

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale



BIOCOMPOSITI CONTENENTI OSSIDO DI ZINCO NANOSTRUTTURATO PER WOUND DRESSING

Relatori

prof.ssa Francesca Bosco

prof.ssa Barbara Onida

Candidato

Claudia Paribello

Marzo 2020

Indice

ACRONIMI.....	1
INTRODUZIONE	5
1. BIOCOSPOSITI PER WOUND DRESSING	7
1.1 Il <i>wound dressing</i>	7
1.2 Idrogeli e applicazione nel <i>wound healing</i>	9
1.2.1 Film polisaccaridici per <i>wound healing</i>	10
1.2.2 Film proteici per <i>wound healing</i>	11
1.2.2.1 Whey proteins	11
1.3 Agenti antimicrobici.....	13
1.3.1. Nanoparticelle	15
1.3.2 Ossido di Zinco	16
1.3.2.1 Struttura e proprietà	16
1.3.2.2 Metodi di sintesi dello ZnO.....	17
1.3.2.3 Azione antimicrobica delle ZnO NPs.....	18
1.4 Metodi per la valutazione dell'attività antimicrobica	20
1.4.1 Metodi a diffusione	20
1.4.2 Metodi a diluizione	23
1.5 Compositi contenenti ZnO.....	24
2.MATERIALI E METODI	27
2.1 Ossido di Zinco	27
2.1.1 Sintesi per precipitazione chimica.....	27
2.1.2 Caratterizzazione ossido di Zinco	28
2.1.2.1 Diffrazione a raggi X.....	28
2.1.2.2 Analisi di fisisorbimento di azoto	28
2.1.2.3 Microscopia a Scansione Elettronica ad emissione di campo (FESEM).....	30
2.2 Film proteici.....	30
2.2.1 Preparazione di idrogeli non funzionalizzati con ZnO.....	30
2.2.2 Preparazione di idrogeli funzionalizzati con ZnO	32
2.2.3 Scelta del plastificante e della sua concentrazione.....	32
2.2.4 Scelta dello stampo	32
2.2.5 Caratterizzazione film proteici.....	33
2.2.5.1 Misura della permeabilità del film.....	33

2.2.5.2	Misure di solubilità.....	33
2.2.5.3	Prova di swelling.....	33
2.2.5.4	Analisi FESEM	34
2.3	Prove per la valutazione dell'attività antimicrobica	34
2.3.1.1	Metodo "Broth macro-dilution" effettuato in provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL	35
2.3.1.2	Metodo "Broth micro-dilution" effettuato in piastre multiwell da 96 pozzetti.....	36
2.3.1.3	Metodo Kirby-Bauer- della diffusione in agar modificato, "agar well-diffusion".....	39
2.3.1.4	Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia	40
2.3.2	Valutazione efficacia antimicrobica del biocomposito	41
2.3.2.1	Metodo delle strisce parallele	41
3.	RISULTATI	45
3.1	Sintesi e caratterizzazione della miscela dei due ZnO.....	45
3.2	Caratterizzazione ZnO commerciale.....	48
3.3	Confronto tra lo ZnO di sintesi e commerciale.....	50
3.4	Sintesi e caratterizzazione dei film proteici.....	51
3.4.1	Scelta del plastificante e della sua concentrazione.....	51
3.4.2	Scelta dello stampo	51
3.4.3	Caratterizzazione dei film proteici.....	51
3.5	Prove per la valutazione dell'attività antimicrobica	55
3.5.2.	Metodo "Broth micro-dilution" effettuato in piastre multiwell da 96 pozzetti.....	58
3.5.3	Metodo Kirby-Bauer- della diffusione in agar modificato, "agar well-diffusion".....	60
3.5.4	Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia.	62
3.5.5	Metodo delle strisce parallele per la valutazione dell'attività antimicrobica del biocomposito	70
4.	CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	73
5.	BIBLIOGRAFIA	75
	RINGRAZIAMENTI	78

ACRONIMI

WP	<i>Whey Proteins</i>
WPI	<i>Whey Proteins</i> isolate
WPC	<i>Whey Proteins</i> concentrate
WPH	<i>Whey Proteins</i> idrolizzate
ZnO NPs	Nanoparticelle di ossido di zinco
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
MIC	Minima concentrazione inibente
MBC	Minima concentrazione battericida
MHB	Mueller Hinton Broth
MHA	Mueller Hinton Agar
PBS	Tampone fosfato salino
Gram(+)	Gram positivo
Gram(-)	Gram negativo
XRD	Diffrattometria a raggi X
BET	Modello Brauner-Emmet-Teler
BJH	Modello Barret-Joyner-Helenda
FESEM	Microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo
Ag NPs	Nanoparticelle di argento

α - LA

α -Lattoalbumina

BSA

Sieroalbumina bovina

UFC

Unità formanti colonie

INTRODUZIONE

Questo lavoro di tesi ha come obiettivo la realizzazione di biocompositi con proprietà antimicrobiche da utilizzare nel *wound dressing*, per la produzione di medicazioni con cui coprire la pelle in seguito ad una lesione. I materiali utilizzati per la cura della ferita devono essere in grado di assorbire i suoi essudati ed al contempo mantenere un ambiente umido necessario per il risanamento. Inoltre, devono consentire gli scambi gassosi con l'ambiente esterno e prevenire le infezioni. Vista la loro eccezionale biocompatibilità, ci si è soffermati su materiali di origine naturale, ecosostenibili, biodegradabili e compostabili, piuttosto che su quelli di sintesi. Questi ultimi infatti, pur avendo proprietà meccaniche superiori e pur garantendo una riproducibilità dei risultati ottenibili mediante la sintesi, non sono stati presi in considerazione. L'attenzione è stata rivolta agli idrogeli di origine naturale ed in modo particolare a quelli di natura proteica. Gli idrogeli sono strutture polimeriche tridimensionali costituite da polimeri sintetici o naturali, in grado di assorbire una significativa quantità d'acqua, grazie alla loro capacità di rigonfiare in ambiente acquoso, dovuta alla loro idrofilicità e porosità. L'elevata quantità di acqua da cui sono costituiti consente di mantenere un ambiente umido che favorisce il risanamento della ferita ed al contempo dona un effetto raffreddante e lenitivo. Inoltre, hanno una natura non adesiva che consente la rimozione senza arrecare danni al tessuto epiteliale di nuova formazione.

