_ril7d); lega di titanio (Ti6Al4V_menta_ril3h, Ti6Al4V_menta_ril7h, Ti6Al4V_menta_ril3d, Ti6Al4V_menta_ril7d); lega di titanio trattati chimicamente (CT_menta_ril3h, CT_menta_ril7h, CT_menta_ril3d, CT_menta_ril7d).

I campioni suddetti sono stati sottoposti a diverse tecniche di analisi: misura dell'angolo di contatto, spettroscopia FTIR, microscopia a fluorescenza, *tape test*.

4.5 Influenza della rugosità superficiale

Per testare l'incidenza della rugosità in superficie sull'adesione del *coating*, è stato studiato il comportamento di un campione in acciaio (steel(400)_menta) con rugosità aumentata rispetto a quelli precedentemente testati, lucidandolo con carta abrasiva 400. La stima del risultato, è stato svolto il *tape test* e, quindi, sono stati messi a confronto gli esiti raggiunti con il campione standard (steel_menta).

4.6 Resistenza alla pulizia

Al fine di provare e valutare la resistenza alla pulizia dei campioni in acciaio rivestiti dal coating, sono stati eseguiti ulteriori test, avendo a disposizione 100ml di soluzione acida (H₂SO₄ 0,1N), 100ml di soluzione basica (NaOH 0,1N) e uno sgrassatore commerciale (Vegetale, Nuncas), per ognuno dei quali è stato misurato il pH [6][7].

Il lavaggio è stato eseguito imbevendo, con l'ausilio di una pinzetta, una spugna in ogni soluzione di prova e strofinandola per 5s sulla superficie del campione testato. Il procedimento è descritto in figura 4.5.

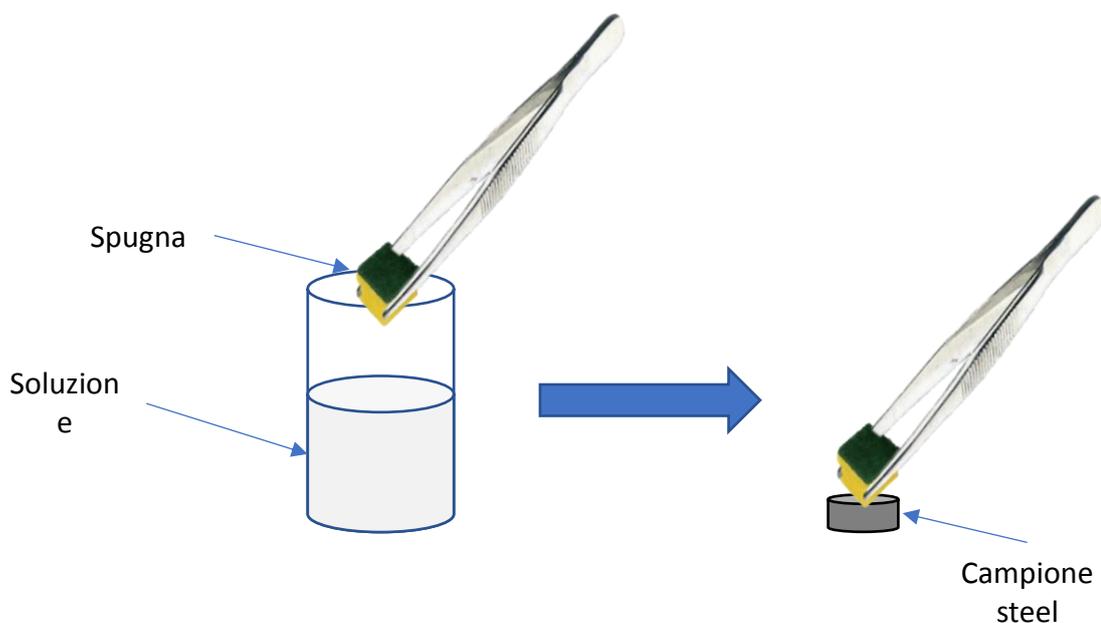


Figura 4.5: Lavaggio campioni

A seguito del lavaggio, sono stati analizzati i campioni per compiere un'indagine valutativa sulle conseguenze apportate al coating dopo il trattamento svolto. Nello specifico, è stata eseguita la spettroscopia FTIR per studiare le rispettive composizioni superficiali ed è stato effettuato il tape test per la stima dell'adesione del coating al substrato.

4.7 Microscopio ottico

Tutti i campioni prodotti con il *coating* sono stati osservati al microscopio ottico (Leitz, Laborlux 12 ME S), a differenti ingrandimenti (5x, 10x, 20x), per constatare la presenza del *coating* e visualizzare la sua morfologia. Inoltre, le immagini raccolte sono state utili per effettuare il confronto tra la superficie dei campioni prima e quella dopo l'esecuzione del *tape test* (si rimanda al paragrafo 4.12), con particolare riguardo all'area superficiale in cui esso è stato eseguito.

4.8 Misura dell'angolo di contatto

Per valutare la bagnabilità del substrato e la sua possibile variazione, dovuta al rivestimento, sono state eseguite le misure dell'angolo di contatto, usando Drop Shape Analyzer 100 (figura 4.6), con metodo di misura '*sessile drop fitting*'.

Allo scopo di effettuare la misura, ciascun campione è stato posto sul supporto porta-campione della macchina, con il lato trattato rivolto verso l'alto, e mediante micropipetta sono stati depositati 5 μl di acqua ultrapura.

È necessario posizionare il campione in modo tale che sia garantita la giusta messa a fuoco e acquisire l'immagine con la fotocamera. Il software, quindi, elabora l'immagine e fornisce la misura dell'angolo di contatto. Per ciascun campione sono state eseguite due misurazione distinte e mediate.



Figura 4.6: Drop Shape Analyzer 100 [8]

4.9 XPS (X-ray photoelectron spectroscopy)

La spettroscopia fotoelettronica a raggi X è stata effettuata per indagare sugli strati più superficiali del campione, studiandone la rispettiva composizione chimica, espressa in % atomiche degli elementi, e consentendo l'identificazione dei legami chimici presenti in superficie, a partire dall'analisi degli spettri ad alta risoluzione di C, O e Ti.

L'analisi è stata eseguita mediante il sistema Thermo Scientific Nexsa Surface Analysis.

I campioni esaminati sono stati: CT, CT_menta, CT_50%menta(*soaking*).

4.10 FTIR (Fast Fourier transform infrared spectroscopy)

L'analisi FTIR (Hyperion 3000) è eseguita per evidenziare la presenza delle specie chimiche in superficie e valutare quali componenti dell'olio sono presenti in seguito alla funzionalizzazione e dopo diversi tempi di rilascio. Lo spettro analizzato è stato impostato tra 400 e 4000 cm^{-1} .

Ciascun campione è stato posizionato sul piano focale, messo a fuoco tramite il microscopio ottico, in dotazione del dispositivo, ed è stato irraggiato con IR. Per ogni campione sono stati acquisiti 2 spettri, relativi a 2 punti presi in modo casuale sulla superficie del campione. I dati ottenuti sono stati quindi raccolti ed elaborati dal software SCOPUS e mediati.

Mediante la lettura degli spettri, individuando i picchi e le frequenze di adsorbimento, è possibile risalire ai gruppi funzionali e ai legami chimici che caratterizzano le molecole dell'OE.

4.11 Analisi gas – cromatografica

L'analisi gascromatografica è stata svolta per mettere in evidenza la presenza del trans – cariofillene sui campioni trattati, pervenendo ad un confronto tra le relative concentrazioni ottenute a seguito delle differenti tecniche utilizzate per funzionalizzare il campione.

Le soluzioni per effettuare la prova sono state ottenute dai campioni CT_50%menta(*soaking*)_dis, CT_transcariof(*soaking*)_dis, CT_menta_ril7d_dis e acqua_CT_menta_ril7d.

Per compiere il test al cromatografo, sono state utilizzate le soluzioni sopra elencate, concentrate con l'uso di esano. A tal fine, l'etanolo utilizzato per effettuare il distacco è stato inserito in un tubo di vetro, in cui sono stati aggiunti 3ml di acqua ultrapura e 1ml di esano. La soluzione ottenuta è stata miscelata per 20s e, successivamente, centrifugata a 1000 giri/min per 5min. La fase superiore (esano) è stata trasferita in un altro contenitore e concentrata a 100µl. Per l'analisi sono stati inseriti 3 µl di soluzione concentrata all'interno del cromatografo.

4.12 Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza (Leica DM550 B) è stata utilizzata per confermare la presenza dell'OE sui campioni rivestiti ed osservare l'omogeneità del coating prima e dopo il rilascio, dal momento che l'OE produce fluorescenza visibile.

I campioni analizzati sono: acciaio (steel, steel_menta, steel_menta_ril3h, steel_menta_ril7h, steel_menta_ril3d, steel_menta_ril7d); lega di titanio (Ti6Al4V, Ti6Al4V_menta, Ti6Al4V_menta_ril3h, Ti6Al4V_menta_ril7h, Ti6Al4V_menta_ril3d, Ti6Al4V_menta_ril7d); lega di titanio trattati

chimicamente (CT, CT_menta, CT_menta_ril3h, CT_menta_ril7h, CT_menta_ril3d, CT_menta_ril7d).

4.13 *Tape test*

Il *tape test* è stato eseguito secondo lo standard ASTM D 3359 [9] allo scopo di valutare il grado di adesione del rivestimento di OE prodotto sulla superficie dei campioni. Per svolgere il test, è stato necessario disegnare una griglia sulla superficie del campione testato, usando il rasoio in dotazione; per eliminare gli eventuali residui dovuti al taglio, la superficie è stata spazzolata mediante un pennello. In seguito, è stata applicata una pellicola di nastro adesivo sulla superficie del campione e poi rimossa velocemente. Sono state effettuate delle valutazioni per classificare l'adesione del rivestimento in conformità con lo standard ASTM D 3359 (Fig. 4.7). Utilizzando il microscopio ottico, sono state acquisite delle immagini per stabilire la presenza del rivestimento prima e dopo il test e osservare i segni del distacco.

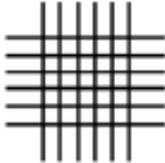
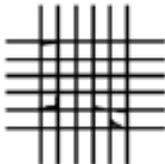
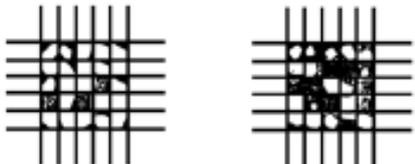
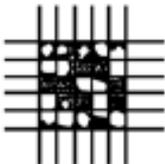
CLASSIFICATION OF ADHESION TEST RESULTS		
CLASSIFICATION	PERCENT AREA REMOVED	SURFACE OF CROSS-CUT AREA FROM WHICH FLAKING HAS OCCURRED FOR SIX PARALLEL CUTS AND ADHESION RANGE BY PERCENT
5B	0% None	
4B	Less than 5%	
3B	5 – 15%	
2B	15 – 35%	
1B	35 – 65%	
0B	Greater than 65%	

Figura 4.7: Classificazione del grado di adesione in conformità con ASTM D3359[9]

Bibliografia

- [1] <https://www.atm-m.com/products/cut-off-machines/benchtop/brillant-220/function-features/> (7/11/2018)
- [2] <https://www.soltec.eu/it/lavatrici-ad-ultrasuoni-serie-standard/10-lavatrice-ad-ultrasuoni-3200-s3.html> (7/11/2018)
- [3] "S. Spriano *et al.*, European Patent 2214732."
- [4] S. Ferraris *et al.*, "Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2011, vol. 22(3), pp. 533–545.
- [5] M. Cazzola, " Multifunctional surfaces for implants in bone contact applications", *PhD Thesis*, 2018.
- [6] WO 2007/147832 - Substrate with antimicrobial properties
- [7] M. Ferraris, S. Perero, S. Ferraris, M. Miola, E. Vernè, S. Skoglund, E. Blomberg, I. Odnevall Wallinder, "Antibacterial silver nanocluster/silica composite coatings on stainless steel", *Applied Surface Science*, 2017, vol. 396, pp. 1546-1555.
- [8] <https://www.kruss-scientific.com/products/drop-shape/dsa100/drop-shape-analyzer-dsa100/> (7/11/2018)
- [9] "ASTM D3359-Standard Test Methods for Rating Adhesion by Tape Test," *Annu. B. ASTM Stand.*, 2009, pp. 1–7.

Capitolo 5

Risultati

5.1 Osservazioni macroscopiche relative ai campioni rivestiti dal *coating* di olio essenziale di *mentha piperita* di Pancalieri

La figura 5.1 permette di fare un confronto visivo tra i tre differenti materiali utilizzati nel corso del presente lavoro di ricerca (lega Ti6Al4V, acciaio, CT), dopo la formazione del *coating* di OE di *mentha piperita* di Pancalieri. Inoltre, sono riportate anche le immagini relative ai campioni CT rivestiti con il *coating* con differenti tempi di rilascio in acqua, per esaminare come il suo aspetto cambi in funzione di questo parametro.

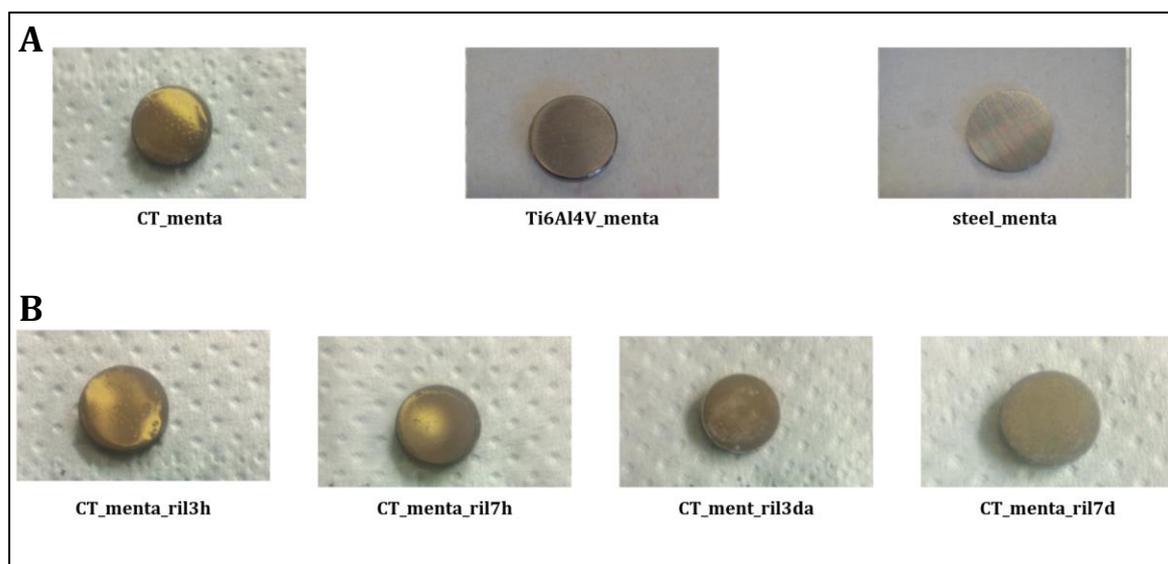


Figura 5.1: A) Confronto dell'aspetto dei campioni CT_menta, Ti6Al4V_menta, steel_menta; B) confronto dell'aspetto dei campioni CT_menta_ril3h, CT_menta_ril7h, CT_menta_ril3d, CT_menta_ril7d.

Rispetto agli altri substrati, i campioni CT presentano una particolare colorazione superficiale, dovuta alla presenza dello strato di ossido di titanio formatosi in seguito al trattamento chimico svolto. La variazione delle tonalità di colore è riconducibile al differente spessore di questo *layer*.

La presenza del *coating* è visibile su tutti e tre i tipi di substrato, rendendo la superficie più lucida.

Dal confronto dei campioni CT sottoposti a tempi di rilascio diversi, si nota che, in funzione di questo fattore, la superficie diventa via via più opaca e appare un alone biancastro, non uniformemente distribuito, riconoscibile in particolare per i campioni CT_menta_ril3d e CT_menta_ril7d.

5.2 Misura dell'angolo di contatto

La misura dell'angolo di contatto fornisce una stima della bagnabilità superficiale: ad angoli di contatto minori corrisponde una maggiore bagnabilità.

Tramite questo dato è stato studiato il confronto della bagnabilità dei diversi campioni prodotti per valutare il range di variabilità indotto dalla presenza del *coating* e in funzione dei diversi tempi di rilascio.

Le misure medie dell'angolo di contatto e le deviazioni standard per ogni campione sono riportate in figura 5.2.

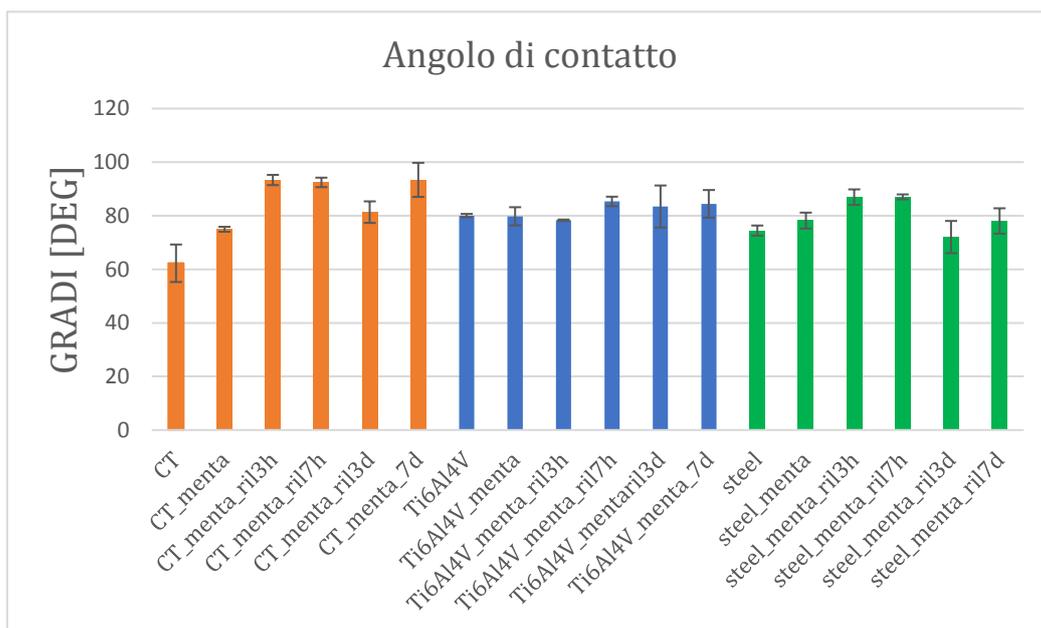


Figura 5.2: Angoli di contatto relative a campioni prodotti in CT, lega di titanio e acciaio.