Questi materiali possono essere ottenuti per reticolazione fisica, mediante interazioni ioniche o legami idrogeno tra le catene, oppure per reticolazione chimica, in cui spesso sono richiesti agenti chimici reticolanti che però compromettono la biocompatibilità del materiale. Tra la vasta scelta di composti naturali a disposizione, per questo lavoro sono state scelte le proteine, in virtù delle loro eccezionali proprietà filmogene ed in particolare le proteine contenute nel siero del latte (*Whey Proteins* - WP). Queste danno origine a film con buone proprietà barriera verso l'ossigeno e con discrete proprietà meccaniche ed antibatteriche verso una varia gamma di batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

Un ulteriore vantaggio è la possibilità di funzionalizzare gli idrogeli con sostanze bioattive antimicrobiche, in modo da incrementare questa proprietà. Di solito, vengono utilizzate delle particelle metalliche o di ossidi dei metalli nella forma nanostrutturata, come le nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO NPs) scelte per questo lavoro. Esse agiscono mediante tre meccanismi: generazione di specie reattive dell'ossigeno, rilascio di ioni zinco ed interazioni fisiche con la cellula batterica.

Nel primo capitolo di questa tesi, è stata fatta una introduzione generale sul *wound healing*, sulle caratteristiche che i materiali utilizzati per il *wound dressing* devono avere e sono stati proposti diversi tipi di idrogeli di tipo naturale impiegabili in questo ambito. Si è focalizzata maggiormente l'attenzione sui film proteici ed in particolare sulle WP essendo quelle scelte per questo lavoro. Successivamente, si è fatta una breve descrizione dei principali agenti antimicrobici di tipo organico e inorganico che possono essere additivati ai film e si è approfondito maggiormente l'argomento nel caso delle nanoparticelle ed in particolare di quelle dello ZnO. Sono stati esposti brevemente i principali metodi di sintesi per lo ZnO e, dopo aver spiegato dettagliatamente i suoi meccanismi d'azione, sono stati spiegati i principali metodi che si possono utilizzare per testare l'attività antimicrobica. Nel secondo capitolo, quello dei materiali e dei metodi, è stata illustrata la procedura utilizzata per la sintesi dello ZnO e per i film, sia funzionalizzati che non, e sono state illustrate tutte le tecniche impiegate per la caratterizzazione dell'ossido di zinco e dei film proteici. In particolare, per il primo sono state eseguite le analisi di diffrazione a raggi X, fisisorbimento di azoto, microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo (FESEM), mentre per i film oltre al FESEM, sono state fatte prove di permeabilità all'ossigeno, di solubilità e di swelling. In questo capitolo sono anche

stati descritti i molteplici metodi utilizzati per l'allestimento delle prove antimicrobiche dello ZnO in sospensione e all'interno del biocomposito, effettuate nei confronti del batterio Gram(+) *S.epidermidis*, del Gram(-) *E.coli*. Per testare l'efficacia antimicrobica dello ZnO in sospensione sono stati utilizzati quattro metodi: il "Broth macro-dilution" effettuato in provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL, il "Broth micro-dilution" effettuato in piastre multiwell da 96 pozzetti ed il metodo "Kirby-Bauer della diffusione in agar" implementato in due diverse varianti, per adattare il metodo alle caratteristiche della sospensione di ZnO. Per testare l'azione antimicrobica del biocomposito è stato utilizzato il metodo delle strisce parallele secondo la metodica standard AATCC Test Method 147-2011, alla quale anche in questo caso sono state apportate delle modifiche.

Nel terzo capitolo sono stati illustrati i risultati relativi alla caratterizzazione dell'ossido di zinco e dei film proteici e alle prove effettuate per testare l'efficacia antimicrobica dello ZnO commerciale e di quello di sintesi, sia in sospensione che all'interno del film.

Il quarto ed ultimo capitolo illustra le conclusioni alle quali si è giunti in questo lavoro e descrive i possibili sviluppi futuri.

1. BIOCOSPOSITI PER WOUND DRESSING

1.1 Il *wound dressing*

Per ferita si intende una discontinuità del tessuto epiteliale causata da un danno fisico o termico, che a seconda del tempo di risanamento e della modalità di guarigione viene distinta in acuta o cronica. Le ferite acute sono quelle che guariscono in 8/12 settimane e sono causate da una lesione chirurgica o un incidente, mentre quelle croniche causate da ulcere, diabete o ustioni gravi richiedono tempi decisamente più lunghi per guarire completamente[1]. Queste ultime, secondo degli studi effettuati negli Stati Uniti d'America sono accompagnate da un elevato tasso di mortalità [2]. Il processo di guarigione della ferita si articola in 4 fasi, che si sovrappongono l'una con l'altra:

1. Emostasi (o coagulazione) è la prima immediata risposta della durata di 5-10 minuti che il nostro corpo oppone all'insorgere di una ferita e consiste nel fermare il sanguinamento mediante vasocostrizione per evitare una eccessiva perdita di sangue. Quando si attiva questo meccanismo, la fibrina rilasciata dai vasi danneggiati si lega alle piastrine rilasciate al momento in cui ha inizio la vasocostrizione e si forma un coagulo che blocca il sanguinamento [3].
2. Stadio infiammatorio, accompagnato da rossore, calore ed infiammazione localizzata [4], è quello in cui si ha l'azione dei neutrofili e dei macrofagi. I primi secernono sostanze in grado di uccidere i batteri, mentre i secondi puliscono la ferita da detriti cellulari e microrganismi. Inoltre, i macrofagi rilasciano fattori di crescita stimolanti l'azione dei fibroblasti, cellule fondamentali per la successiva fase di guarigione della ferita.
3. Stadio di proliferazione è quello in cui la ferita viene riempita dal tessuto di granulazione ed inizia la *riepitelializzazione*. Fondamentale in questa fase è l'azione dei fibroblasti, cellule in grado di stimolare la formazione di fibre di collagene conferenti resistenza e struttura al nuovo tessuto. In questa fase ha luogo anche l'angiogenesi, formazione di una nuova rete di vasi sanguigni all'interno del tessuto granulare. Una volta riempito il letto della lesione con il tessuto di granulazione, i bordi della stessa inizieranno a contrarsi con conseguente chiusura della ferita e formazione della cicatrice [3].
4. Rimodellamento: fase finale che dura dai 21 giorni ai due anni, in cui si completa la cicatrizzazione tramite sintesi del collagene, che ha funzione di rafforzare il tessuto. In questa fase si ha anche una continua contrazione della ferita.

Per *wound dressing* si intende la medicazione, processo che facilita il risanamento della ferita, la protegge da infezioni o ulteriori traumi e favorisce il processo di cicatrizzazione [5]. Un materiale impiegabile nel *wound dressing* deve essere in grado di [6] [1]:

- mantenere un ambiente umido che favorisca la riparazione dei tessuti;
- prevenire le infezioni;
- alleviare il dolore,
- permettere gli scambi gassosi tra la ferita e l'ambiente;
- assorbire gli essudati;
- mantenere una temperatura che favorisca il flusso del sangue verso la ferita;
- aderire alla pelle sana ma non alla ferita;
- essere rimossa facilmente;
- promuovere la sintesi del tessuto connettivo e l'angiogenesi.