Dal grafico si evince che, in generale, non si verificano modifiche significative dell'angolo di contatto, con una variabilità tra le misure ottenute di $\pm 10^\circ$. Quindi la peculiare idrofobicità dell'OE non comporta un evidente cambiamento della bagnabilità del substrato. L'unico caso in cui è osservabile un significativo incremento di angolo di contatto in seguito alla

formazione del *coating* è quello del substrato CT. Questo substrato infatti è particolarmente idrofilico per via dell'elevato numero di gruppi OH sulla sua superficie e rende quindi apprezzabile la differenza con la bagnabilità del *coating*.

Gli altri casi in cui l'angolo di contatto varia maggiormente potrebbero essere dovuti ad una disomogeneità del rivestimento o alla rugosità superficiale.

Sulla base dei risultati ottenuti, questa tecnica non è stata in grado di provare con assoluta certezza la presenza dei costituenti dell'OE sulla superficie dei campioni.

5.3 XPS

L'analisi XPS è stata svolta sui campioni CT, CT_menta e CT_50%menta(*soaking*) e ha fornito la composizione superficiale, espressa tramite le % atomiche degli elementi, come riportato in tabella 5.1

Tabella 5.1: %atomiche dei campioni CT, CT_menta e CT_50%menta(*soaking*).

Elementi (%atomiche)	CAMPIONI		
	CT	CT_MENTA	CT_50%MENTA(<i>soaking</i>)
Al	3.60	1.35	3.85
Si	1.20	1.43	1.03
Cl	0.80	0.70	0.42
C	26.12	50.62	31.25
Ca	0.63	-	0.63
N	0.85	0.99	0.82
Ti	17.64	8.64	16.35
O	49.16	35.24	45.64

Dall'esaminazione i dati ricavati e il confronto tra il campione di controllo (CT) con gli altri campioni trattati con l'aggiunta dell'OE (CT_menta e CT_50%menta(*soaking*)) si nota un aumento delle percentuali atomiche relative al carbonio dettato dall'aggiunta dell'OE, verificatosi in maniera più marcata per CT_menta, al contrario le percentuali relative l'ossigeno risultano diminuite.

La presenza del carbonio sul campione CT è dovuta alla contaminazione atmosferica, dato che il trattamento chimico svolto non prevede l'utilizzo di composti carboniosi.

Per tutti i campioni, è rilevabile la presenza di diversi contaminanti, quali Cl, Ca, N, Si, che si sono legati alla superficie durante il trattamento.

Riguardo le percentuali degli elementi costituenti il materiale (Al e Ti), esse subiscono un abbassamento per il campione CT_menta, ciò scaturisce dallo spessore del *coating* prodotto che non consente allo strumento di penetrare in profondità. Al contrario per il CT_50%menta(soaking) questa diminuzione non si verifica, giustificando la presenza di un rivestimento più sottile.

In figura 5.3 sono riportati gli spettri ad alta risoluzione del carbonio relativi ai 3 campioni presi in esame.

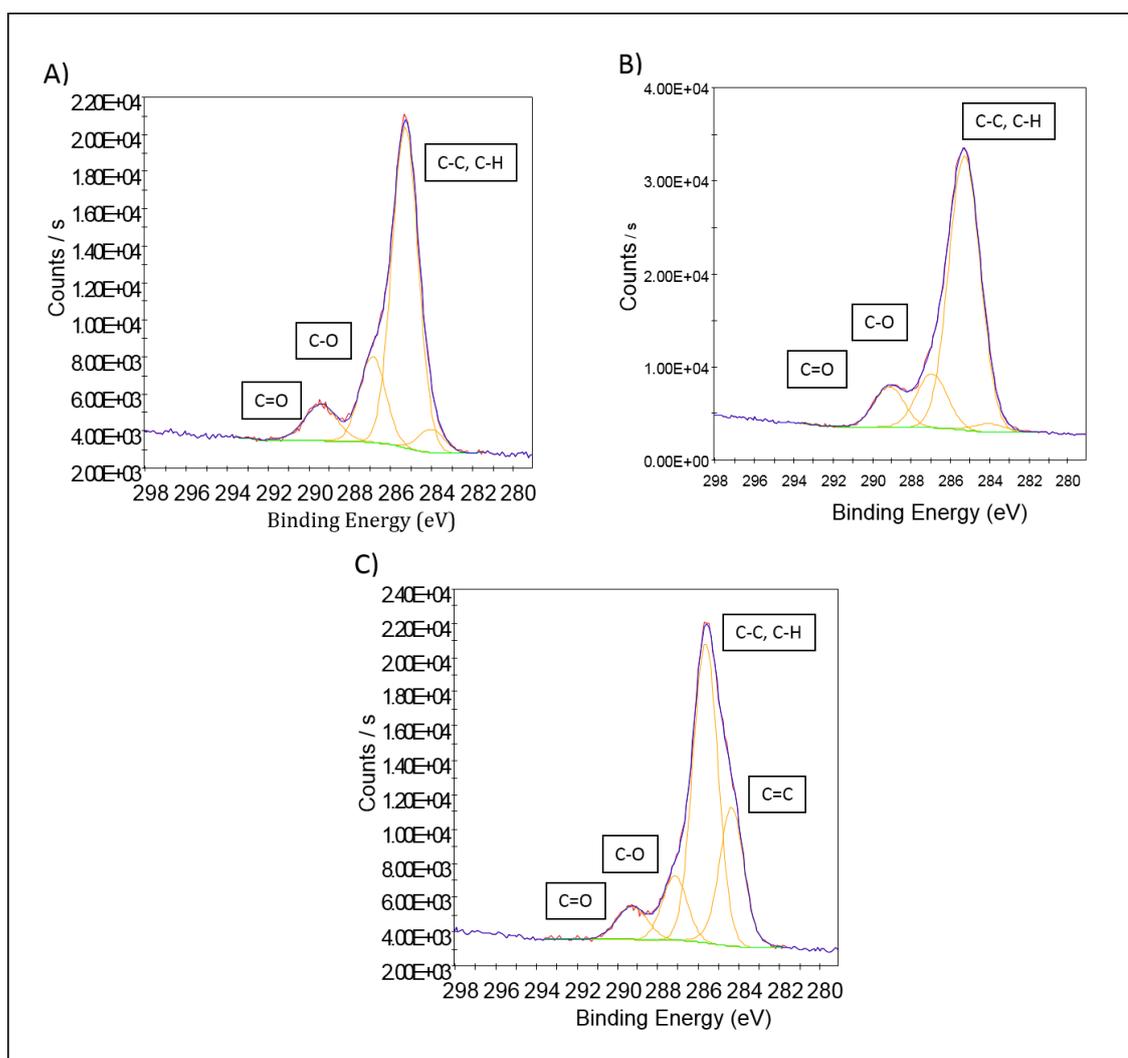


Figura 5.3: spettri ad alta risoluzione nella regione del C relativi ai campioni A) CT; B) CT_menta; C) CT_50%menta(soaking).

Esaminando gli spettri raccolti, si può notare la presenza di 3 picchi presenti per tutti i campioni: il primo intorno ai 285 eV, attribuibile ai legami C-C e C-H [1] [2], il secondo a circa 286eV, associabile a C-O [2], e infine a 289eV, dovuto al contributo del C=O [2]

Per il campione CT, la presenza dei picchi è causata dalla presenza di contaminanti carboniosi atmosferici che si sono legati alla superficie per la manifesta affinità del Ti a questi elementi.

Il campione CT_menta, avente il *coating*, presenta un aumento del picco relativo al C=O, dovuto al processo di polimerizzazione dell'OE, mentre quello del C-O risulta essere diminuito.

In seguito al *soaking*, il picco del C=C, presente a 284 eV [2], risulta notevolmente più alto, confermando la presenza del trans - cariofillene e beta - cubebene sulla superficie del campione in seguito a questo trattamento, che possiedono questo gruppo funzionale.

Gli spettri ad alta risoluzione dell'ossigeno sono mostrati in figura 5.4.

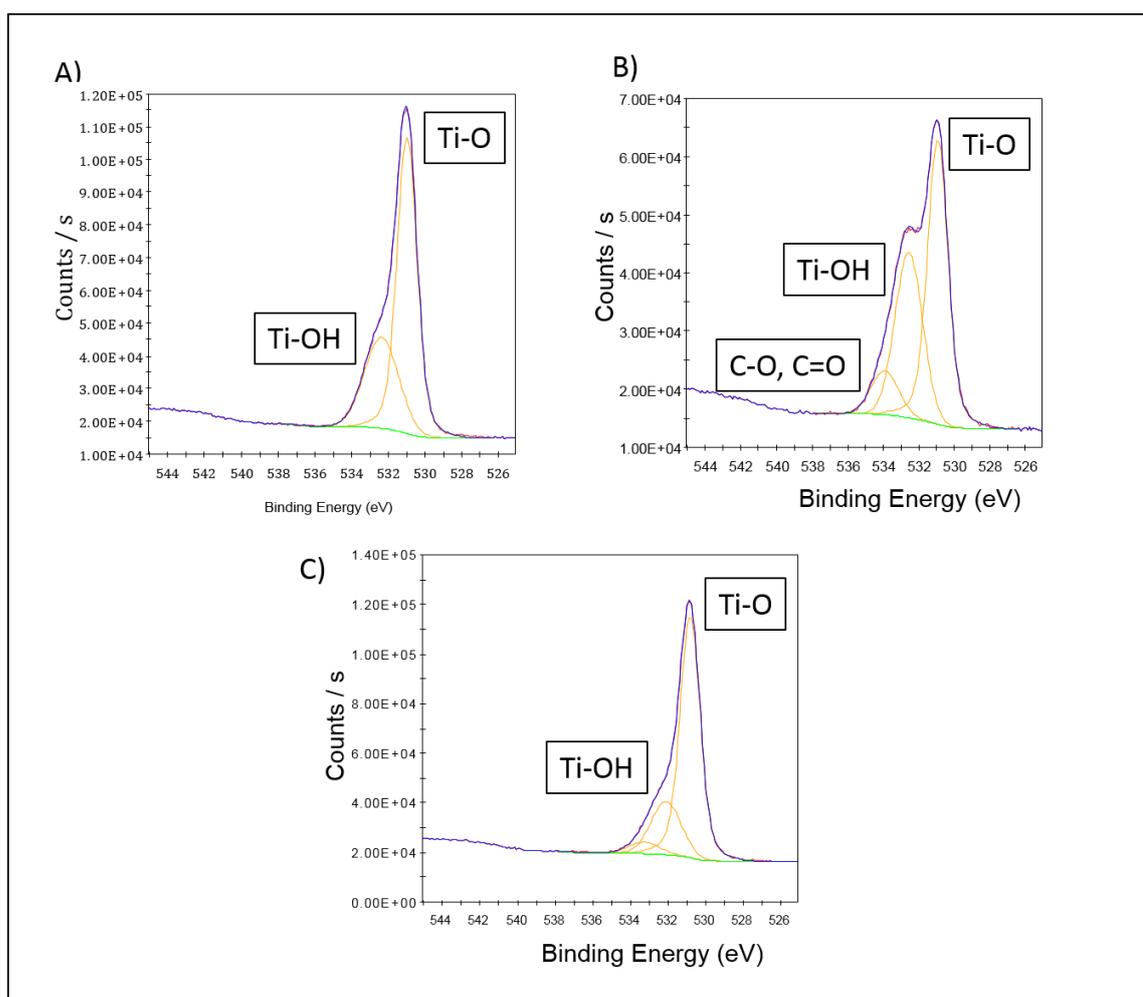


Figura 5.4: spettri ad alta risoluzione nella regione dell'O relativi ai campioni A) CT; B) CT_menta; C) CT_50%menta(soaking).

Tutti gli spettri mostrano la presenza dei picchi caratteristici relativi al Ti-O, individuato a 530 eV [3], e al Ti-OH, presente a 532 eV [1], fornendo una conferma della formazione dell'ossido passivamente a seguito del trattamento chimico svolto, seguito dall'aumento della densità dei gruppi ossidrilici esposti in superficie.

Per il campione CT_menta è stata rilevata, inoltre, la presenza del picco a 534 eV, che può ricondursi al C=O oppure al C-O [3][4], presenti nell'OE.

I risultati ottenuti mediante XPS non possono confermare con certezza la presenza dell'OE, in quanto nell'attribuzione dei picchi non è possibile determinare se essi siano dovuti direttamente all'OE oppure siano presenti a causa di contaminanti esterni.

5.4 FTIR

Nel precedente lavoro[5], l'OE di *mentha piperita* di Pancalieri è stato caratterizzato utilizzando l'analisi FTIR in ATR mode e i risultati sono riportati in figura 5.5.

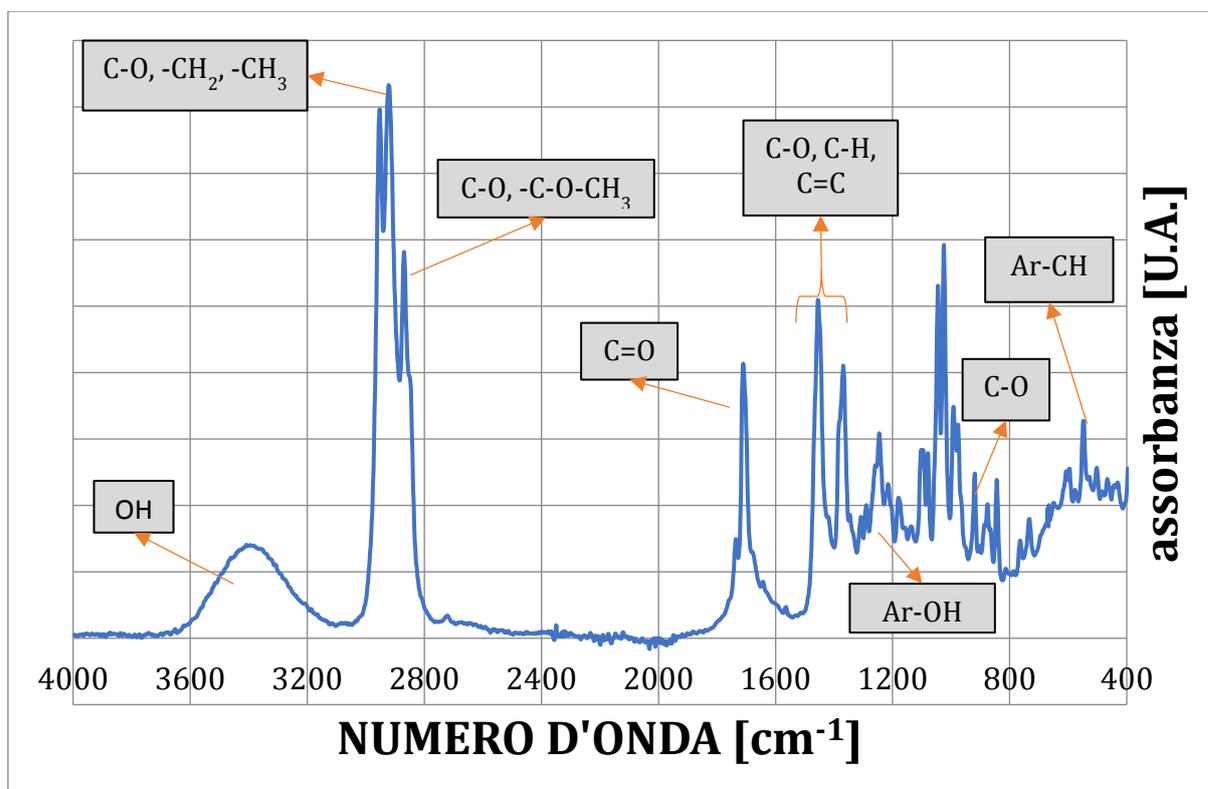


Figura 5.5: FTIR dello spettro mediato dell'olio essenziale di *mentha piperita* di Pancalieri [5].

Lo spettro mette in evidenza la presenza di picchi caratteristici dell'OE preso in esame, sulla base dei quali certificare o meno la presenza del *coating* sui campioni trattati. I principali picchi sono riportati in tabella 5.2.

Tabella 5.2: Bande e relative assegnazioni.

NUMERO D'ONDA (cm ⁻¹)	ASSEGNAZIONE
3450 - 3200 cm ⁻¹ [6]	stretching -OH
2960 - 2870 cm ⁻¹ [7]	stretching C-H
2960 - 2870 cm ⁻¹ [7]	stretching C-O
1780 - 1700 cm ⁻¹ [7]	stretching C=O
1450 cm ⁻¹ [8]	bending C-H
1450 cm ⁻¹ [8]	bending C=C (alif)
1450 cm ⁻¹ [8]	stretching C=C (arom)
1400 - 1370 cm ⁻¹ [8]	stretching C=O

Tutti i campioni prodotti rivestiti dal *coating* sono stati, quindi, analizzati per controllare se gli spettri ottenuti presentano i picchi individuati dell'OE.

Per ciascun tipo di substrato sono forniti gli spettri riguardanti il confronto con il campione di controllo, privo di *coating*, e il confronto tra quelli sottoposti a tempi di rilascio in acqua crescenti.

La presenza del picco a 2400 cm⁻¹, negli spettri riportati in seguito, è un'anomalia dovuto al mancato compensamento dell'anidride carbonica atmosferica.

Gli spettri dei campioni Ti6Al4V e Ti6Al4V_menta sono riportati in figura 5.6 in modo da evidenziare i cambiamenti sostanziali indotti dalla presenza del *coating* rispetto al campione di controllo.