Essa deve anche possedere queste caratteristiche [6]:

- Atossicità;
- Sterilità;
- Biocompatibilità;
- Elasticità e flessibilità;
- Basso costo;
- Lungo periodo di *shelf life*.

Le medicazioni impiegabili nella cura della ferita sono distinte in tradizionali o avanzate. Le prime sono essenzialmente le garze e le bende, utilizzate per il loro basso costo e la possibilità di essere impregnate con sostanze bioattive aventi proprietà antibatteriche o stimolanti la formazione di nuovo tessuto. Tuttavia, questo tipo di materiali tende ad inumidirsi facilmente e aderire alla ferita, rendendo il processo di rimozione molto doloroso. Inoltre, per prevenire la macerazione della pelle, le medicazioni tradizionali richiedono frequenti sostituzioni, che possono provocare la rimozione del tessuto epiteliale di nuova formazione. Queste quindi sono usate principalmente come rivestimenti secondari con la sola funzione di copertura e protezione da contaminazioni esterne o come rivestimenti primari in caso di ferite secche con ridotta formazione di essudati[1].

Le medicazioni avanzate non sono impiegate al solo scopo di copertura, ma sono strutturate in modo da favorire il processo di guarigione impedendo la disidratazione della ferita ed evitando la proliferazione batterica [1]. Di solito per questa applicazione si utilizzano dei materiali biocompatibili capaci di idratare la ferita e inibire la carica batterica [7].

Le medicazioni avanzate possono essere realizzate a partire da polimeri di origine naturale, come collagene, chitosano, alginato e cheratina. Questi, rispetto a quelli di origine sintetica, hanno eccellenti proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità. Molto spesso, le medicazioni avanzate sono funzionalizzate con sostanze bioattive come le nanoparticelle dei metalli o loro ossidi che conferiscono al materiale proprietà antimicrobiche e possono essere rilasciate gradualmente nel sito della ferita[8].

1.2 Idrogeli e applicazione nel *wound healing*

Gli idrogeli sono strutture polimeriche tridimensionali costituite da polimeri reticolati tramite legami covalenti e non, e aventi natura idrofilica dovuta ai gruppi -OH, -CONH, -CONH₂, -COOH, -SO₃H [9]. Tale proprietà consente loro di rigonfiare in ambiente acquoso e trattenere elevate quantità di acqua rendendo questi materiali ottimi candidati per il settore del *drug delivery system* (DDS) e del *wound dressing* [4].

Per quanto riguarda l'applicazione nel *drug delivery* questi sono utilizzati per la loro capacità di controllare il rilascio del farmaco e di indirizzarlo verso il sito specifico a cui esso è destinato [10]. Nonostante ciò, spesso non sono adatti perché tanti dei farmaci impiegati nella cura delle ferite sono idrofobici e quindi non possono essere incorporati negli idrogeli a causa della loro elevata idrofilicità. Inoltre, essendo poco resistenti alla trazione possono danneggiarsi e causare un rilascio prematuro ed incontrollato del farmaco.

A renderli ottimi candidati per applicazioni nel *wound healing* invece vi sono la loro ottima biocompatibilità e la natura non adesiva che gli consente di essere rimossi facilmente senza causare ulteriori danni al tessuto di nuova formazione. Grazie al grosso quantitativo di acqua di cui sono costituiti idratano la ferita, mantengono un ambiente umido che favorisce il risanamento ed offrono un effetto raffreddante e lenitivo. Gli idrogeli consentono l'ossigenazione della ferita e facilitano la granulazione e la riepitelializzazione. Sono materiali non irritanti e non reattivi nei confronti dei tessuti biologici e se utilizzati in forma amorfa possono riempire alla perfezione il letto della ferita [4]. Essendo trasparenti consentono il controllo del processo di guarigione senza necessità di rimozione del bendaggio ed essendo malleabili e flessibili possono essere applicati con estrema facilità [11] [4]. Gli idrogeli hanno però lo svantaggio di disidratarsi facilmente e per questo richiedono la copertura con una medicazione secondaria. Inoltre sono soggetti all'accumulo degli essudati che può portare alla macerazione della pelle, per cui se ne sconsiglia l'utilizzo in caso di ferite con grossi quantitativi di essudati [12].

Esistono diversi tipi di idrogeli utilizzabili nel *wound dressing*, ciascuno adatto per un particolare tipo di ferita:

- idrogeli amorfi, che non avendo una forma propria possono essere applicati sulle ferite più profonde e assumere la loro forma;
- garze impregnate, adatte nel caso di lesioni profonde o con necrosi;
- idrogeli in fogli, di solito usati per ulcere, incisioni chirurgiche e ferite profonde, possono essere tagliati per assumere la forma e la dimensione richiesta [4].

Gli idrogeli possono essere di origine naturale o sintetica e le tecniche di reticolazione utilizzate per produrli possono essere di tipo fisico o chimico [4]. I collegamenti fisici tra le catene polimeriche sono dovuti ad interazioni di tipo ionico, legami idrogeno o associazioni idrofobiche favoriti dal riscaldamento o raffreddamento delle soluzioni polimeriche o dall'abbassamento del pH. Questa tecnica di reticolazione non richiede l'utilizzo di particolari reagenti chimici o complesse tecniche di purificazione, per cui gli idrogeli prodotti in questo modo hanno una eccellente biocompatibilità che li rende perfetti per essere utilizzati come carrier di composti terapeutici [4]. La reticolazione chimica invece può avvenire per meccanismi di polimerizzazione a catena, polimerizzazione per addizione o condensazione o reticolazione per irraggiamento con raggi gamma o fascio di elettroni. Questa tecnica porta alla formazione di forti legami covalenti tra le catene che conferisce agli idrogeli prodotti un'ottima resistenza meccanica, ma spesso necessita di agenti reticolanti di tipo chimico, alle spese della biocompatibilità del materiale.

Gli idrogeli oltre che per il metodo di sintesi vengono classificati anche in relazione all'origine, naturale o sintetica [13]. Gli idrogeli di tipo naturale si contraddistinguono per la loro ottima biodegradabilità e biocompatibilità, anche se rispetto a quelli sintetici hanno ridotta shelf life e scarse proprietà meccaniche, difficili inoltre da controllare a causa della variabilità tra un batch e l'altro [13]. Gli idrogeli naturali possono essere divisi in 3 categorie:

- Idrogeli a base di proteine: collagene, elastina, fibrina e gelatina;
- Idrogeli a base di polisaccaridi: alginato, chitosano e acido ialuronico;
- Idrogeli a base di tessuti decellularizzati. Questi tessuti sono quelli a cui viene rimossa la componente cellulare per mantenere solamente il complesso di proteine che costituisce la matrice extracellulare [14].

Gli idrogeli sintetici, rispetto a quelli naturali hanno il vantaggio di poter standardizzare la sintesi in modo da ottenere risultati riproducibili, ma nonostante alcuni di essi siano biocompatibili nella maggior parte dei casi si tratta di materiali né ecosostenibili né compostabili [15].