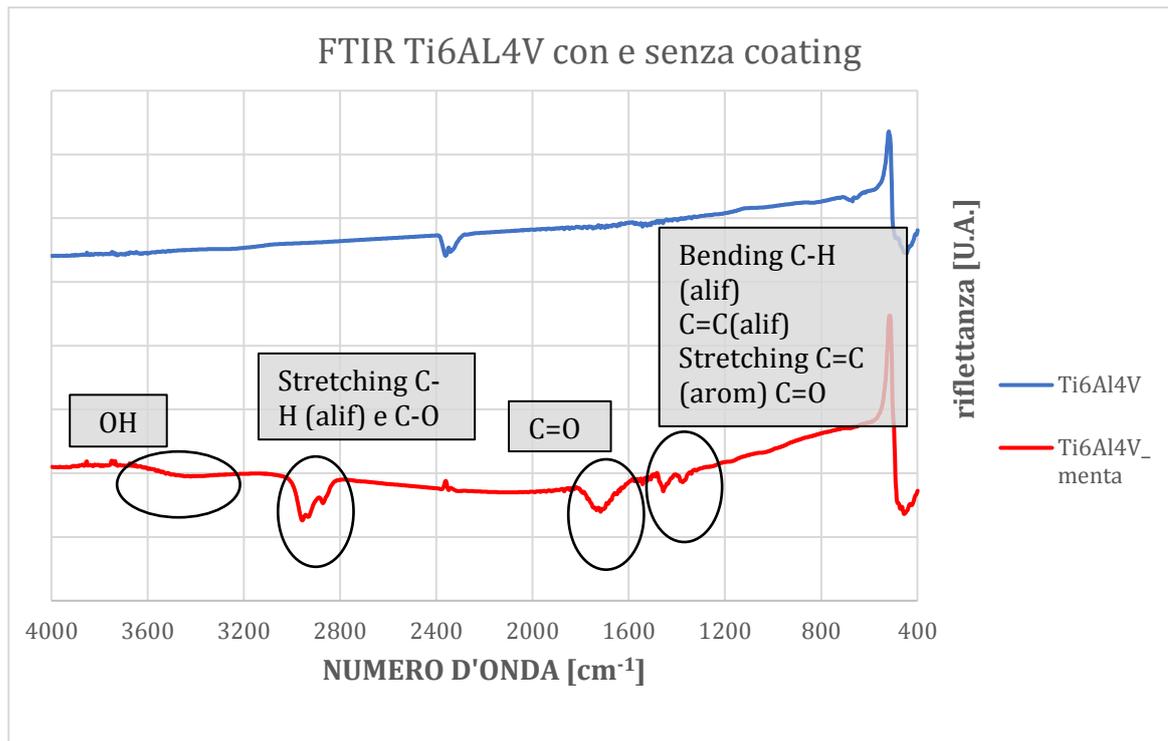
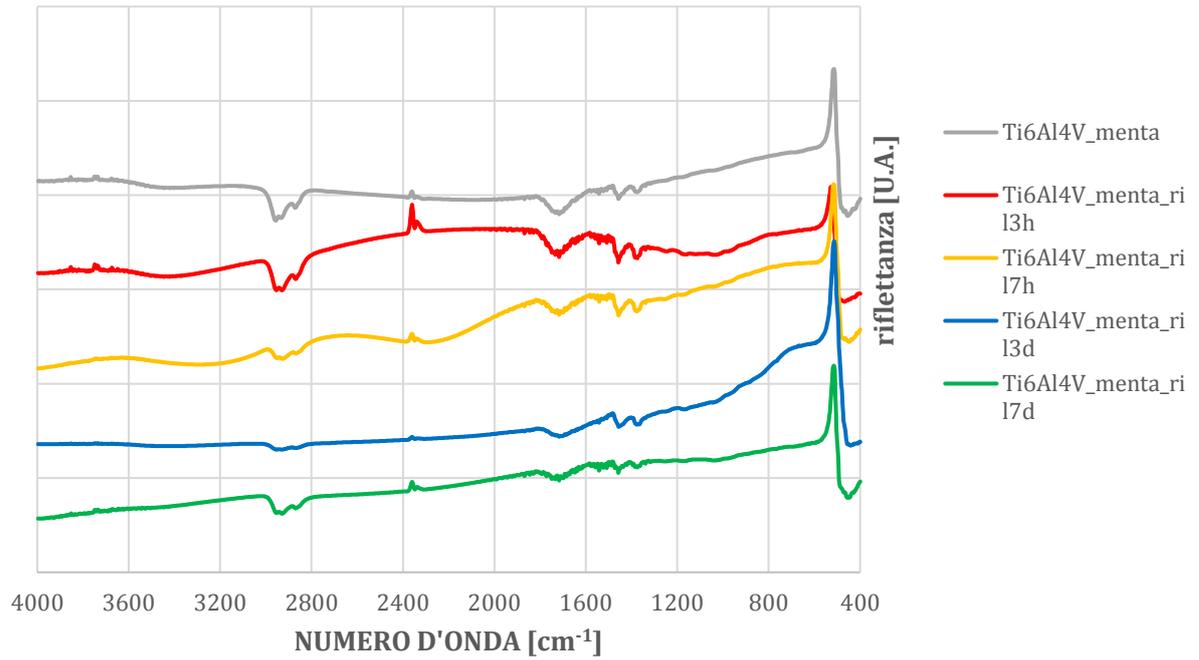


Figura 5.6: spettri FTIR dei campioni Ti6Al4V e Ti6Al4V_menta tra 400 e 4000 cm^{-1} .

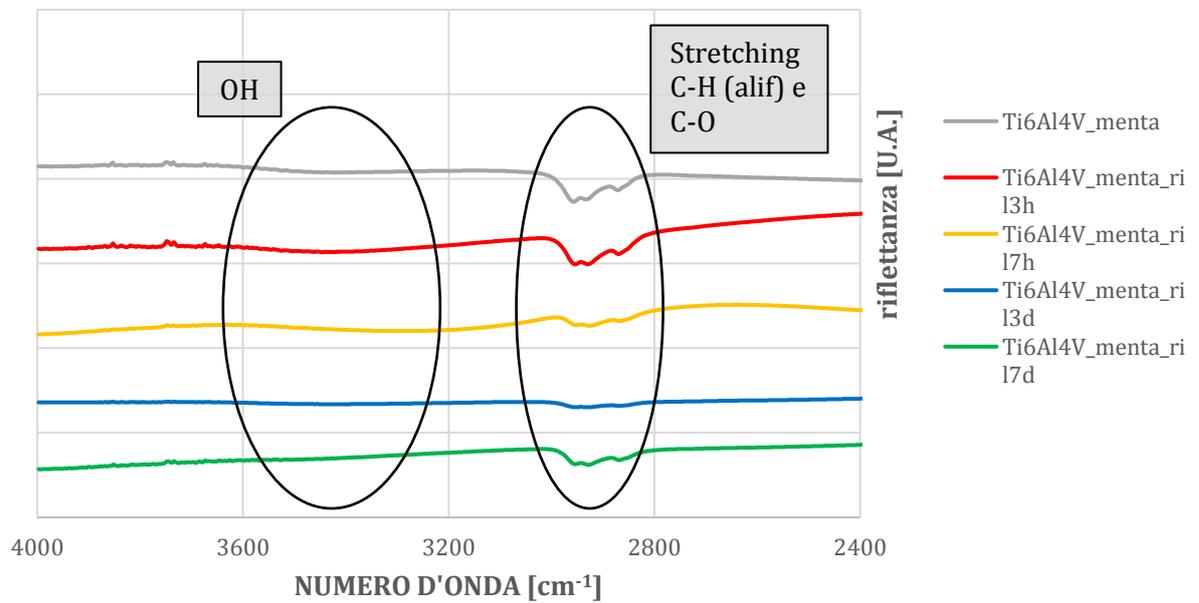
Comparando i due spettri si può notare che quello rivestito presenta i picchi associabili all'OE, confermando quindi la presenza del *coating* rispetto al campione di controllo, in cui tali picchi non sono presenti.

La figura 5.7 mostra il confronto tra gli spettri appartenenti ai campioni Ti6Al4V_menta_ril3h, Ti6Al4V_menta_ril7h, Ti6Al4V_menta_ril3d e Ti6Al4V_menta_ril7d, permettendo di verificare le possibili variazioni dovute ai tempi di rilascio.

FTIR Ti6Al4V_menta con differenti tempi di rilascio
(A)



FTIR Ti6Al4V_menta con differenti tempi di rilascio
(B)



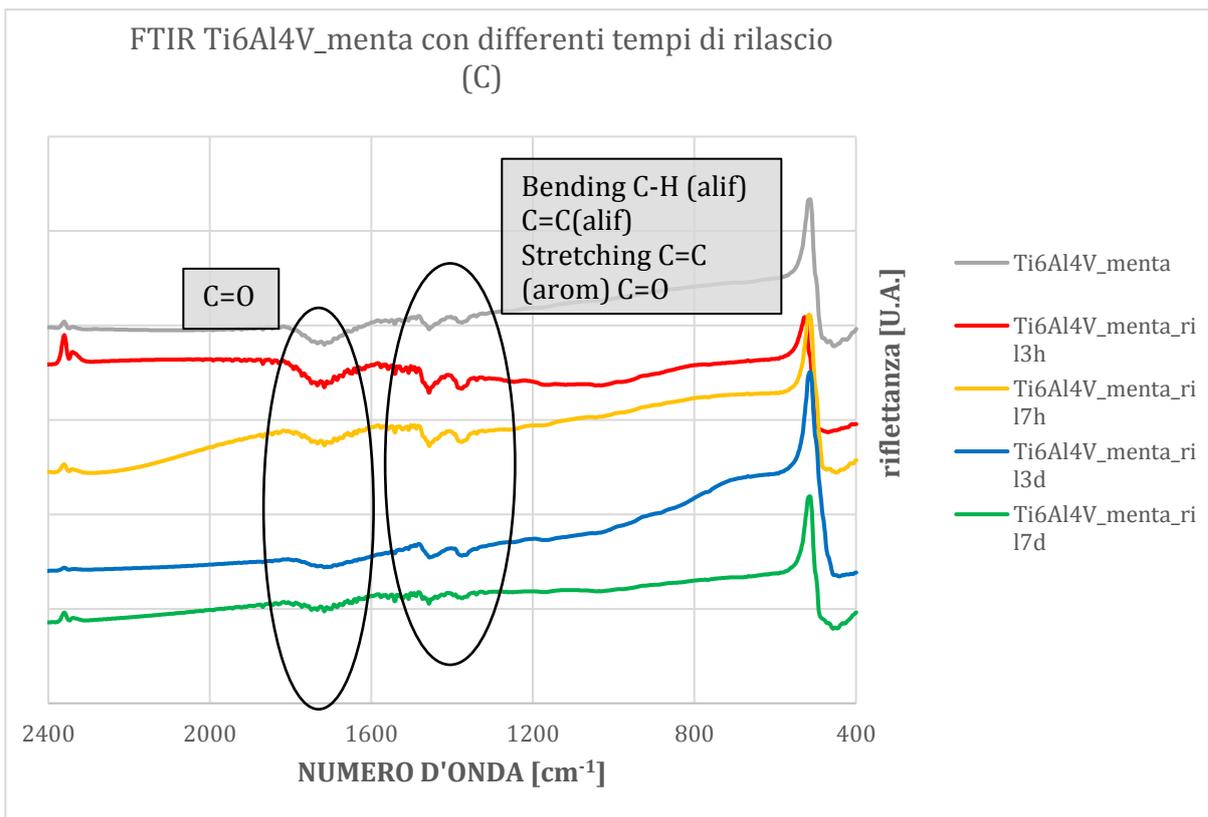


Figura 5.7: Spettri FTIR dei campioni Ti6Al4V_menta_ril3h, Ti6Al4V_menta_ril7h, Ti6Al4V_menta_ril3d e Ti6Al4V_menta_ril7d nei range A) 400-4000 cm⁻¹, B)2400-4000 cm⁻¹, C) 400-2400 cm⁻¹.

In tutti gli spettri riportati sono individuabili i picchi dovuti alla presenza del *coating* ed è importante e funzionale, ai fini del lavoro svolto, notare che tra i campioni non ci siano modifiche sostanziali indotte dal differente tempo di rilascio.

Si fa presente che sembra esserci una riduzione della pancia OH rispettivamente per i campioni steel_menta_ril3d e steel_menta_ril7d.

A seguire vengono considerati i campioni CT e CT_menta, riportati in figura 5.8, in modo da far emergere i cambiamenti sostanziali procurati dalla presenza del *coating* in relazione al campione di controllo.

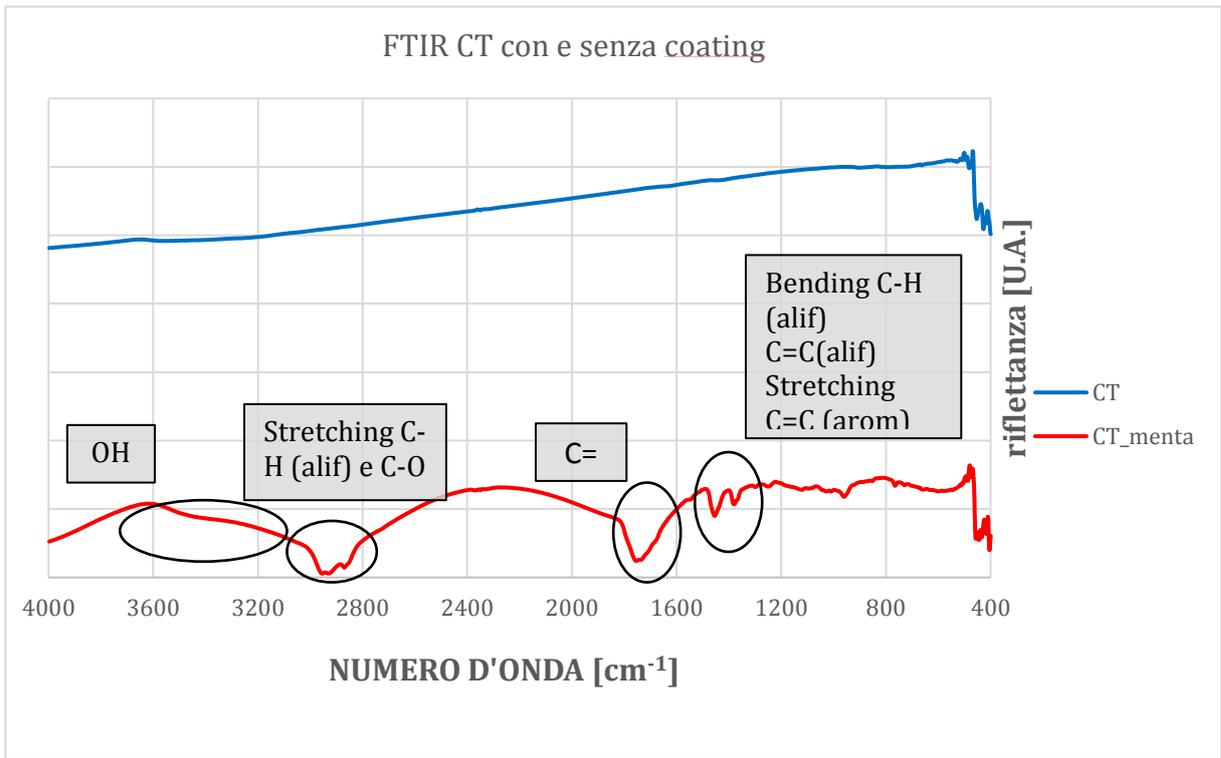
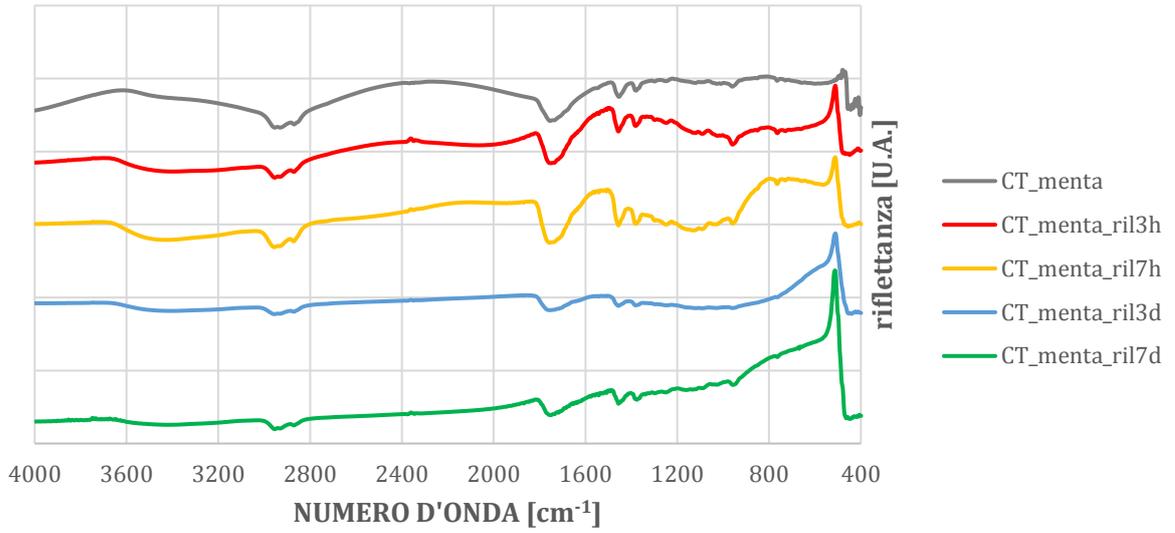


Figura 5.8: spettri FTIR dei campioni CT e CT_menta tra 400 e 4000 cm^{-1} .

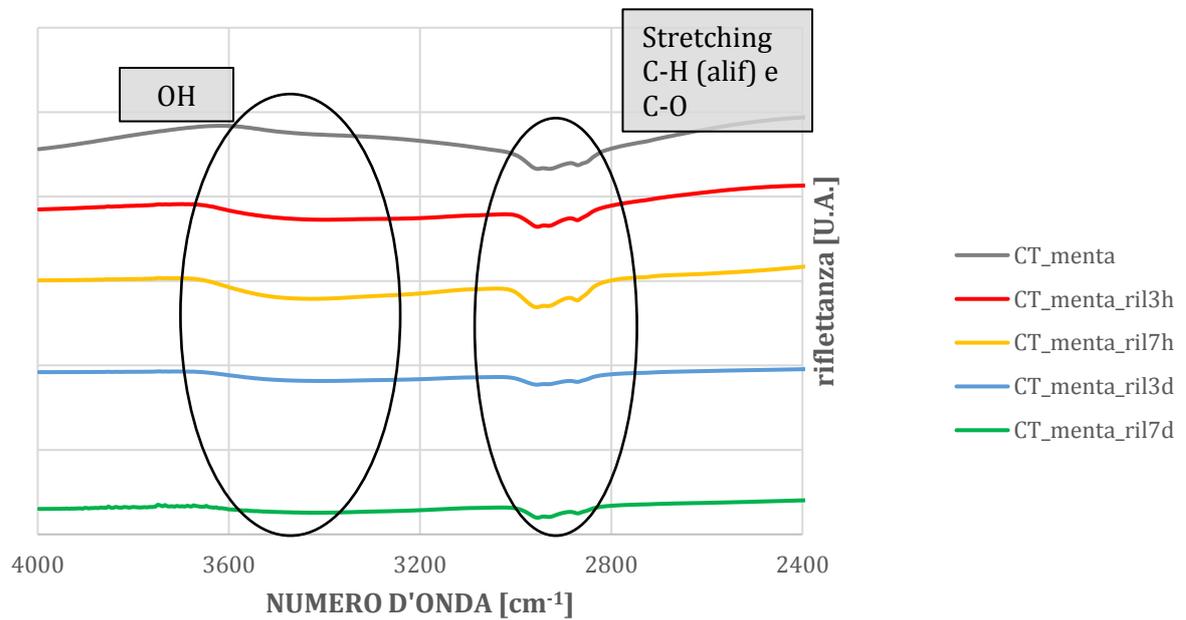
Attraverso il confronto dei due spettri, la presenza di picchi dovuta all'OE ci consente, nuovamente, di accertare e rilevare il mantenimento del *coating*.

La figura 5.9 permette di comparare gli spettri dei campioni CT_menta_ril3h, CT_menta_ril7h, CT_menta_ril3d, CT_menta_ril7d.

FTIR CT_menta con differenti tempi di rilascio
(A)



FTIR CT_menta con differenti tempi di rilascio
(B)



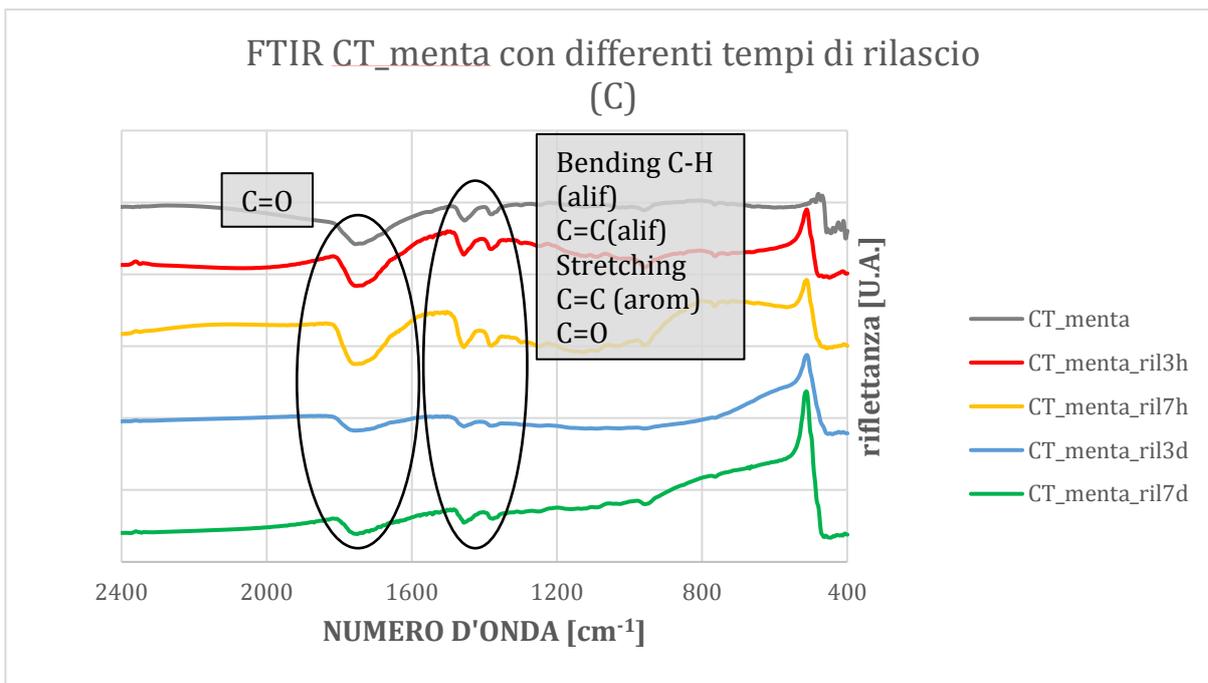


Figura 5.9: Spettri FTIR dei campioni CT_menta_ril3h, CT_menta_ril7h, CT_menta_ril3d e CT_menta_ril7d nei range A) 400-4000 cm⁻¹, B) 2400-4000 cm⁻¹, C) 400-2400 cm⁻¹.

La presenza del *coating* viene registrata anche nei campioni CT, osservando la presenza dei picchi dell'OE in ciascuno degli spettri analizzati; inoltre, pur con tempi di rilascio diversi, non sono rilevabili differenze importanti tra i diversi campioni.

Gli spettri relativi ai campioni steel_menta e il campione di controllo steel sono riportati in figura 5.10.

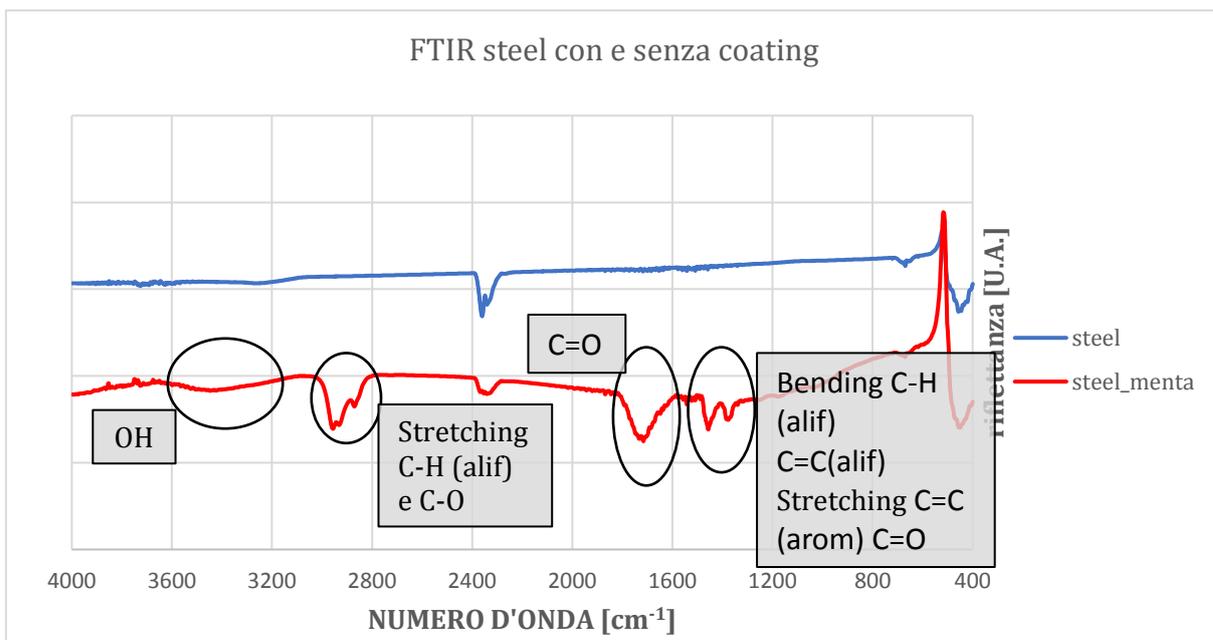
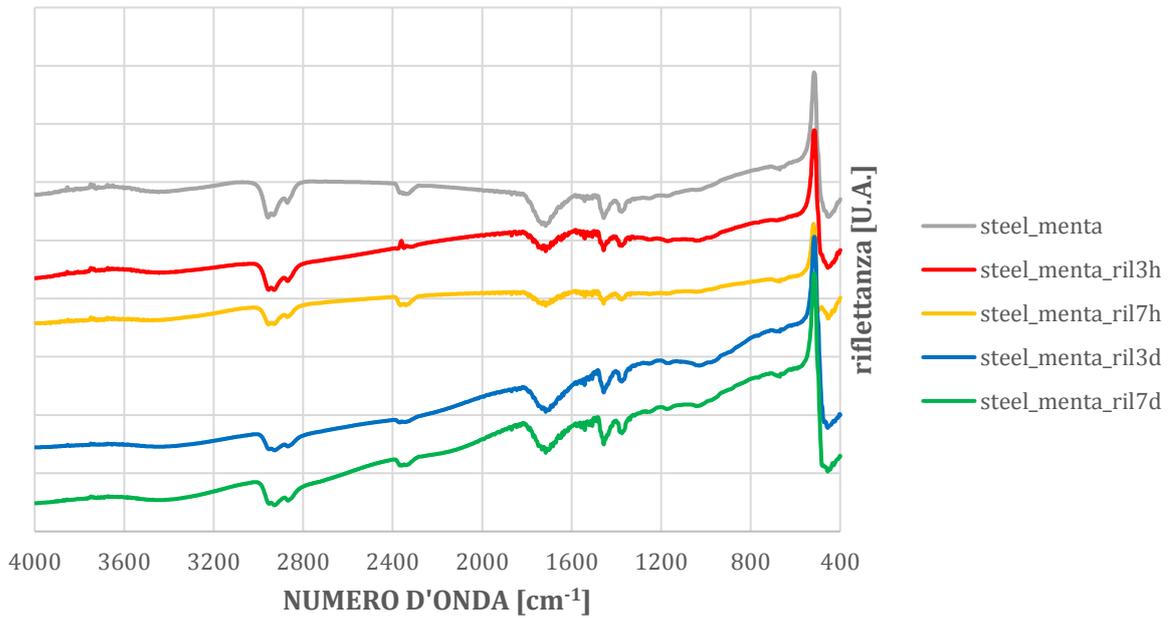


Figura 5.10: spettri FTIR dei campioni steel e steel_menta tra 400 e 4000 cm⁻¹.

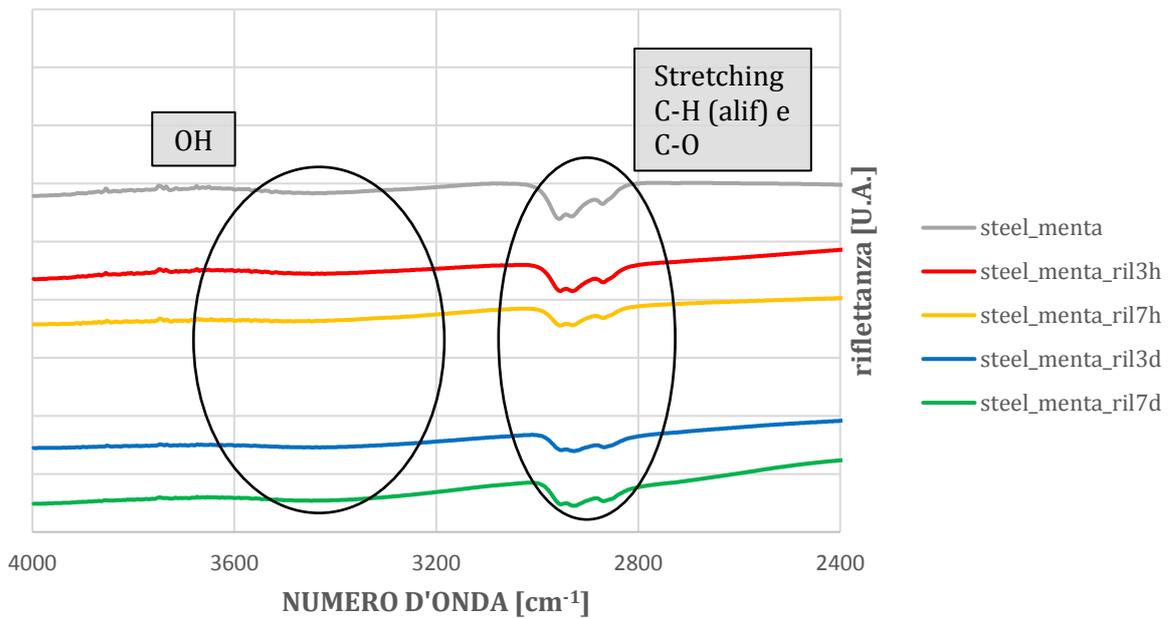
Come nei casi precedenti, le differenze tra il campione trattato e quello di controllo si evincono dalla presenza dei picchi caratteristici dell'OE e sono criterio di verifica della presenza del *coating*.

Il confronto tra i campioni steel_menta_ril3h, steel_menta_ril7h, steel_menta_ril3d e steel_menta_ril7d è presentato in figura 5.11.

FTIR steel_menta con differenti tempi di rilascio
(A)



FTIR steel_menta con differenti tempi di rilascio
(B)



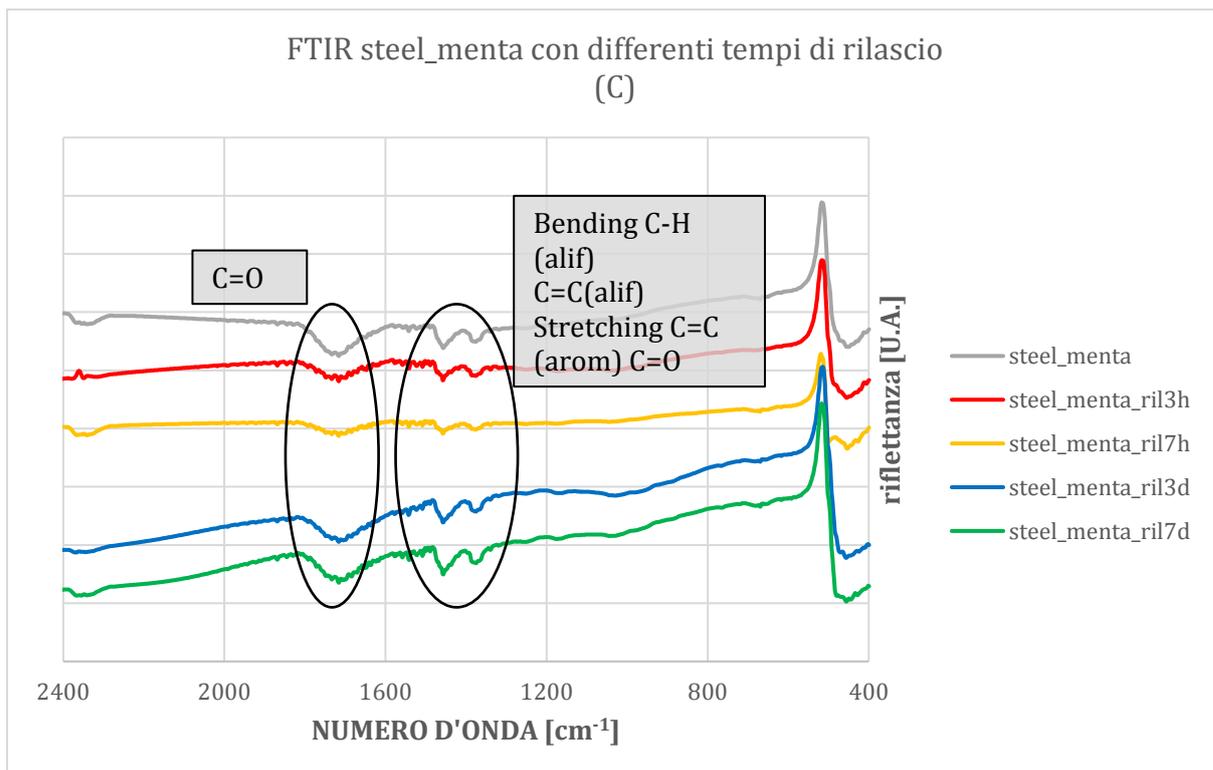


Figura 5.11: Spettri FTIR dei campioni steel_menta, steel_menta_ril3h, steel_menta_ril7h, steel_menta_ril3d e steel_menta_ril7d nei range A) 400-4000 cm⁻¹, B) 2400-4000cm⁻¹, C) 400-2400 cm⁻¹.

Analogamente agli altri substrati presi in esame, anche per questi campioni è importante la prova che, in virtù della presenza dei picchi caratteristici dell'OE, negli spettri considerati, il *coating* superficiale persiste e non si distinguono, particolari diversità spettroscopiche in relazione ai tempi di rilascio.

5.4.1 FTIR: confronto tra i campioni rivestiti con e senza il distacco

L'analisi FTIR è stata svolta anche per effettuare un confronto fra gli spettri dei campioni rivestiti con il *coating* di OE dopo un rilascio in acqua di 7 giorni, senza e con il distacco in etanolo, al fine di mettere in evidenza i componenti legati in superficie. L'indagine spettroscopica è tesa a valutare se la modalità di distacco utilizzata sia stata efficace per rimuovere il coating. È utile – come già detto – verificare il distacco di esso per studiare, tramite un'analisi chimica successiva, la composizione del rivestimento.

La figura 5.12 mostra gli spettri appartenenti ai campioni CT_menta_ril7d e CT_menta_ril7d_dis.

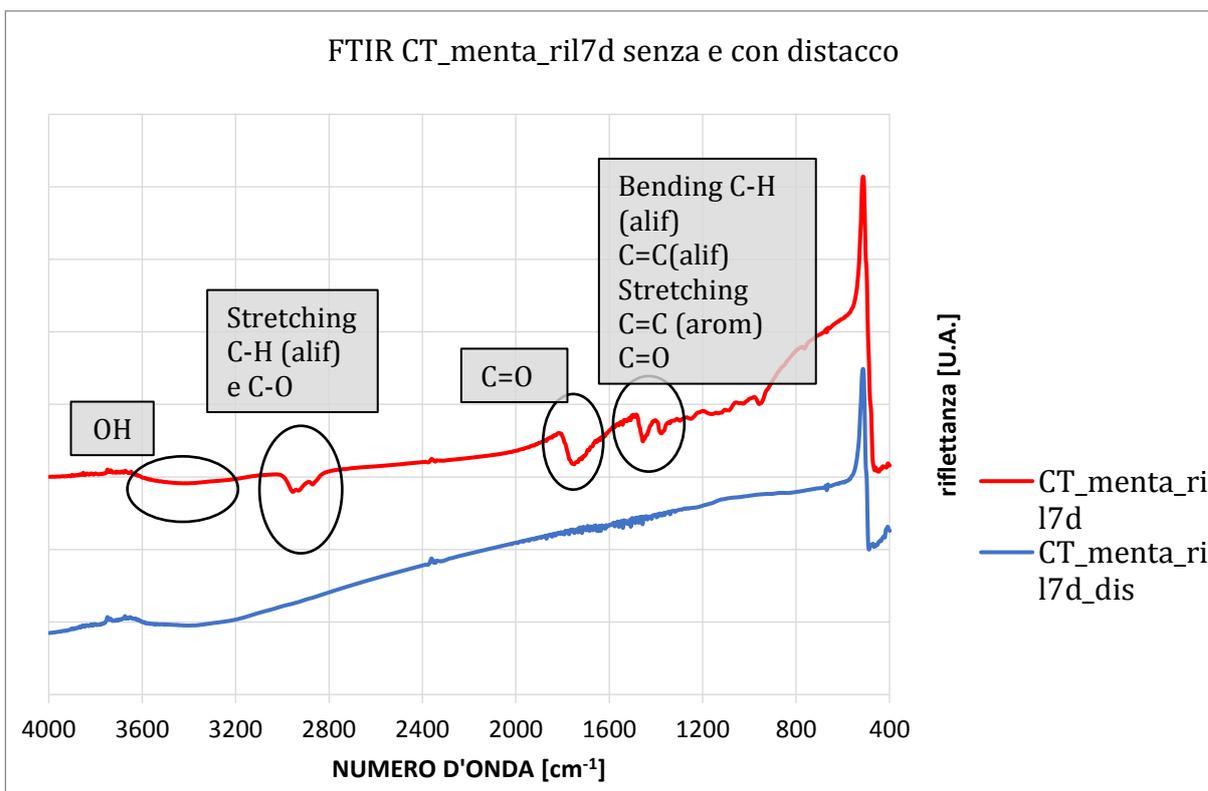


Figura 5.12: spettri FTIR dei campioni CT_menta_ril7d e CT_menta_ril7d_dis tra 400 e 4000 cm^{-1} .

Si rilevano, qui, differenze notevoli tra gli spettri che confermano l'avvenuto distacco del *coating*, il cui spettro è privo dei picchi caratteristici dell'OE, osservabili in quello riferito al campione prima del distacco. Se ne deduce che la tipologia di distacco è stata efficace e che, come atteso, il *coating* è stato solubilizzato nella soluzione distaccante e può quindi essere chimicamente analizzato.