Tra i principali rappresentanti di questa categoria si trovano l'alcool polivinilico, il glicole polietilenico, il polivinilpirrolidone e il polimetilmetacrilato.

Molto spesso gli idrogeli naturali sono combinati con quelli di sintesi in modo da realizzare dei compositi polimerici con proprietà meccaniche migliori rispetto a quelli naturali e maggiore biocompatibilità e biodegradabilità rispetto a quelli di sintesi.

1.2.1 Film polisaccaridici per *wound healing*

Acido Ialuronico

L'acido ialuronico (HA) è un polisaccaride costituito da acido glucuronico e N-acetilglucosammina, uno dei principali componenti del tessuto connettivo dell'uomo e degli altri mammiferi, responsabile del conferimento della forma e della resistenza della pelle. Esso ha trovato impiego nell'ambito del *wound healing* grazie alla sua proprietà di favorire l'angiogenesi e la guarigione della ferita. Inoltre la capacità di rigonfiare gli consente il rilascio graduale di componenti attivi, promuovendo la sua applicazione come DDS [16].

Chitosano

Il chitosano deriva dalla deacetilazione della chitina, un polimero presente nell'esoscheletro dei crostacei e degli insetti, responsabile della loro durezza e resistenza. È un polisaccaride lineare costituito da gruppi di N-acetil-D-glucosammina e (1-4)-D-glucosammina distribuiti in modo random nella catena. Grazie all'attività antibatterica, antifungina ed emostatica è molto utilizzato in campo biomedico per i trattamenti di cura delle ferite [16], talvolta anche per la realizzazione di materiali compositi e a tal proposito si trovano vari esempi in letteratura [17][18][19]. Nel lavoro di Shin-Yeu Ong et al, il chitosano è stato combinato con dei polimeri di polifosfato, per ottenere un materiale con ottime proprietà emostatiche ed antibatteriche, in grado di accelerare il processo di coagulazione. Il composito chitosano-polifosfato è stato poi additivato con delle nanoparticelle di Argento (Ag NPs), allo scopo di incrementare ulteriormente l'azione antimicrobica. I test per la valutazione dell'azione antimicrobica sono stati fatti sia per il composito costituito da chitosano e polimeri di polifosfato che per il composito additivato con le Ag NPs. I test sono stati effettuati nei confronti del batterio Gram(+) *S.aureus* e del batterio Gram(-) *P.aeruginosa* [19]. Nel caso di *P.aeruginosa*, entrambi i compositi esibivano un'azione battericida, ma l'effetto del materiale funzionalizzato con le Ag NPs si è dimostrato più rapido ed efficiente. L'azione battericida di quest'ultimo è stata rilevata anche verso *S.aureus*, infatti la sua efficacia si è preservata tale per

tutta la durata della prova (72 ore), mentre quella del composito non funzionalizzato è stata inferiore fin da subito ed è diminuita nel tempo [19].

Alginato

L'alginato è derivato dell'algina, polisaccaride presente nella parete cellulare delle alghe brune, che ha trovato impiego nel settore del *wound dressing* grazie alla sua biocompatibilità, alle sue intrinseche proprietà antimicrobiche e alla sua abilità di stimolare il processo di guarigione della ferita. Esso può essere combinato con delle sostanze antimicrobiche e con degli enzimi proteolitici (proteasi) che favoriscono l'eliminazione di tessuti necrotici dalla ferita [16]. Inoltre, essendo in grado di rigonfiare può essere utilizzato come *carrier* per il rilascio controllato di sostanze terapeutiche, antibatteriche ed antinfiammatorie per applicazione nel DDS [16].

1.2.2 Film proteici per wound healing

Le proteine sono considerate un ottimo materiale di partenza per la produzione di film grazie alle loro eccellenti proprietà filmogene. Essendo costituite da catene di aminoacidi diversi legati tra loro tramite legami peptidici, possiedono un grosso numero di gruppi funzionali in grado di generare interazioni intermolecolari tra le varie catene polimeriche [20]. Rispetto ai film polisaccaridici, quelli proteici sono più stabili e hanno migliori proprietà meccaniche e di effetto barriera verso i gas, anche se richiedono trattamenti chimici o fisici per ridurre la permeabilità al vapore acqueo e la solubilità in acqua [21]. I film proteici sono biodegradabili e compostabili, in quanto nel processo di decomposizione rilasciano fonti di azoto che possono essere utilizzate come fertilizzante [20].

Le tecniche maggiormente utilizzate per la produzione di film proteici sono: evaporazione del solvente ed estrusione.

Nel primo caso, i film sono realizzati creando una sospensione di proteine in un solvente, acqua o etanolo, che viene additivata di un plasticizzante, colata su uno stampo (una piastra Petri o contenitore analogo) e lasciata asciugare a temperatura ambiente o mediante riscaldamento sopra i 37 gradi. Quest'ultimo passaggio è indispensabile per consentire l'evaporazione del solvente e favorire la formazione del film. Durante questa procedura è importante controllare i parametri dell'operazione, poiché da essi dipendono le caratteristiche finali del film come la morfologia, le proprietà meccaniche e di barriera. Tali parametri sono la temperatura, il tempo d'essiccamento e le condizioni superficiali dello stampo su cui viene colata la sospensione.

L'altra tecnica utilizzata per la realizzazione dei film proteici è l'estrusione, che consiste nell'azione combinata di sforzi di taglio ed alte temperature per fondere il polimero e consentire la formazione di una matrice coesiva [15].

Di proteine utilizzabili per la produzione di film ve ne sono di svariati tipi: proteine della soia, del frumento, del mais e proteine del latte. Queste ultime sono divise in caseine e *whey proteins* (WP), entrambe dotate di ottime proprietà filmogene. Le caseine sono molto utilizzate nella realizzazione dei film edibili in quanto, possedendo un grosso numero di molecole polari offrono un'ottima azione schermante verso l'ossigeno e altre molecole non polari. Per questo vengono impiegate nel packaging attivo per la produzione di imballaggi da destinare ad alimenti fortemente soggetti ad ossidazione [15].

1.2.2.1 Whey proteins

Il siero del latte è il principale sottoprodotto della produzione del formaggio, ha un contenuto di proteine del 65% e per questo viene utilizzato come supplemento proteico grazie anche alla sua attività antimicrobica e antibatterica [22][23]. Inoltre, le WP sono spesso usate come supplemento nell'attività sportiva per incrementare la massa muscolare [14].

Le WP rispetto alle proteine di origine vegetale hanno una maggiore concentrazione di aminoacidi a catena ramificata come la leucina, l'isoleucina e la valina, considerati importanti fattori per la crescita e la riparazione dei tessuti [22]. Le WP sono interessanti per il loro basso costo, la biocompatibilità, la biodegradabilità e non tossicità, confermata dal riconoscimento come GRAS (generally recognised as safe).