5.4.2 FTIR: confronto tra i campioni funzionalizzati con e senza il distacco

Si è proceduto, sempre tramite analisi FTIR, al confronto fra gli spettri dei campioni CT funzionalizzati con il trans - cariofillene, prima e dopo il distacco, per valutarne la presenza nel rivestimento. In base a studi precedenti [5], il trans-cariofillene si è rivelata quale biomolecola con spiccata affinità al substrato, dopo il trattamento *soaking*. Infatti, la superficie dei campioni funzionalizzati ha manifestato la

persistenza di trans-cariofillene, anche se esso è una frazione minoritaria dell'OE.

In figura 5.13 sono confrontati gli spettri dei campioni CT_transcariof(*soaking*) e CT_transcariof(*soaking*)_dis, allo scopo di individuare eventuali differenze che metterebbero in risalto la funzionalizzazione con il trans - cariofillene.

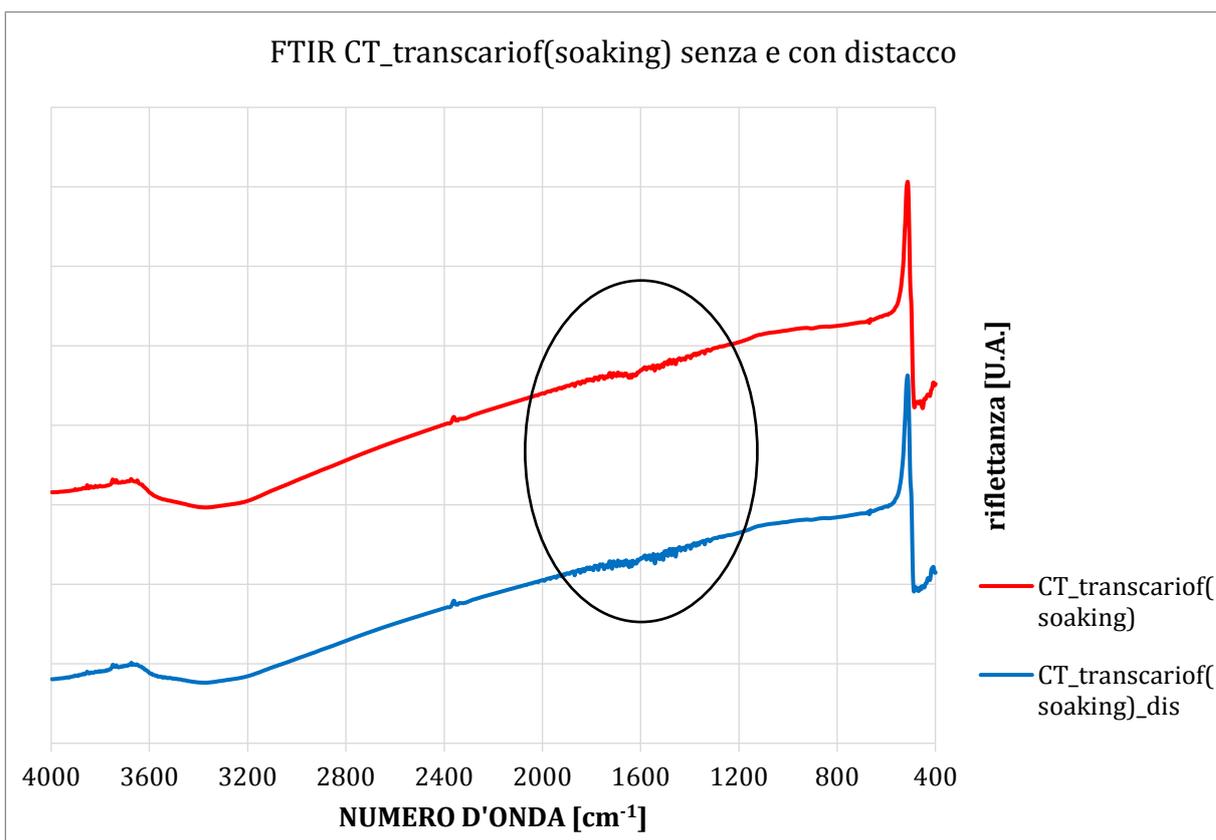


Figura 5.13: spettri FTIR dei campioni CT_transcariof(*soaking*) e CT_transcariof(*soaking*)_dis tra 400 e 4000 cm^{-1} .

Osservando l'andamento degli spettri, nell'area di interesse – evidenziata nella rappresentazione grafica – lo spettro è troppo rumoroso per rilevare evidenti differenze tra i campioni prima e dopo il distacco; pertanto questa tecnica, risultata non sufficiente al fine di verificare la presenza del trans - cariofillene, ha implicato il ricorso ad una successiva analisi, cioè all'esame gascromatografico.

5.4.3 FTIR: confronto tra i campioni funzionalizzati con e senza il distacco

Si sono, altresì, considerati i campioni funzionalizzati prima e dopo il distacco, CT_50%menta(*soaking*) e CT_50%menta(*soaking*)_dis, nella prospettiva di mettere in rilevanza quali elementi si siano legati alla superficie.

Gli spettri dei campioni CT_50%menta(*soaking*) e CT_50%menta(*soaking*)_dis sono rappresentati in figura 5.14.

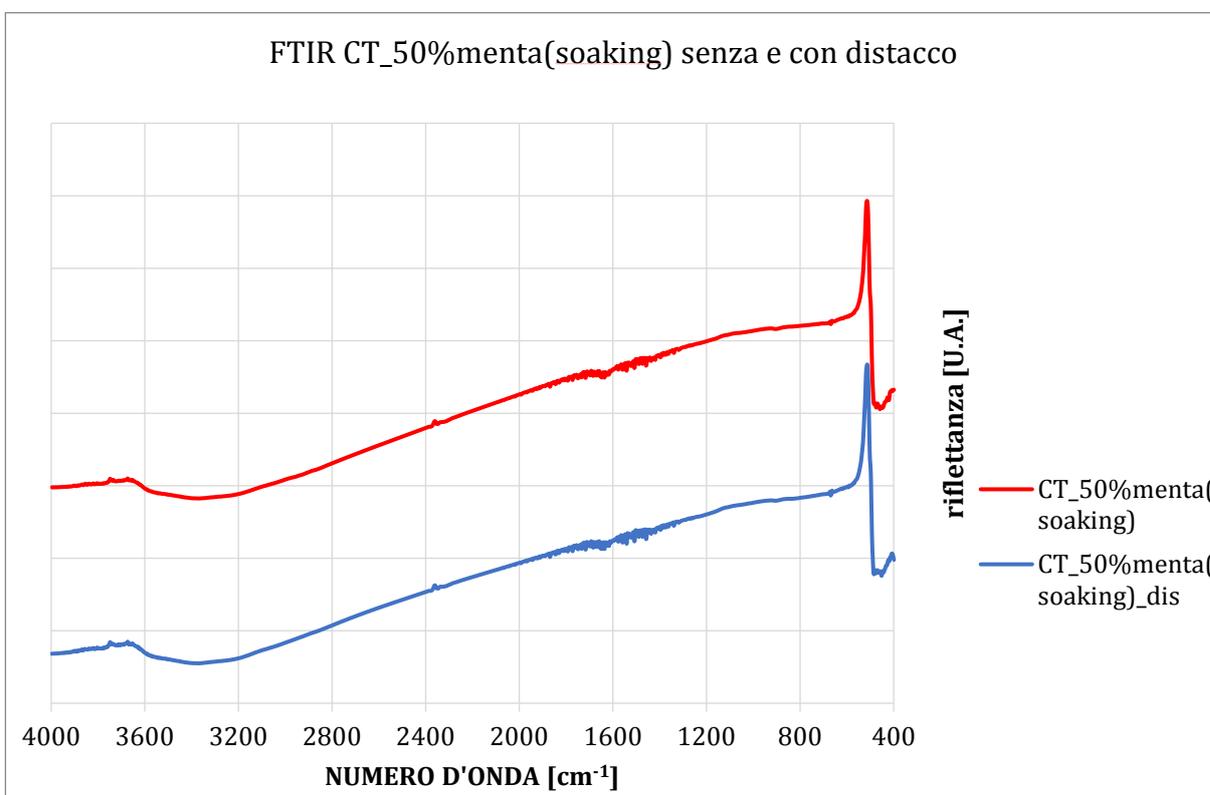


Figura 5.14: spettri FTIR dei campioni CT_50%menta(*soaking*) e CT_50%menta(*soaking*)_dis tra 400 e 4000 cm⁻¹.

Il grafico mostra la mancanza di differenze significative tra gli spettri analizzati, al contrario di quanto era emerso nel precedente studio [5]. L'analisi gascromatografica, svolta successivamente, ha consentito di produrre una possibile spiegazione al riguardo, dipendente dalla presenza di contaminanti superficiali.

5.5 Analisi gas-cromatografica

L'analisi gas-cromatografica è stata svolta sulle soluzioni ottenute in seguito al distacco delle molecole del *coating* o funzionalizzate dalla superficie.

Nello specifico sono state analizzate quelle relative a:

- CT_menta_ril7d_dis (C1)
- CT_50%menta(*soaking*)_dis (C2)
- CT_transcariof(*soaking*)_dis (C3)
- acqua_CT_menta_ril7d (C4)

Eseguendo il normale protocollo, utilizzato nei precedenti lavori per l'OE di menta, descritto nel paragrafo 4.8, sono stati iniettati 3 μ m in GC-MS (gascromatografia-spettrometria di massa).

Tuttavia, questa prima analisi non ha fornito dati utili, in quanto non ha rilevato alcun picco attribuibile al trans - cariofillene. I profili gascromatografici, infatti, sono risultati disturbati dalla presenza di una serie di picchi contaminanti a tempi di ritenzione costanti. La contaminazione è stata attribuita ad alcani di superficie e/o paraffine.

Per ovviare al problema, si è proceduto con un'analisi in SIM (Selected Ion Monitoring), che permette di cercare in modo più specifico e preciso l'analita di interesse, anche se esso risulta mascherato da altri analiti. Questo approccio ha fornito risultati soddisfacenti, mostrando la presenza del trans - cariofillene nei campioni analizzati, eccetto nell'acqua di rilascio (acqua_CT_menta_ril7d). Nella tabella 5.3 sono riportati i dati ottenuti.

Tabella 5.3: dati dell'analisi in SIM

CAMPIONI	DESCRIZIONE	RT	AREA	ng/ μ L	ng totali	μ g totali
C0	Trans-caryophyllene standard	20,66	180411	17,88	1788	1,788
C1	Ril EtOH CT + menta 7d in H2O	20,7	190091	18,85	1885	1,885
C2	Ril EtOH CT + 50% menta	20,69	7442	0,57	57	0,057
C3	Ril EtOH CT + Trans-caryophyllene	20,68	112310	11,06	1106	1,106
C4	CT + menta B Ril H2O 7d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

I risultati ribadiscono l'affinità tra il trans - cariofillene e il campione CT, come si evince dalla concentrazione pari a 18.85 ng/ μ L relativa al campione CT_menta_ril7d_dis. Un'ulteriore conferma scaturisce dall'assenza del composto nell'acqua_CT_menta_ril7d, che dimostra il mancato rilascio in

acqua di questo componente dell'OE, che rimane, quindi, ancorato alla superficie del campione.

Confrontando i campioni CT_50%menta(*soaking*)_dis e CT_transcariof(*soaking*)_dis è osservabile una netta differenza tra le concentrazioni del trans - cariofillene, rispettivamente 0,57 ng/ μ L e 11,06 ng/ μ L. Considerando che in partenza il rapporto tra le concentrazioni della biomolecola si attestava a 10, l'analisi ha rilevato che esso è notevolmente incrementato.

5.6 Microscopia a fluorescenza

Nelle figure (Fig. 5.13, Fig.5.14, Fig. 5.15) sono rappresentate le immagini ottenute al microscopio a fluorescenza rispettivamente dei campioni prodotti in lega di titanio, CT e acciaio (ingrandimento 10x).

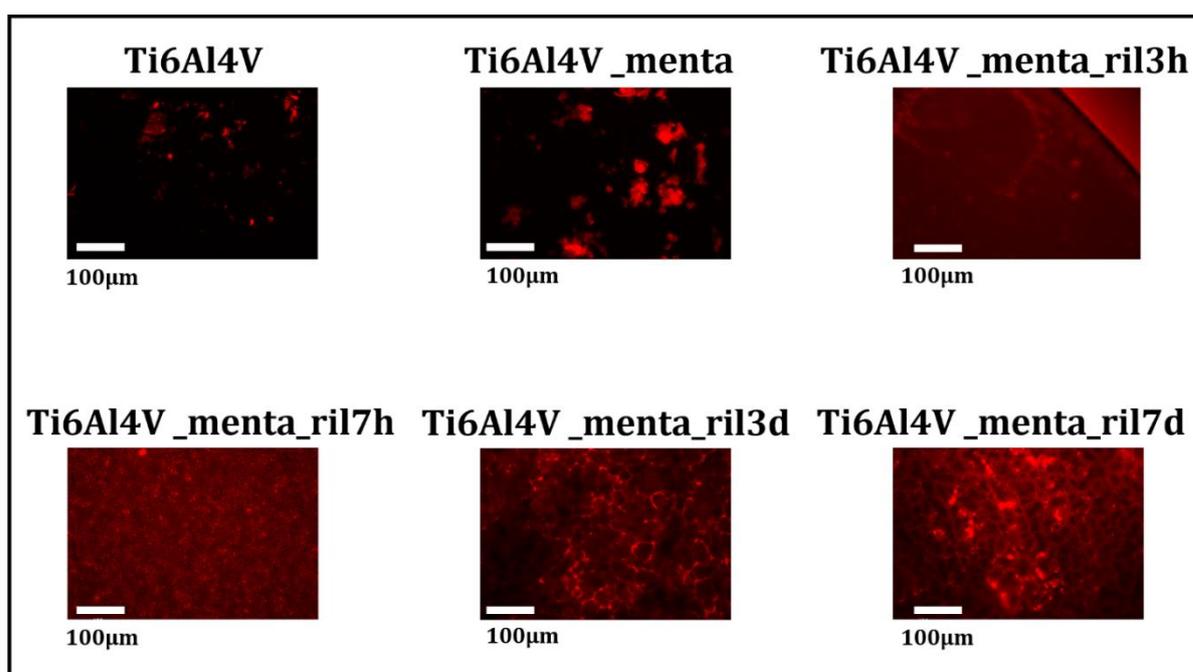


Figura 5.13: Immagini in microscopia a fluorescenza relative ai campioni Ti6Al4V, Ti6Al4V_menta, Ti6Al4V_menta_ril3h, Ti6Al4V_menta_ril7h, Ti6Al4V_menta_ril3d, Ti6Al4V_menta_ril7d.

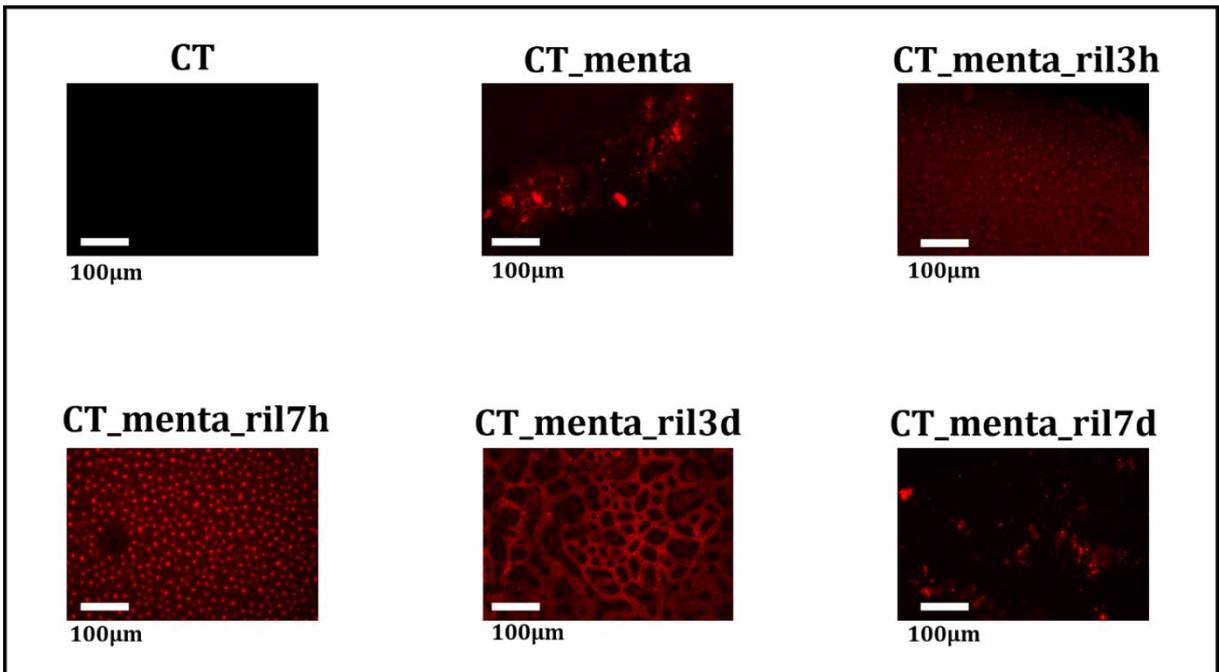


Figura 5.14: Immagini in microscopia a fluorescenza relative ai campioni: CT, CT_menta, CT_menta_ril3h, CT_menta_ril7h, CT_menta_ril3d, CT_menta_ril7d.

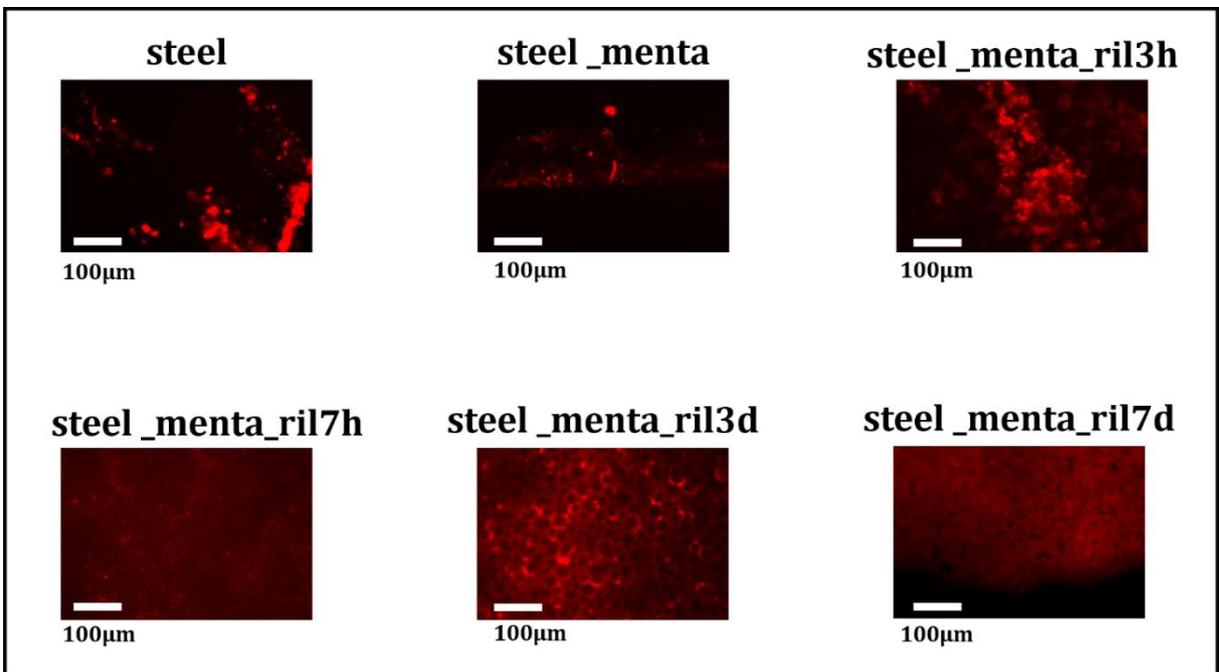


Figura 5.15: Immagini in microscopia a fluorescenza relative ai campioni: steel_menta_ril3h, steel_menta_ril7h, steel_menta_ril3d, steel_menta_ril7d, steel_menta, steel.

I campioni privi di rivestimento non emettono segnali fluorescenti, mentre, in presenza del *coating*, la superficie diventa fluorescente per via di alcuni componenti dell'OE che possiedono questa caratteristica.

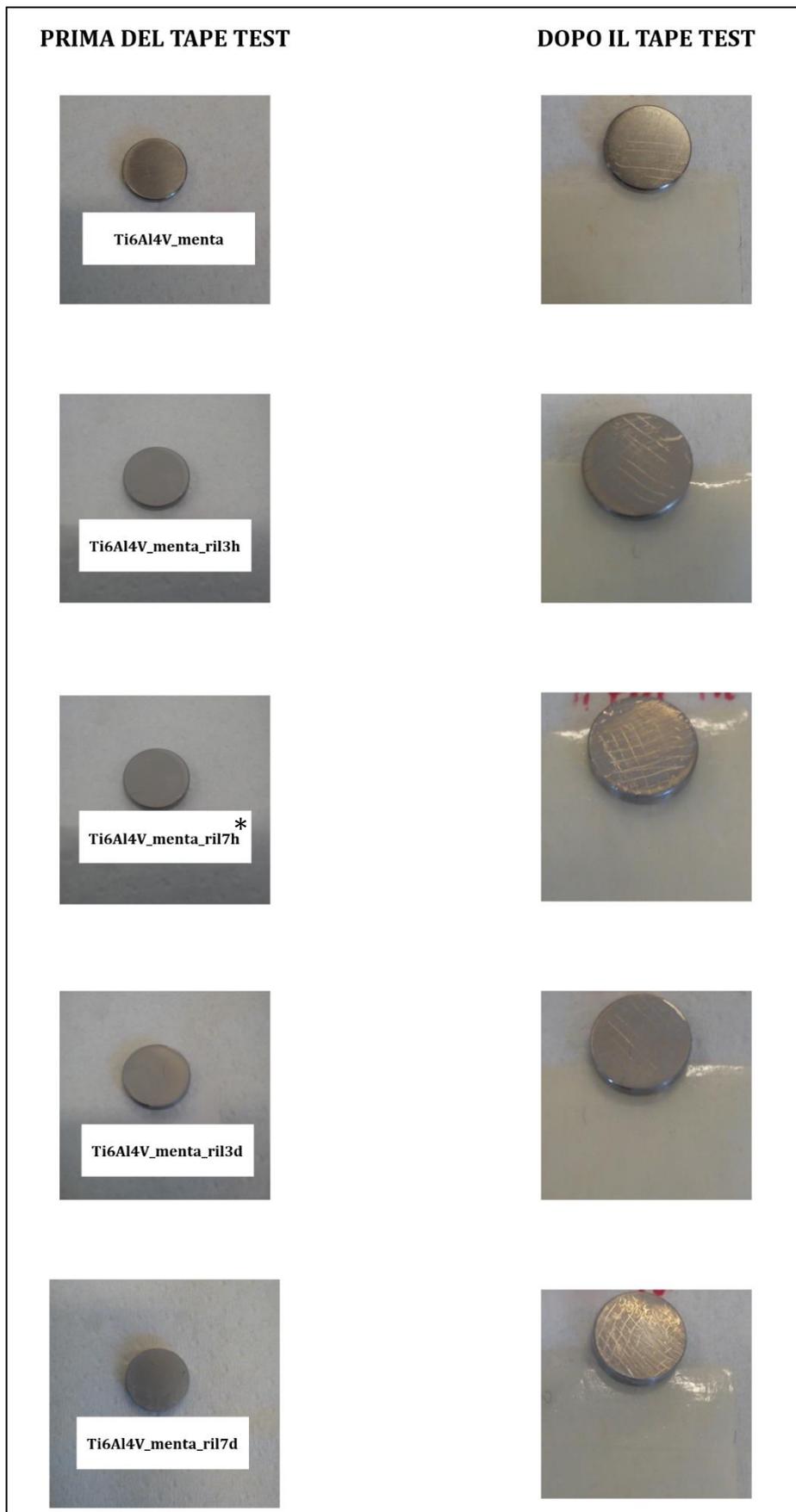
Alcuni campioni esibiscono una fluorescenza superficiale omogenea, certificando la presenza di un *coating* continuo e distribuito su tutta la superficie. Viceversa, in altri casi, ci sono zone con una fluorescenza più intensa, probabilmente dovuta alla presenza di aggregati di biomolecole fluorescenti, indice dunque di un rivestimento non uniforme. Dopo il rilascio, è possibile che il *coating* possa subire delle variazioni morfologiche che producano delle difformità riguardo la fluorescenza superficiale.

5.7 Tape test

Il test è stato eseguito per determinare le proprietà di adesione del rivestimento, sulla base della sua resistenza al distacco dopo l'applicazione del nastro adesivo.

In prima analisi, sono state considerate le differenze macroscopiche dei campioni esaminati prima e dopo il *tape test*, in seguito sono state svolte osservazioni al microscopio ottico a differenti ingrandimenti.

Nelle figure sotto riportate (Fig 5.16, Fig 5.17, Fig. 5.18), sono raffigurate le immagini relative ai campioni sottoposti al *tape test*, prima e dopo averlo eseguito, rispettivamente dei campioni prodotti in lega di titanio, CT e acciaio.



*in assenza dell'immagine ril7h, è stata usata quella ril3h, essendone buona approssimazione.

Figura 5.16: Confronto dell'aspetto dei campioni Ti6AL4V_menta prima e dopo il test.

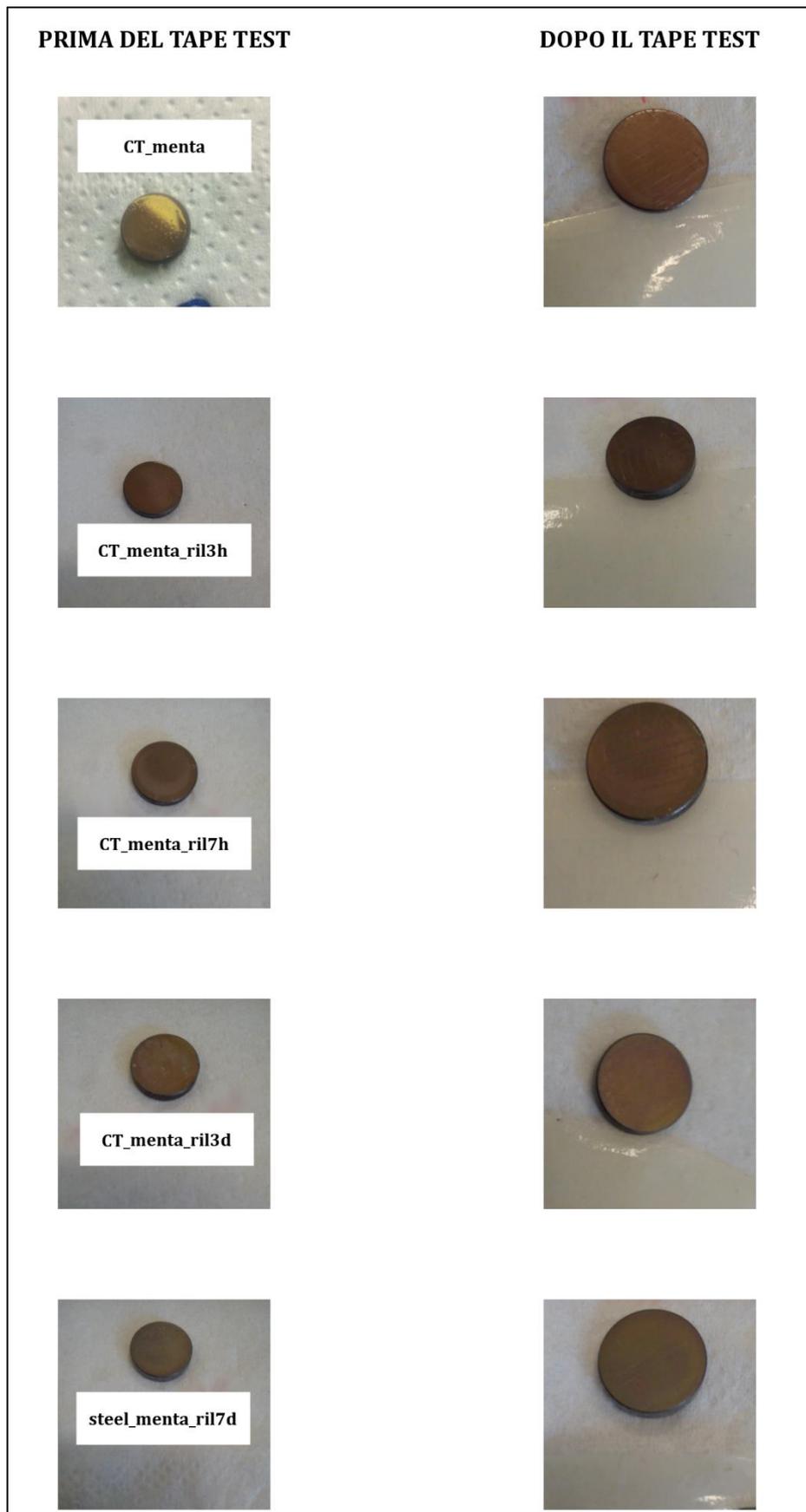
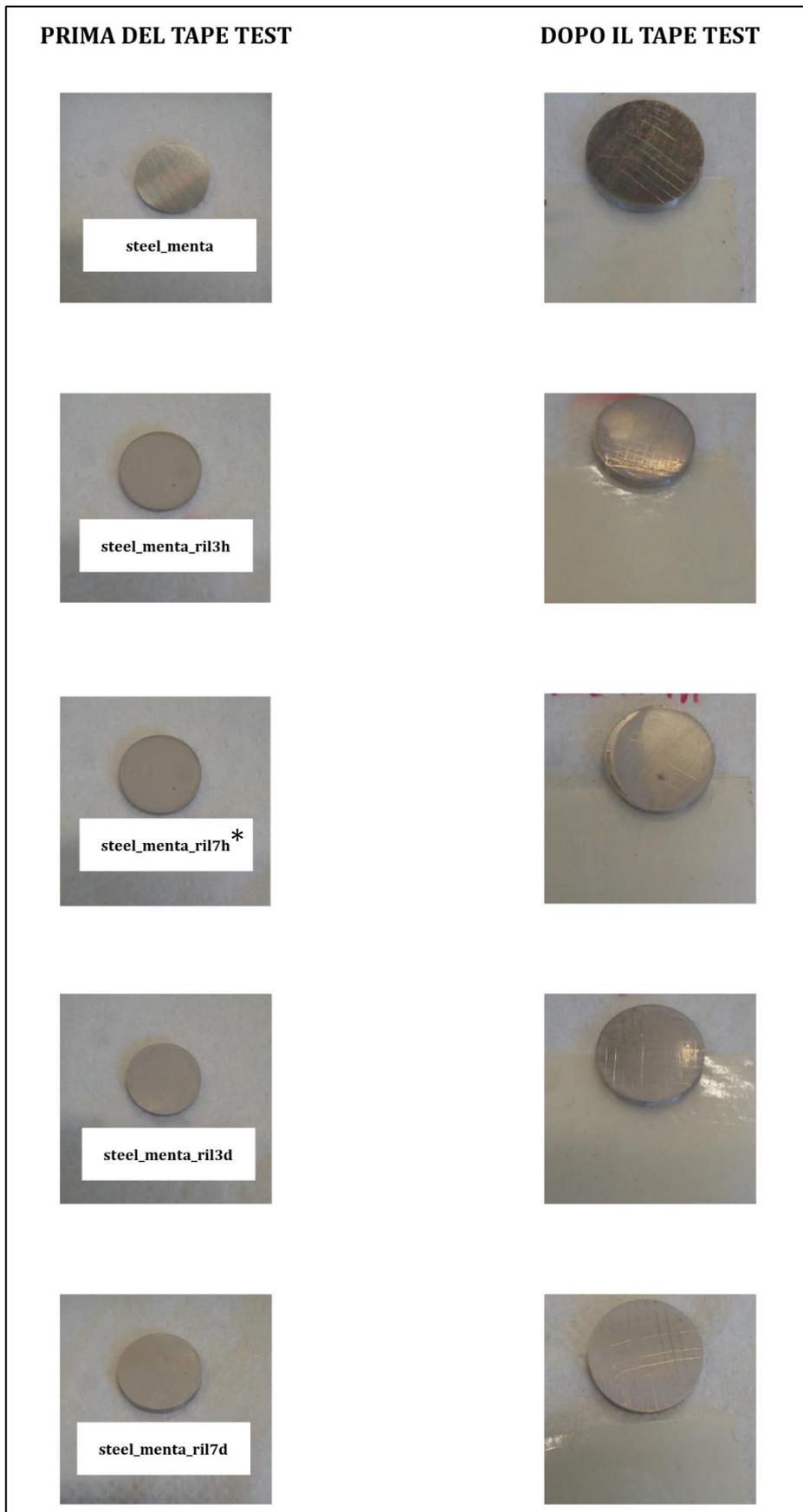


Fig. 5.17: Confronto tra l'aspetto dei campioni CT_menta prima e dopo il test.



* in assenza dell'immagine ril7h, è stata usata quella ril3h, essendone buona approssimazione.

Figura 5.18: Confronto tra l'aspetto dei campioni steel_menta prima e dopo il test.

Prima di applicare il nastro adesivo, è stata incisa la griglia sulla superficie del campione da testare e, con l'utilizzo di un pennello, sono stati rimossi i residui del taglio. Durante questo passaggio, si è notato che il pennello ha causato la comparsa di linee evidenti sulla superficie dei campioni, dovute allo spazzolamento, indice, quindi, di danneggiamento del *coating*.

Dopo la rimozione del nastro adesivo, si è osservata la presenza di un alone sul nastro, dovuta al parziale distacco del *coating*. Tuttavia, sulla superficie dei campioni, esso è ancora visibile, conferma della sua buona adesione alla superficie. Sembra dunque che sia avvenuta solo un'esfoliazione dei suoi strati superficiali.

Per i campioni soggetti al rilascio, la patina bianca, visibile sulla superficie prima del test, è stata rimossa. In generale, non c'è una differenza evidente tra i campioni a seconda del tempo di rilascio; quindi è presumibile che si trattasse solo di uno strato superficiale esterno del *coating* che è stato rimosso.

I rivestimenti dei campioni CT sono apparsi i meno danneggiati, rilevando quindi una migliore adesione al substrato trattato chimicamente.

Nelle figure 5.19, 5.20, 5.21 sono raccolte le immagini ottenute al microscopio ottico, rispettivamente dei campioni prodotti in lega di titanio, CT e acciaio, offrendo un confronto tra le superfici prima e dopo il *tape test*, valutando come si comporta il *coating* in seguito al test effettuato.

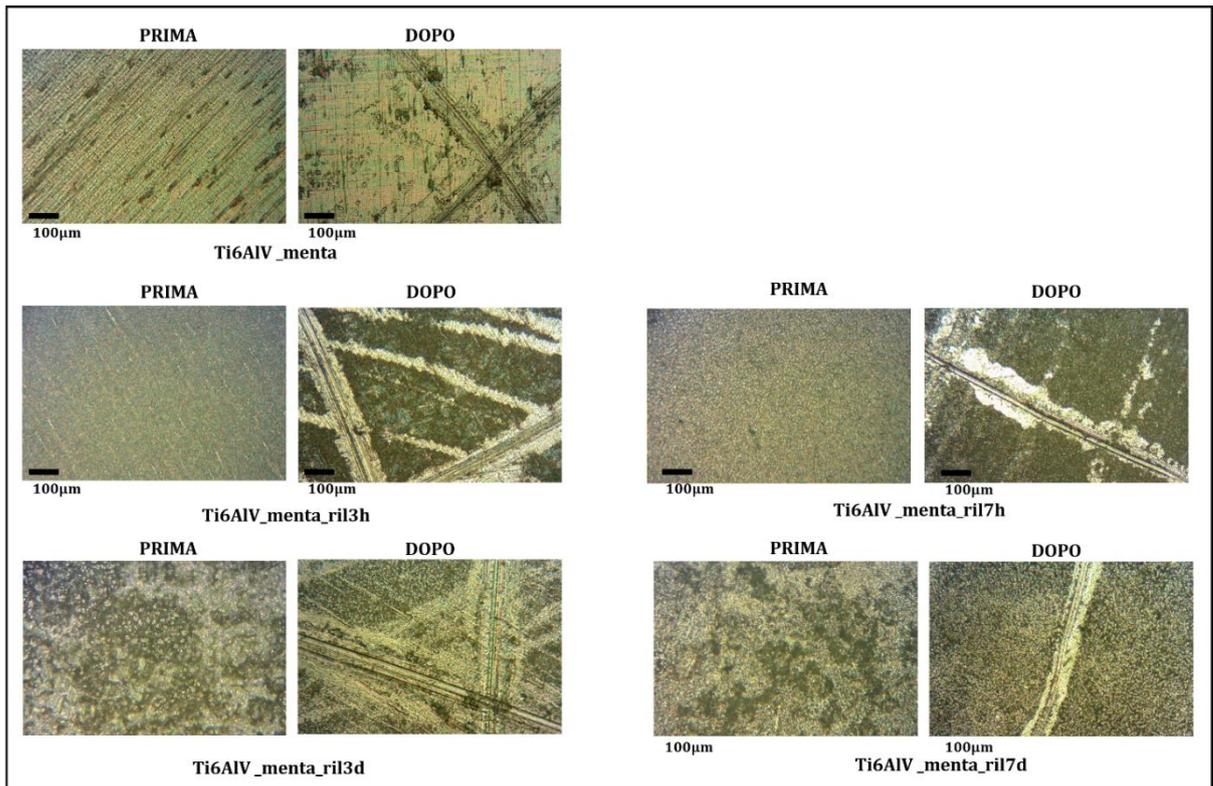


Figura 5.19: Aspetto dei campioni Ti6Al4V_menta, Ti6Al4V_menta_ril3h, Ti6Al4V_menta_ril7h, Ti6Al4V_menta_ril3d, Ti6Al4V_menta_ril7d prima e dopo il *tape test* (ingrandimento 10x).