Le principali proteine presenti nel siero del latte sono:

- L' α -lattoalbumina (α -LA), sintetizzata nelle ghiandole mammarie, è una delle proteine più abbondanti nel latte umano e in quello bovino, in quanto costituisce circa il 20-25% del contenuto proteico totale del siero. Essa è caratterizzata da un basso peso molecolare ed è costituita da un'unica catena polipeptidica di 123 aminoacidi, tra i quali vi sono residui di triptofano e cisteina. Il triptofano aiuta a migliorare il sonno, l'umore e le abilità cognitive, mentre la cisteina rafforza il sistema immunitario e favorisce la guarigione della ferita. L' α -LA ha proprietà antimicrobiche ed antitumorali che spiegano il suo utilizzo per scopi terapeutici [23].
- La β -lattoglobulina costituisce circa il 50-60% delle proteine totali nel siero bovino mentre è assente in quello umano. Differisce dalla α -LA poiché è costituita da due catene polipeptidiche e per la presenza di gruppi tiolici liberi. Questi gruppi sono i responsabili della formazione dei ponti disolfuro che consentono alla proteina di gelificare in seguito alla denaturazione. Inoltre, grazie alla proprietà di legarsi al ferro, la β -lattoglobulina può combattere le specie patogene privandole di tale elemento necessario per la riproduzione. Riguardo la sua attività terapeutica sono in corso degli studi per valutare la sua capacità di modulare le risposte del sistema linfatico [22].
- La sieralbumina bovina (BSA) rappresenta il 5% delle WP. Essa è costituita da 582 residui amminoacidici, per cui è caratterizzata da un alto peso molecolare. La sua proprietà più importante è quella di potersi legare agli acidi grassi immagazzinati nel corpo umano nella forma di trigliceridi, e questo le conferisce la possibilità di partecipare alla sintesi dei lipidi. Riguardo all'attività terapeutica sono note le sue proprietà antitumorali e antiossidanti [23].
- L'immunoglobulina è una gamma globulina che costituisce il 10-15% della composizione proteica totale del siero del latte ed è in grado di fornire immunità passiva ai neonati.
- La lattoferrina è una glicoproteina, costituita da una singola catena polipeptidica contenente due siti di legame per gli ioni metallici che le consentono di legarsi agli ioni del ferro liberi, conferendo alla proteina un'azione batteriostatica nei confronti delle specie che necessitano del ferro per duplicarsi. La lattoferrina ha anche un altro meccanismo di azione battericida efficace sia nei batteri Gram(+), che nei Gram(-). Nel primo caso si ha la rottura della parete cellulare causata dal legame tra il dominio N-terminale della proteina ed i recettori per quest'ultimo presenti nei microrganismi [23]. Nei batteri Gram(-) si ha la permeabilizzazione della membrana a causa dell'interazione elettrostatica dello strato lipidico con la superficie della lattoferrina [23].
- Componenti minori: lisozima, lattoperossidasi, osteopontina. Tra queste la più importante in campo biomedicale è la lattoperossidasi, costituente lo 0.25-0.5 % delle proteine totali del siero. Essa catalizza reazioni importanti come la riduzione del perossido di idrogeno, e la perossidazione del solfocianuro, generando specie tossiche per molte specie batteriche.

I più comuni prodotti del siero presenti in commercio, che differiscono tra loro per contenuto di proteine, carboidrati, immunoglobuline, lattosio, grassi e minerali, si distinguono in [24]:

- WPC: *Whey proteins* concentrate, ottenute per ultrafiltrazione del siero del latte ed aventi concentrazione totale di proteine compresa tra il 50 ed 85% su base secca, variabile a seconda delle condizioni operative e delle membrane utilizzate per la separazione. Il metodo

di ultrafiltrazione utilizzato, sebbene non consenta la completa eliminazione del lattosio e dei lipidi, preserva le componenti proteiche dalla denaturazione e limita la perdita di nutrienti, come calcio ed altri minerali [21].

- WPI: *Whey proteins* isolate, ottenute tramite processi di cromatografia a scambio ionico e di ultrafiltrazione. La concentrazione proteica in questi concentrati ha valori compresi tra 90-98% mentre quella di lattosio tra 0.2/0,6 % (10% rispetto a quella presente nelle WPC). Lo svantaggio della cromatografia a scambio ionico è però quello di portare alla denaturazione delle proteine.
- WPH: *Whey proteins* idrolizzate, sono una miscela di aminoacidi e peptidi ottenuta dall'idrolisi dei legami peptidici presenti nelle proteine [22].

Questi concentrati proteici possono essere utilizzati per la preparazione di film dalle ottime proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità, in quanto possono essere generati senza l'utilizzo di agenti chimici reticolanti tramite la tecnica di evaporazione del solvente.

Le WP trovano impiego soprattutto nell'industria del food packaging, dove sono utilizzate per la produzione di film trasparenti, dalle buone proprietà meccaniche e di barriera nei confronti dell'ossigeno [9].

Nella produzione dei film proteici è però indispensabile l'aggiunta di un plastificante, di solito il glicerolo o il sorbitolo, che conferisca proprietà plastiche, riduca la fragilità dei film e consenta il rapido distacco dallo stampo. Queste sostanze hanno l'effetto di allentare le forze intermolecolari tra le catene polimeriche migliorando l'elasticità e la flessibilità, a spese però della resistenza meccanica e delle proprietà barriera nei confronti dell'ossigeno [24].

Una interessante proprietà delle WP è la possibilità di realizzare materiali compositi tramite incorporazione di agenti antimicrobici, come le nanoparticelle dei metalli o di loro ossidi.

1.3 Agenti antimicrobici

Un agente antimicrobico è una sostanza, di origine naturale o sintetica, in grado di uccidere o inibire la crescita del microrganismo. Nel caso dei batteri, le sostanze antibatteriche hanno effetto solamente nei confronti di batteri metabolicamente attivi e si distinguono in antibiotici, se secreti da altri microrganismi, oppure in chemioterapici se sono prodotti di sintesi [25]. L'effetto inibitorio può essere di tipo batteriostatico se inibisce la crescita, oppure di tipo battericida se invece provoca la morte del microrganismo. I meccanismi di azione possono essere molteplici [25]:

- Danneggiamento della parete cellulare;
- Danneggiamento delle membrane cellulari;
- Inibizione della sintesi proteica;
- Inibizione della sintesi di acidi nucleici;
- Inibizione dell'attività enzimatica.

Molte delle matrici polimeriche tra cui proteine, lipidi e polisaccaridi possono essere additate di agenti antimicrobici di origine organica (microbica, animale o vegetale) oppure inorganica. Tra i primi rientrano gli acidi organici, gli enzimi, gli oli essenziali e le batteriocine, mentre tra quelli inorganici vi sono le nanoparticelle dei metalli e dei loro ossidi. Gli agenti antimicrobici di origine vegetale devono la loro azione ai gruppi fenolici, in grado di modificare la permeabilità della cellula batterica ed alterare importanti meccanismi cellulari come la sintesi delle proteine, il trasporto di nutrienti, la catena di trasporto degli elettroni e l'attività

enzimatica. Quelli di origine animale agiscono principalmente distruggendo il doppio strato lipidico della membrana cellulare [15].