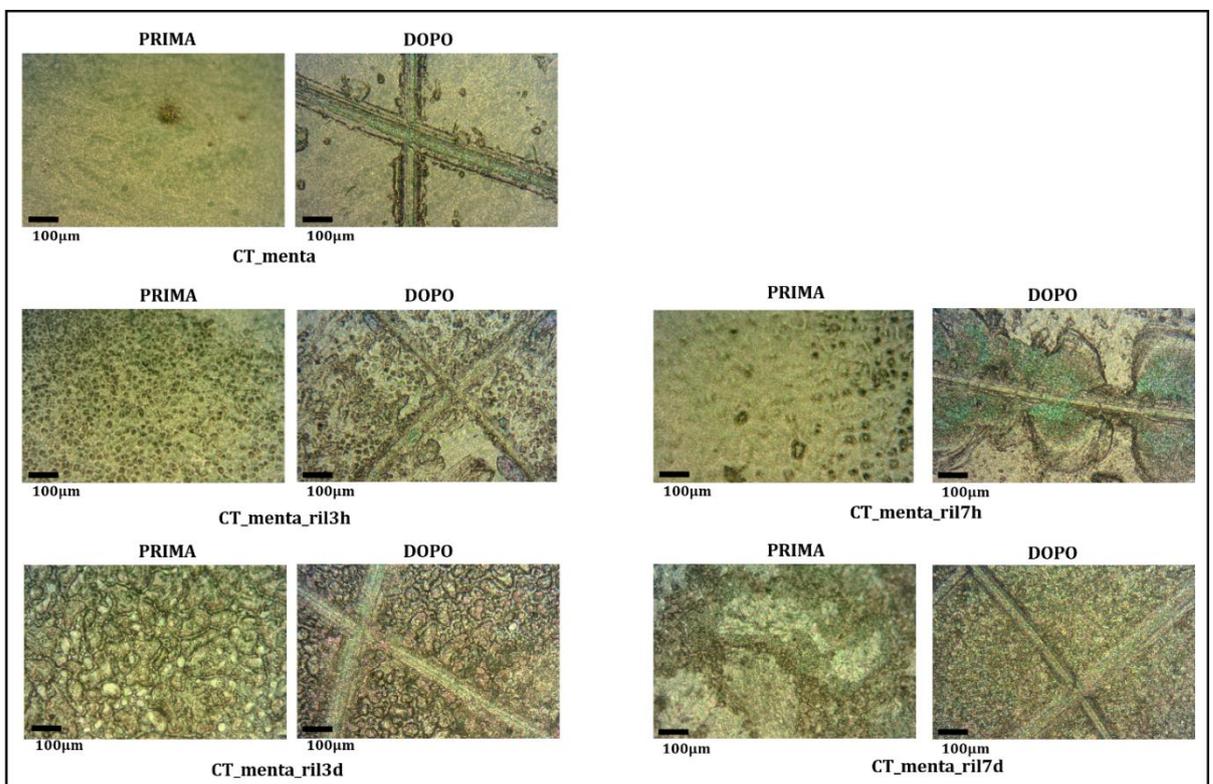


Figura 5.20: Aspetto dei campioni CT_menta, CT_menta_ril3h, CT_menta_ril7h, CT_menta_ril3d, CT_menta_ril7d prima e dopo il *tape test* (ingrandimento 10x).

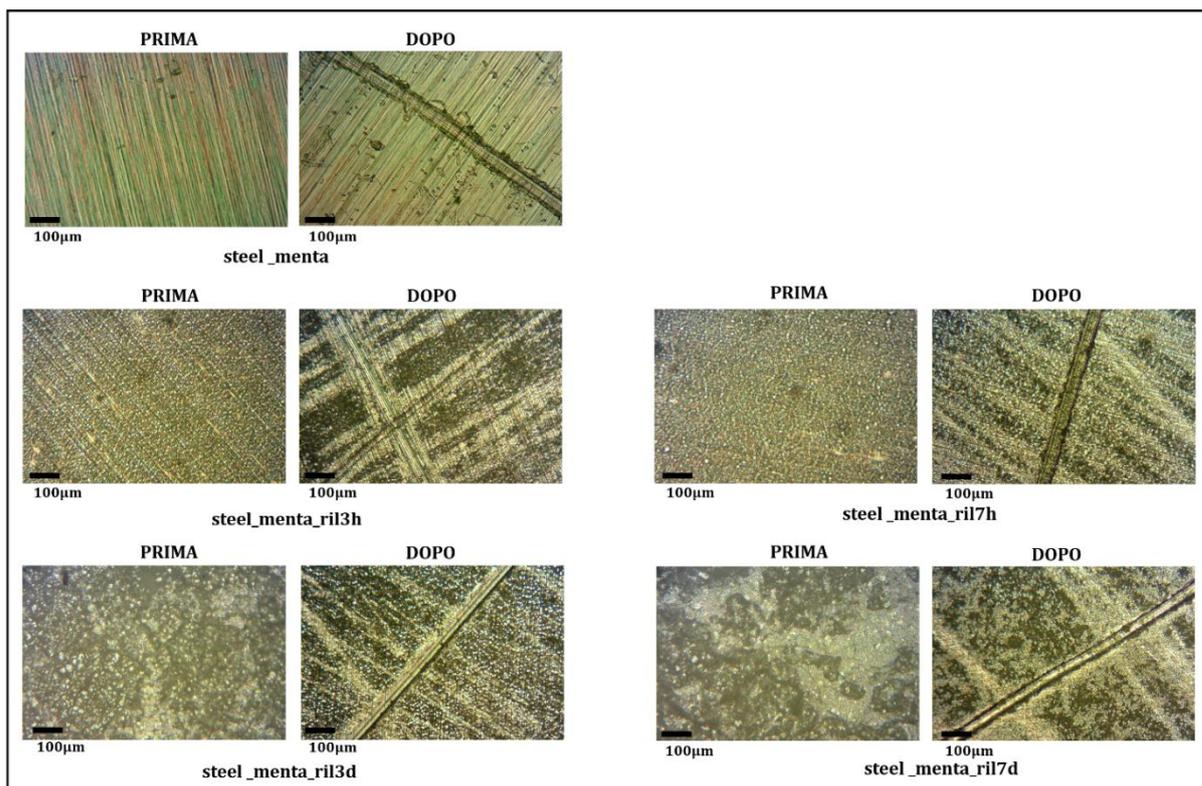


Figura 5.21: Aspetto dei campioni steel_menta, steel_menta_ril3h, steel_menta_ril7h, steel_menta_ril3d, steel_menta_ril7d prima e dopo il *tape test* (ingrandimento 10x).

Le immagini mostrano la presenza del *coating* di OE, anche dopo il test, e danno conferma della buona adesione sui materiali sperimentati, nonostante, in seguito al test, sia stata verificata una rimozione degli strati più superficiali del *coating*. Inoltre, la situazione aggressiva, indotta volutamente dall'incisione della griglia, ha provocato evidenti danneggiamenti e ha fornito ulteriori possibilità di analizzare i dati e fare comparazioni.

I segni lasciati dallo spazzolamento sono visibili anche nelle immagini riportate.

Particolarmente interessante risulta il distacco dello strato di *coating* relativo al campione CT_menta_7h, che sembrerebbe essere avvenuto in seguito alla formazione di bolle (*'boiling'*).

In figura 5.22 si evidenzia questo fenomeno a diversi ingrandimenti nel campione selezionato.

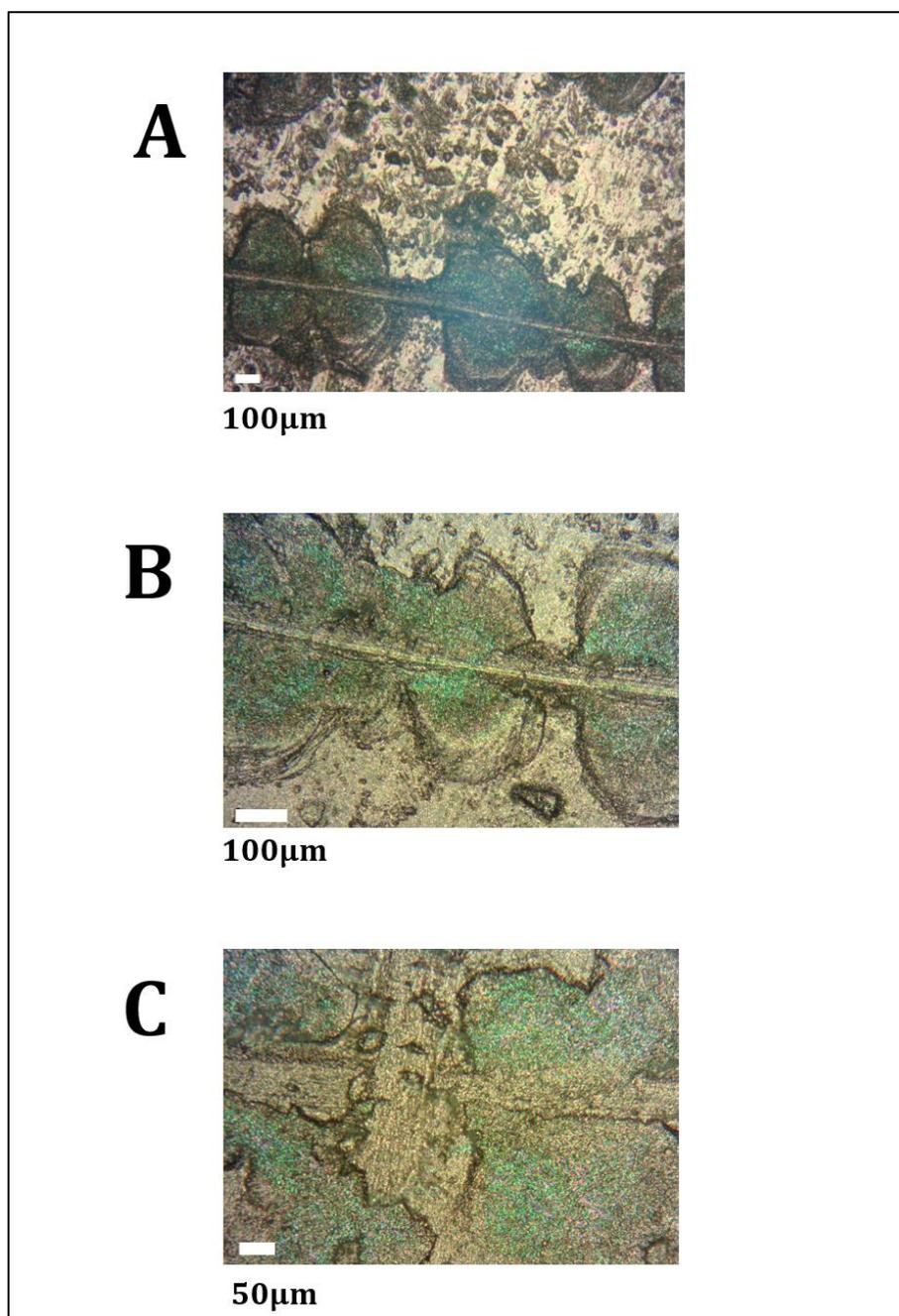


Figura 5.22: Aspetto del campione CT_menta_7h dopo il *tape test* in diversi ingrandimenti A) ingrandimento 5x, B) ingrandimento 10x, C) ingrandimento 20x.

L'adesione può essere classificata come 2B per tutti i campioni in lega di titanio e in acciaio, mentre per quelli CT una più corretta classificazione è 3B in conformità con lo standard ASTM D 3359 [9].

In figura 5.21, sono confrontate le immagini ottenute al microscopio ottico, del campione in acciaio irruogoso e non, prima e dopo il *tape test*, valutando come si comporta il *coating* in seguito al test effettuato.

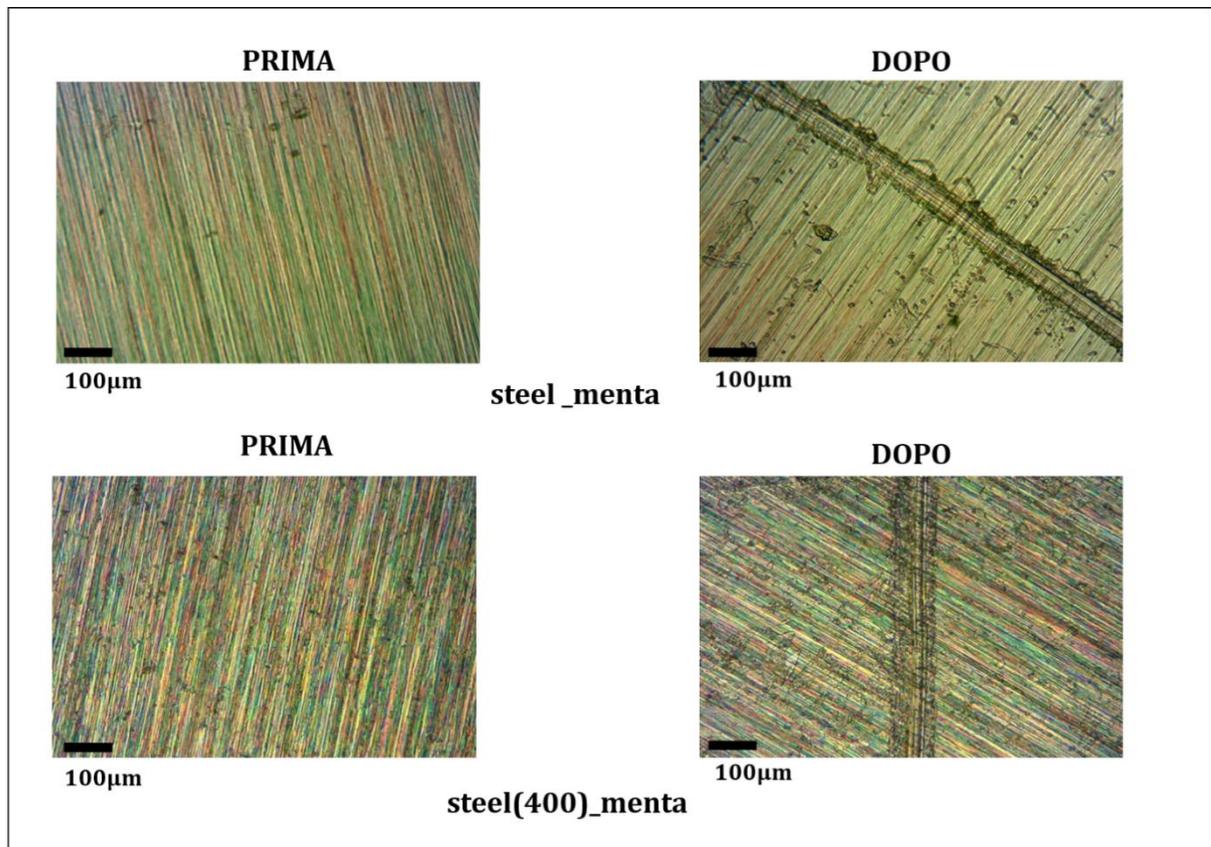


Figura 5.22: confronto tra il campione di controllo e il campione irruogoso prima e dopo il *tape test* (ingrandimento 10x).

Dal confronto delle immagini al microscopio prima e dopo il *tape test* si osserva come la rugosità abbia avuta un'influenza positiva migliorando l'adesione del *coating*.

5.8 Resistenza alla pulizia

L'importanza di testare la resistenza alla pulizia è legata a provare l'applicabilità del rivestimento in condizioni realistiche, in quanto esso sarà verosimilmente sottoposto al trattamento con comuni prodotti di pulizia per superfici in acciaio. Sulla base delle informazioni ricavate dalla letteratura scientifica [10] [11], le soluzioni scelte per il lavaggio sono H_2SO_4 , $NaOH$ e sgrassatore commerciale

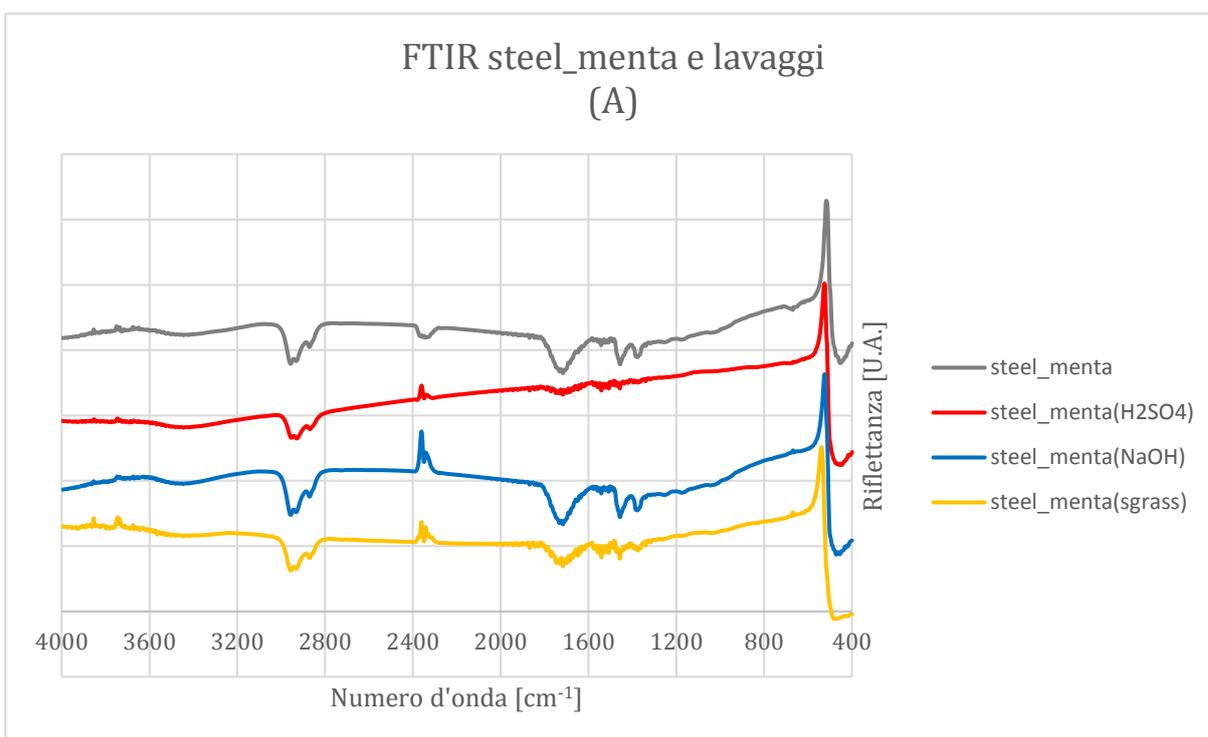
In tabella 5.4 sono riportate le misure del pH delle soluzioni sopra indicate, preparate per testare, appunto, la resistenza alla pulizia dei campioni in acciaio rivestiti con il *coating*.