Tra gli acidi organici i più utilizzati sono il sorbico, il propionico, il benzoico ed il citrico e la loro azione antimicrobica si esplica mediante riduzione di pH intracellulare, interruzione del trasporto di substrato e riduzione del gradiente protonico elettrochimico transmembrana. Infatti, quando gli acidi protonati diffondono attraverso la membrana cellulare, arrivano in un ambiente alcalino che porta alla dissociazione dell'acido e provoca uno spostamento del pH dal *range* ottimale per l'attività enzimatica [20]. Inoltre, la sintesi delle proteine, del DNA ed RNA risulta negativamente influenzata dalla presenza di alte concentrazioni di acidi organici [20].

Tra i polisaccaridi, quelli di maggior interesse in questo ambito sono quelli di origine naturale, ed in particolare il chitosano e l'alginato, molto spesso impiegati nella formazione di idrogeli con proprietà antimicrobiche. Infatti secondo alcuni studi l'alginato inizia o accelera il processo di guarigione della ferita stimolando i macrofagi ad attivare la risposta infiammatoria, mentre il chitosano deve le sue proprietà antimicrobiche al gruppo NH_2 , che può essere protonato ad NH_3^+ ed interagire con i gruppi anionici della membrana cellulare [20].

Gli oli essenziali sono miscele di sostanze volatili estratte da materiali di origine vegetale per distillazione ed aventi proprietà antimicrobiche grazie alla presenza dei terpeni e dei composti fenolici. I terpeni possono penetrare nella struttura lipidica della parete cellulare e provocare la denaturazione delle proteine, il danneggiamento delle membrane cellulari e la perdita di liquido citoplasmatico fino alla morte del microrganismo [20]. I composti fenolici, grazie alla loro idrofobicità interagiscono con i lipidi della membrana provocandone la permeabilizzazione con conseguente perdita di ioni e del contenuto citoplasmatico della cellula [15]. Tra gli oli essenziali, quelli più utilizzati per le loro proprietà antimicrobiche sono il bergamotto, la cannella, i chiodi di garofano, la citronella, la lavanda, l'origano, il rosmarino, il timo ed il coriandolo [20].

Le batteriocine sono peptidi e proteine sintetizzati da alcuni microrganismi ed aventi azione antimicrobica verso altri. Tra essi uno dei più utilizzati è la nisina, particolarmente efficace verso i Gram positivi su cui agisce permeabilizzando la membrana citoplasmatica ed inibendo la sintesi della parete cellulare [21].

Oltre agli agenti antimicrobici di tipo organico sopradescritti, ultimamente sta aumentando notevolmente l'impiego di agenti inorganici come le nanoparticelle metalliche, inglobate nei film polisaccaridici o proteici per incrementare l'azione antimicrobica. Esse hanno il vantaggio di poter essere prodotte in modo molto semplice ed economico e di provocare la morte cellulare in tempi molto più rapidi rispetto agli agenti antimicrobici convenzionali [26]. I metalli, molto spesso in forma ionica, hanno azione antimicrobica verso una vasta serie di microrganismi grazie alla capacità di danneggiare le cellule microbiche tramite stress ossidativi e di tipo meccanico. Delle nanoparticelle, quelle che hanno riscontrato maggiore interesse in questo ambito sono quelle di Ag e ZnO. L'azione antimicrobica delle ultime è attribuibile a tre principali meccanismi: rilascio di ioni Zn^{2+} , che penetrando attraverso la parete cellulare danneggiano il contenuto citoplasmatico, generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed interazioni fisiche con la parete cellulare batterica.

Le nanoparticelle di Argento agiscono secondo diversi meccanismi, ma quello principale è sicuramente il rilascio di ioni Ag^+ , i quali interagiscono con i processi biologici in diversi modi:

- Danneggiamento della membrana cellulare tramite realizzazione di pori;
- Produzione di ROS;

- Danneggiamento del DNA e del RNA tramite interazioni degli ioni Ag^+ con l'azoto delle basi azotate adenina e guanina;
- Danneggiamento delle proteine causato dall'interazione tra gli ioni Ag^+ con alcuni aminoacidi come arginina, cisteina ed istidina;
- Alterazione dei processi enzimatici;
- Alterazione del processo di respirazione cellulare a causa dell'inibizione enzimatica della NADH-deidrogenasi ad opera dell'accumulo degli ioni Ag^+ [27].

1.3.1. Nanoparticelle

Le nanoparticelle dei metalli si contraddistinguono per avere elevata area specifica, superfici reattive ed una alta densità di spigoli e facce. Questi parametri molto importanti per l'azione antimicrobica, che sono in grado di esplicare verso una vasta serie di microrganismi, pur non essendo tossiche per la salute umana nelle concentrazioni richieste per questo scopo. Esse sono prodotte facilmente ed in modo economico ed hanno il vantaggio di poter uccidere i batteri in tempi molto brevi. Anche gli ossidi dei metalli, grazie alle ottime proprietà ottiche, elettriche e chimiche hanno trovato ampio impiego nelle nanotecnologie e quelli nanostrutturati sono molto interessanti per l'elevata area specifica che possiedono e per la moltitudine di morfologie in cui possono essere sintetizzati [28]. Grazie alle loro dimensioni nanometriche queste particelle possono attraversare i pori micrometrici della membrana esterna ed esplicare la loro azione dall'interno. Quelle aventi dimensioni maggiori possono comunque danneggiare meccanicamente la cellula batterica grazie all'elevata densità di angoli e spigoli che possiedono [29]. In letteratura si trovano esempi sull'attività antimicrobica verso una vasta serie di microrganismi dei seguenti ossidi nella forma di nanoparticelle: Al_2O_3 , TiO_2 , ZnO , CuO , Co_3O_4 , In_2O_3 , MgO , SiO_2 , ZrO_2 , Cr_2O_3 , Ni_2O_3 , Mn_2O_3 [26].

Sono diversi i fattori da cui dipende l'attività antimicrobica delle nanoparticelle [26]:

- Carica superficiale: sia i batteri Gram(+) che i Gram(-), nonostante le differenze strutturali, hanno una superficie carica negativamente a causa dei gruppi fosfati, amminici e carbossilici presenti nella membrana cellulare, per cui nanoparticelle positivamente cariche hanno maggiore facilità nell'aderire alla parete cellulare batterica e penetrare attraverso la membrana cellulare;
- Tipologia di materiale, da cui dipende il meccanismo di azione tramite il quale l'effetto antimicrobico si esplica. Tra le più utilizzate vi sono quelle di Ag e ZnO perché gli ioni rilasciati da questi materiali hanno effetto antimicrobico;
- Forma e morfologia: esistono diverse configurazioni in cui le nanoparticelle si possono trovare ed a ciascuna di esse corrisponde un diverso meccanismo di azione antimicrobica o una diversa efficacia; ad esempio si è notato che le nanoparticelle di ZnO sferiche sono maggiormente predisposte al rilascio di ioni zinco.
- Dispersione delle nanoparticelle nel medium: il contatto diretto tra le nanoparticelle ed il batterio è essenziale per la rottura della parete cellulare, per cui è necessario che le nanoparticelle siano disperse in modo uniforme nel medium.
- Produzione fotoindotta di specie altamente reattive dell'ossigeno (ROS), capaci di danneggiare le componenti cellulari quali DNA, proteine e lipidi. La produzione di queste specie dipende dalle proprietà elettroniche del materiale. Nei semiconduttori, l'esposizione a radiazioni elettromagnetiche di una certa frequenza promuove la transizione di un elettrone dalla banda di valenza a quella di conduzione, lasciando uno

spazio vuoto, chiamato buco o lacuna nella banda di valenza. Elettroni e buche reagiscono con specie esterne come O_2 e H_2O trasformandole in ROS.

- Rilascio di ioni dalle nanoparticelle al medium contenente le cellule batteriche: particelle insolubili nel medium hanno una minore azione antimicrobica a causa del ridotto rilascio di ioni.
- pH del medium: l'abbassamento del pH verso valori acidi favorisce la solubilità dello ZnO e quindi il rilascio degli ioni dalle nanoparticelle.
- Dimensione delle nanoparticelle e rapporto area superficiale/volume: un aumento delle dimensioni, causato da agglomerazione, porta ad una riduzione dell'area superficiale e quindi, ad una riduzione dell'efficacia antimicrobica [26] in quanto diminuisce la probabilità di interazione con i composti presenti nella superficie delle cellule vive.

I problemi maggiori correlati all'utilizzo delle nanoparticelle sono: l'agglomerazione, la precipitazione e la scarsa solubilità, che limitano l'efficacia della loro azione antimicrobica.

1.3.2 Ossido di Zinco

1.3.2.1 Struttura e proprietà

L'ossido di zinco è un composto inorganico solido a temperatura ambiente, semiconduttore con energy gap 3.37 eV. In basse concentrazioni non è tossico per la salute umana e grazie alla sua alta area specifica, biocompatibilità, stabilità termica, chimica e meccanica è quello più utilizzato tra tutti gli ossidi dei metalli per la sua azione antimicrobica, efficiente sia nei confronti dei batteri Gram(+) che dei Gram(-). Si tratta di un agente inorganico e quindi più vantaggioso rispetto a quelli organici per la sua maggiore stabilità e sicurezza. Le proprietà antimicrobiche dei nanomateriali di ZnO risentono particolarmente dell'influenza dell'area superficiale specifica, della morfologia e della dimensione, che può anche essere regolata con l'utilizzo di surfattanti che prevengono l'agglomerazione stabilizzando i materiali per repulsione sterica o elettrostatica.

Inoltre, è possibile funzionalizzare la superficie dello ZnO con dei gruppi polari che aumentino l'interazione con le cellule batteriche in modo da esaltare l'azione antimicrobica.

Esso esiste nelle tre forme cristalline: wurtzite, zincooblenda e sale di roccia.

La wurtzite è la forma termodinamicamente stabile a temperatura ambiente e ha struttura esagonale con parametri di cella $a=0,32$ nm e $c=0,52$ nm ed un rapporto c/a molto vicino ad 1.6, valore ideale per la cella esagonale. Nella sua struttura (figura 1.1) ciascun anione O^{2-} è circondato da quattro cationi Zn^{2+} disposti agli angoli del tetraedro e viceversa [30]. La zincooblenda, ha forma cubica e può essere ottenuta solo facendo crescere l'ossido di zinco su un substrato con struttura cubica. La forma a sale di roccia è ottenibile soltanto mediante utilizzo di alte pressioni, dell'ordine di 20 Gpa [30].

Esistono vari metodi di sintesi e crescita per i nanomateriali di ossido di Zinco che consentono di ottenere un numero svariato di morfologie come: Nanorodi, Nano-flowers, Nanopolveri, Microsfere, Nanotubi, Nanoparticelle.

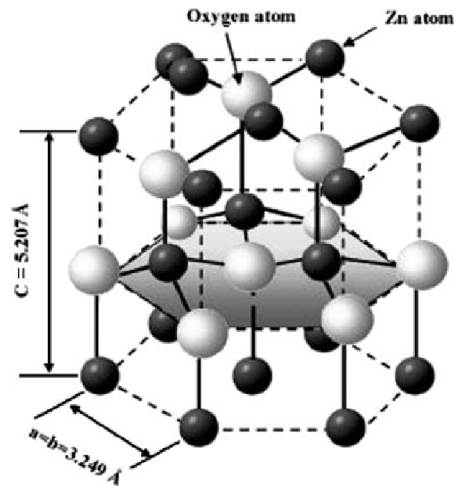
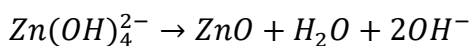
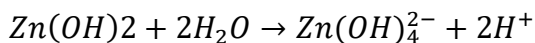
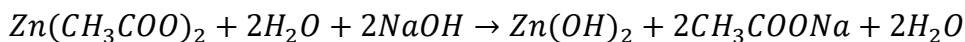


Figura 1.1: struttura wurtzite ZnO [31]

1.3.2.2 Metodi di sintesi dello ZnO

Esistono diversi metodi per la sintesi dello ZnO nanostrutturato, che si distinguono in tecniche di tipo fisico, biologico o chimico e possono aver luogo in fase liquida, solida o gas/vapore. La scelta tra essi dipende dalla morfologia e dalle dimensioni desiderate per le nanoparticelle che si vogliono ottenere. Tra i metodi chimici, il più utilizzato in fase liquida è quello per precipitazione, in quanto pur essendo facile ed economico consente di ottenere ottimi cristalli di ZnO senza utilizzo di catalizzatori metallici [32]. La sintesi ha luogo per la reazione tra un sale di zinco ed un agente riducente come KOH o NaOH, secondo un meccanismo simile a quello sotto riportato in basso nel caso di acetato di zinco diidrato come precursore ed idrossido di sodio come agente basico [32] [33].



La reazione tra acetato di zinco diidrato ed idrossido di sodio genera la precipitazione dell'idrossido di zinco, il quale si trasforma nel complesso $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$, che si scinde poi in ZnO ed OH^- . I parametri dell'operazione sono sicuramente la temperatura, il pH ed il tempo di reflusso ed è molto importante tenerli sotto controllo durante la sintesi [32].