Tabella 5.4: pH delle soluzioni testate

SOLUZIONI	pH
Soluzione H ₂ SO ₄	0,82
Soluzione NaOH	13,33
Sgrassatore commerciale	10,63

5.8.1 FTIR

In figura 5.24 è riportato il confronto tra gli spettri relativi al campione steel_menta, non sottoposto al lavaggio, e gli altri tre, steel_menta(H₂SO₄), steel_menta(NaOH), steel_menta(sgrass), trattati con le soluzioni di cui sopra.



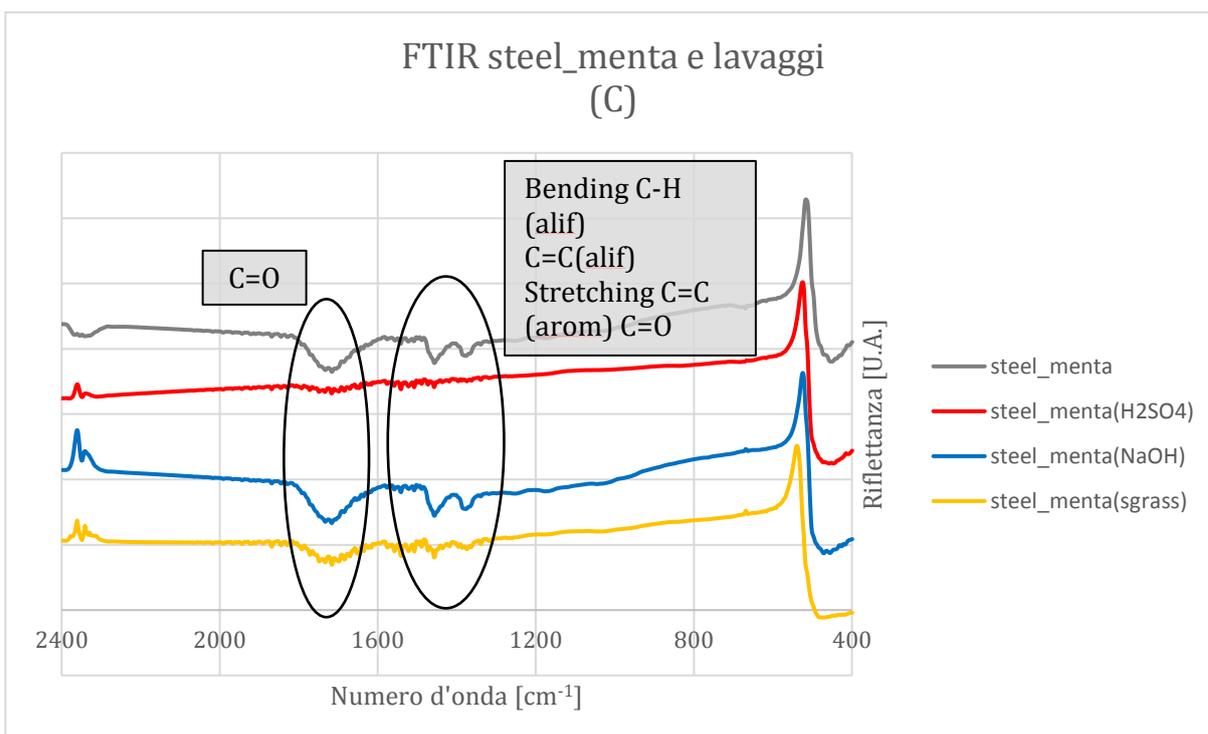
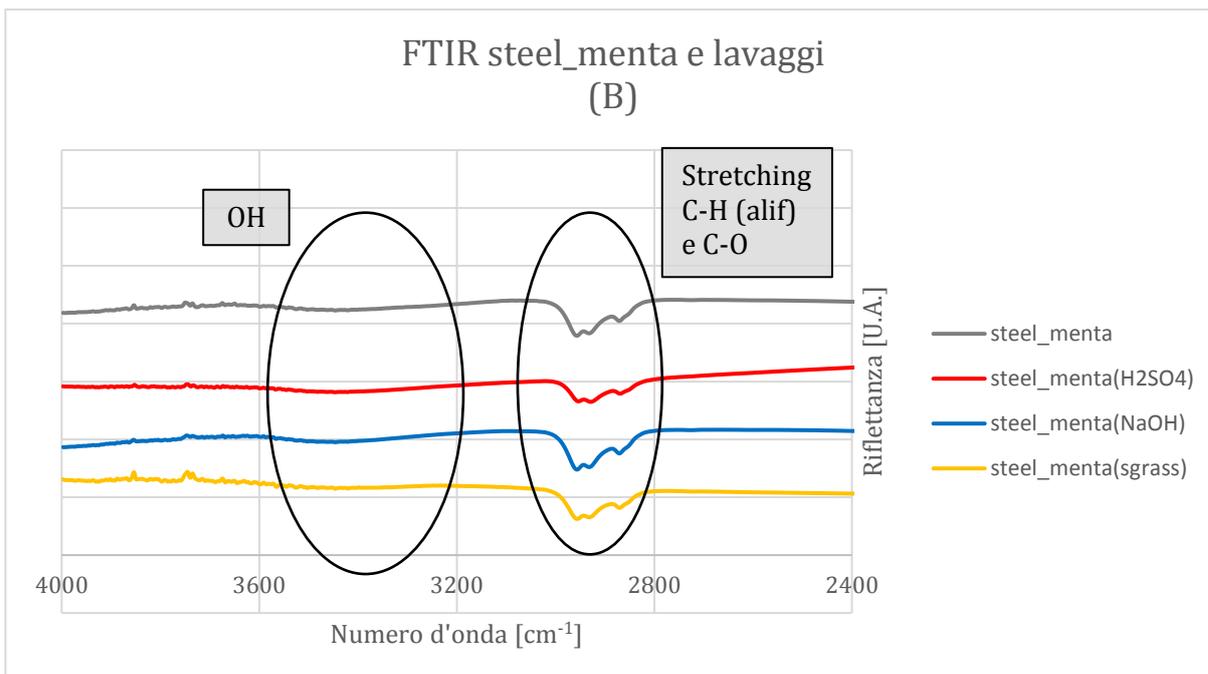


Figura 5.24: Spettri FTIR dei campioni steel_menta, steel_menta(H₂SO₄), steel_menta(NaOH), steel_menta(sgrass) nei range A) 400-4000 cm^{-1} , B) 2400-4000 cm^{-1} , C) 400-2400 cm^{-1} .

Dalle rappresentazioni grafiche, si può notare che, per il campione steel_menta(H₂SO₄), la soluzione acida abbia comportato una compromissione della componente organica. Diversamente, per gli altri due

campioni, le soluzioni basiche hanno preservato il rivestimento, come si può evincere dalla visibilità dei picchi caratteristici dell'OE.

5.8.2 TAPE TEST

L'indagine è proseguita con il *tape test* sempre per stimare l'adesione del *coating* dopo i lavaggi eseguiti.

In figura 5.25 sono raccolte le immagini a confronto del campione di controllo (*steel_menta*) e quelle dei campioni lavati, ottenute tramite microscopio ottico (ingrandimento 10x).

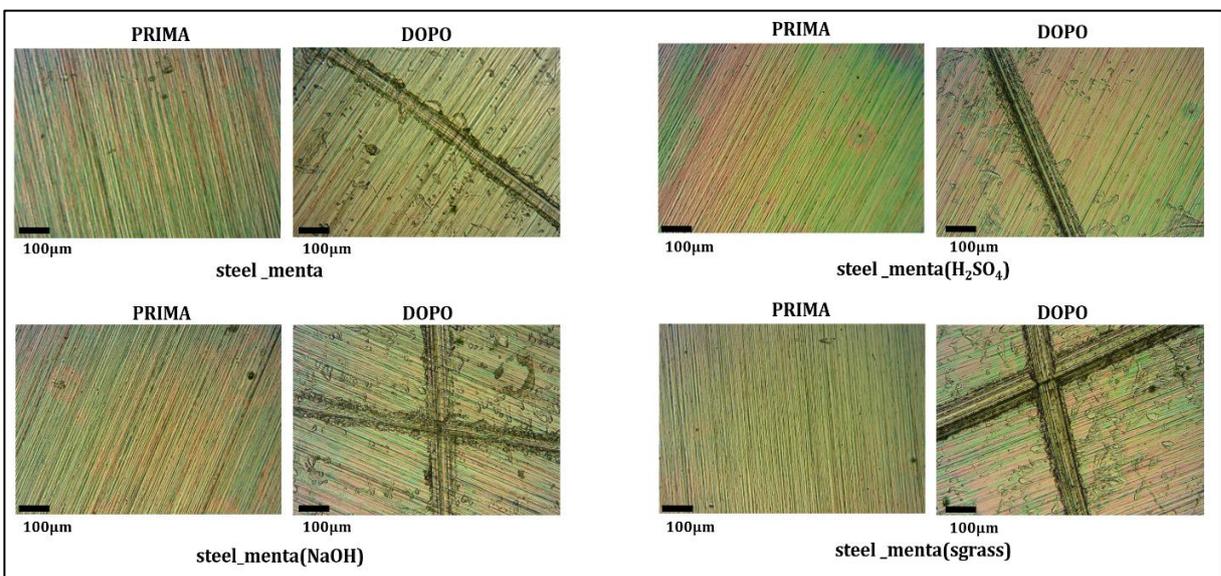


Figura 5.25: Confronto tra il campione di controllo (*steel_menta*) e i campioni lavati (*steel_menta*(H₂SO₄), *steel_menta*(NaOH), *steel_menta*(sgrass)) prima e dopo il *tape test* (ingrandimento 10x).

Le immagini consentono di ricavare un buon risultato che marca la persistenza del rivestimento dopo il lavaggio, la sua adeguata adesione al substrato e un'adeguata resistenza alla pulizia, nonostante sia manifesto un lieve danneggiamento del *coating*.

Bibliografia

- [1] M. Morra et al., "Surface Chemistry Effects of Topographic Modification of Titanium Dental Implant Surfaces :1. Surface Analysis," *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 41, 2003, vol. 18(1), pp. 40–45.
- [2] <http://www.xpssimplified.com/elements/carbon.php> (29/11/2018)
- [3] <http://xpssimplified.com/elements/oxygen.php> (29/11/2018)
- [4] M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, and S. Tosatti, *Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys*. 2001.
- [5] M. Gazzola, " Multifuncional surfaces for implants in bone contact appliations", *PhD Thesis*, 2018.
- [6] http://online.scuola.zanichelli.it/analisichimicastrumentale/files/2014/01/11_appendice_Bande-assorbimento-IR.pdf
- [7] R. Kattel, B. Devkota, and K. C. Laxman, "Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Oil of *Mentha arvensis* Grown At Sites Varying With Vehicular Traffic Loads in Lucknow City, India", *International Journal of Environmental Research*, 2015, vol. 4(3), pp. 130–139.
- [8] T. R. Renato Cozzi, Pierpaolo Protti, "Bande di assorbimento ir," in *Elementi di analisi chimica strutturare*, 2000, pp. 2–35.
- [9] "ASTM D3359-Standard Test Methods for Rating Adhesion by Tape Test," *Annu. B. ASTM Stand.*, 2009, pp. 1–7.
- [10] WO 2007/147832 - Substrate with antimicrobial properties
- [11] M. Ferraris, S. Perero, S. Ferraris, M. Miola, E. Vernè, S. Skoglund, E. Blomberg, I. Odnevall Wallinder, "Antibacterial silver nanocluster/silica composite coatings on stainless steel", *Applied Surface Science*, 2017, vol. 396, pp. 1546-1555.

CONCLUSIONI

Lo studio e la ricerca svolti nel presente lavoro hanno come oggetto la sintesi e caratterizzazione di rivestimenti basati su OE, testati su differenti tipi di materiali – nello specifico lega di titanio e acciaio – coinvolti nella fabbricazione di dispositivi medici, impiantabili e non.

La rilevanza dell'argomento affrontato è correlata ad un'esigenza di innovazione della pratica medica, dal momento che la strumentazione necessita di vigilata sicurezza nei confronti della salute del paziente.

La sfida è quella di creare rivestimenti antibatterici sui dispositivi medici sfruttando le proprietà di composti vegetali, ovvero gli oli essenziali, anziché ricorrere alla tradizionale terapia antibiotica per scongiurare la formazione di biofilm batterici.

Lo scopo perseguito è stato quello di stimare, tramite la conduzione di diversi step di analisi e sperimentazione, il comportamento del *coating* in relazione a vari fattori insorgenti.

I rivestimenti sono stati ottenuti con due differenti tecniche di sintesi: *coating* e *soaking*.

È stata presa in considerazione la stabilità in acqua del *coating*, valutando gli effetti del rilascio secondo tempi crescenti (3ore, 7ore, 3giorni, 7giorni), attraverso il ricorso a diversi momenti di analisi, messi a punto a conclusione dell'indagine.

- Attraverso le misurazioni dell'angolo di contatto, non è stata osservata una variazione della bagnabilità del substrato direttamente correlabile al rivestimento introdotto, se non nel caso del substrato CT.
- Dalle immagini al microscopio a fluorescenza è emerso che, in alcune zone, vi sia una distribuzione uniforme del *coating*, in altre, invece, gli aggregati biomolecolari che determinano una fluorescenza non omogeneamente distribuita.
- La spettroscopia XPS ha permesso uno studio della composizione chimica degli strati superficiali del materiale e sono stati messi a confronto un campione di controllo CT con CT_menta e CT_50%menta(soaking), rilevando un aumento del C e una diminuzione dell'O per campioni trattati con OE rispetto al controllo.
- La spettroscopia FTIR ha fornito un interessante risultato, mostrando in tutti gli spettri i picchi dovuti dell'OE nei campioni testati,

indipendentemente dai materiali e dal tempo di rilascio in acqua, a riprova del buon esito del procedimento di sintesi prodotto.

- Le immagini, ricavate in seguito al *tape test*, mostrano la presenza del *coating* di OE anche dopo il test e danno conferma della sua buona adesione sui materiali testati; se pur, conseguentemente al test, sia stata verificata una rimozione degli strati più superficiali del *coating*. Sono state analizzate anche quelle zone in cui è stata eseguita l'incisione della griglia, che costituisce volutamente una situazione fortemente aggressiva, da cui attingere utili informazioni e comparazioni.
- Un'ulteriore analisi, sempre con il *tape test*, finalizzata alla valutazione della rugosità, ha attestato una migliore adesione del *coating* sul campione irruogoso con carta abrasiva 400 rispetto al campione di controllo.
- L'esecuzione dei lavaggi dei campioni in acciaio rivestiti, con soluzioni H_2SO_4 , NaOH e sgrassatore commerciale, di cui sono stati misurati i pH, ha consentito di verificare positivamente la persistente adesione del *coating* dopo il lavaggio, quindi la sua resistenza alla pulizia.

In seguito, l'attenzione si è focalizzata sulla molecola del trans - cariofillene che, pur essendo una componente secondaria dell'OE, ha manifestato una spiccata affinità al substrato CT. L'indagine è stata eseguita usando una soluzione per la funzionalizzazione, *soaking*, con una concentrazione 10 volte superiore rispetto a quella che di norma è presente nell'OE utilizzato.

Attraverso l'approccio basato sulla combinazione FTIR - gas-cromatografia, si è pervenuti ad apprezzabili risultati: la quantità della biomolecola che si lega al substrato per il campione CT_transcariof(*soaking*)_dis risulta essere 20 volte superiore rispetto al campione CT_50%menta(*soaking*)_dis. Da ciò l'ipotesi di utilizzare OE con quantitativi maggiori di trans - cariofillene (come per esempio, l'OE di camomilla).

È, inoltre, utile far presente che anche per il *coating*, dopo un rilascio di 7 giorni, la biomolecola è rimasta ancorata alla superficie, senza disperdersi in acqua. Infatti, con l'esame gascromatografico si è verificato che vi sia traccia del trans - cariofillene nel mezzo liquido di distacco.

La tesi conferma e integra i risultati degli studi precedenti, apportando delle novità nella ricerca. Questo studio, come gli altri, è servito per ottimizzare il processo di sintesi dei rivestimenti antibatterici sugli OE.

In linea di continuità, si è fatto uso della lega di titanio, dotata di buone proprietà meccaniche, di resistenza alla corrosione, di elevata

biocompatibilità, perciò adatta per applicazioni mediche, ovvero dispositivi impiantabili (in campo ortopedico e odontoiatrico).

Come nuova strategia di sperimentazione, si è utilizzato l'acciaio, di cui sono generalmente costituiti alcuni dispositivi non impiantabili (come ferri chirurgici, incubatori...). Dopo il rivestimento dei campioni di acciaio (*coating*), si è provata la buona adesione, la stabilità a seguito di rilascio in acqua (fino a 7giorni), la resistenza alla pulizia a conclusione interessante, ricavata da questo studio, è l'apertura verso ulteriori prospettive di investigazione, attraverso cui poter stabilire un rapporto tra la quantità dell'OE utilizzata e il sufficiente indice di antibattericità e antitossicità, senza influire, sulle caratteristiche del biomateriale.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare innanzitutto tutti coloro che mi hanno supportato nella stesura della tesi.

Ringrazio la professoressa Silvia Spriano e la dottoressa Sara Ferraris per la disponibilità dimostrata e per gli spunti forniti per il compimento del mio lavoro.

Ringrazio Andrea Cochis e i suoi assistenti dell'università di Novara per avermi permesso di svolgere i test necessari per alcuni step della ricerca ed essere stati sempre disponibili a fornirmi utili chiarimenti.

Un ringraziamento particolare alla dottoressa Martina Cazzola che mi ha guidato costantemente durante tutto il lavoro di ricerca e stesura della tesi.

A conclusione di questo percorso di studi, voglio inoltre ringraziare chi mi è stato particolarmente vicino durante questi anni, pieni di soddisfazioni e sacrifici.

Ringrazio la mia famiglia che ha sempre creduto in me e mi ha sostenuto in ogni momento.

Ringrazio i miei cari amici Enrico e Simone, con i quali sono cresciuto, convivendo per cinque anni lontani da casa, condividendo esperienze, momenti di gioia e anche di difficoltà.

Ringrazio la piccola Benedetta per la spensieratezza che mi ha regalato, soprattutto nei periodi più complicati.

Ringrazio tutti i miei amici e colleghi per essermi stati vicino.

Grazie a chi mi ha incoraggiato, chi mi ha stimolato a dare di più, chi mi ha confortato nei momenti difficili, chi ha avuto fiducia in me. Senza di voi, questo traguardo non sarebbe stato possibile.

Grazie a tutti

Francesco