Il metodo sol-gel prevede la sintesi di soluzioni colloidali costituenti la fase sol, che tramite processi di idrolisi e condensazione sono convertiti nella fase gel. Questa viene poi disidratata mediante trattamenti termici ad alta temperatura, ottenendo ossido di zinco puro ed uniforme. Per ottenere film sottili, sfere, fili o aste si utilizzano i metodi idrotermali in cui i precursori vengono dissolti in solventi caldi oppure in acqua a 1-10 atm e 100-1000 °C [30].

Nel metodo di pirolisi in fase gas, il sale di zinco che serve da precursore viene disperso in fase gas sotto forma di goccioline che pian piano si disidratano riducendo le proprie dimensioni [30].

I metodi di sintesi biologica sono divisi in quelli mediati dalle piante e quelli mediati dai microrganismi. Nel primo caso si utilizza il metabolismo secondario delle piante per convertire il sale di zinco in nanoparticelle di ossido del metallo, mentre nel secondo è l'attività enzimatica dei microrganismi a convertire gli ioni in metalli o nanoparticelle di ossidi [30].

1.3.2.3 Azione antimicrobica delle ZnO NPs

I meccanismi ai quali si devono le proprietà antimicrobiche dell'ossido di zinco possono essere di tipo chimico o fisico e sono classificati in 3 categorie [34] [35]:

1. Interazioni fisiche tra nanoparticelle di ZnO e cellula batterica:
 - Distruzione della membrana plasmatica causata dall'interazione elettrostatica tra parete batterica e superficie delle nanoparticelle di ZnO;
 - Incorporazione di nanoparticelle di ZnO all'interno della cellula;
 - Danneggiamento meccanico della parete cellulare;
2. rilascio di ioni Zn^{2+} ;
3. produzione foto-indotta di ROS (specie reattive dell'ossigeno).

L'azione antimicrobica dello ZnO è fortemente influenzata dalle dimensioni e dalla morfologia delle particelle e dall'area superficiale specifica, infatti è stato dimostrato che al diminuire delle dimensioni delle particelle e all'aumentare dell'area specifica l'efficacia antibatterica aumenta [28].

1. Interazioni fisiche

Interazione elettrostatica tra nanoparticelle di ZnO e parete batterica

Le interazioni fisiche di tipo elettrostatico sono dovute all'esistenza di una carica opposta tra la superficie delle nanoparticelle di ZnO carica positivamente e la parete batterica, che a pH fisiologico è invece carica negativamente a causa della dissociazione di gruppi carbossilici e funzionali. Per questo motivo si genera una forza di attrazione tale da consentire alle nanoparticelle di dimensioni superiori ai 10 nm di accumularsi alla superficie della parete batterica portando ad una neutralizzazione del potenziale di superficie. Questo comporta un aumento della tensione superficiale e la depolarizzazione della membrana, seguita dalla sua permeabilizzazione e conseguente perdita di liquido cellulare [34].

Incorporazione di nanoparticelle di ZnO all'interno della cellula

Le nanoparticelle di piccole dimensioni, inferiori ai 10 nm, sono in grado di attraversare i pori della membrana citoplasmatica ed accumularsi all'interno della cellula, dove danneggiano le componenti cellulari come gli acidi nucleici [34].

Danneggiamento meccanico della parete cellulare

L'ultimo dei tre meccanismi di tipo fisico con cui le particelle di ZnO possono agire è il danneggiamento meccanico della cellula batterica causato dall'alta densità di spigoli, bordi ed angoli che queste particelle possiedono e tale effetto diventa tanto più intenso quanto maggiore è il rapporto tra area superficiale e volume delle nanoparticelle [34].

2. Rilascio di ioni Zn^{2+}

Secondo alcuni studi il rilascio degli ioni Zn^{2+} dalle nanoparticelle di ZnO ha un effetto batteriostatico piuttosto che battericida. Essi agiscono prolungando la fase di latenza della curva di crescita alterando i processi biochimici come la glicolisi, inibendo il trasporto attivo di membrana necessario per gli scambi di sostanze tra l'interno e l'esterno della cellula oppure danneggiando aminoacidi e quindi i sistemi enzimatici [26]. Inoltre gli ioni zinco possono danneggiare la parete batterica e portare alla permeabilizzazione della membrana favorendo l'internalizzazione di altre nanoparticelle nella cellula [35]. Le nanoparticelle con scarso rilascio di ioni tuttavia possono andare incontro a resistenza batterica, infatti è stato dimostrato che particelle insolubili o stabili nel medium hanno una scarsa azione antimicrobica [26].

Per aumentare la loro solubilità nel medium vi sono delle strategie, come quella di diminuire il pH. È stato dimostrato infatti, che pH acidi con valori inferiori a 6 aumentano il rilascio degli ioni metallici [26] [35].

Altri parametri che influenzano il rilascio di ioni zinco sono la morfologia, la concentrazione

delle nanoparticelle e la presenza di difetti superficiali sulle stesse. Inoltre, anche la tipologia del medium utilizzata per testare l'azione antimicrobica può avere effetti sulla solubilità dell'ossido di zinco [34].

Tuttavia, a causa della scarsa solubilità delle nanoparticelle di ZnO, dei tre meccanismi questo è il meno efficace [28].

3. Produzione fotoindotta di ROS

La produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) è uno dei principali meccanismi a cui lo ZnO deve la sua azione antimicrobica [34].

I ROS sono in grado di distruggere le membrane cellulari ed alterare macromolecole e molecole cellulari come proteine, DNA e lipidi. La possibilità di generare queste specie è legata alla proprietà dello ZnO di essere un semiconduttore ed in quanto tale costituito da una banda di conduzione ed una di valenza separate da un *gap* energetico. Quando un elettrone viene eccitato da un fotone avente energia superiore a questo *gap*, passa nella banda di conduzione lasciando un posto vuoto carico positivamente (chiamato buco o lacuna) nella banda di valenza. Gli elettroni nella banda di conduzione hanno potere riducente, mentre le vacanze nella banda di valenza hanno potere ossidante.

In ambiente acquoso, gli elettroni e le lacune reagiscono con l'ossigeno e producono specie reattive come i radicali liberi, includendo anche il radicale anionico superossido [36].

L'ossido di zinco è un semiconduttore con *gap* energetico tra le due bande di 3.28 eV, corrispondente ad una energia dell'eccitone di 60 meV che gli consente di produrre una coppia elettrone-lacuna ogni volta che viene colpito da un fotone con lunghezza d'onda superiore a 390 nm[34]. Ogni qualvolta che le nanoparticelle di ZnO sono colpite da luce visibile o UV, vengono generate delle coppie elettrone-lacuna capaci di dare luogo a reazioni ossidoriduttive con l'acqua e l'ossigeno. In particolare, come mostrato nelle figura 1.2 e 1.3, le lacune ossidano l'acqua generando il radicale libero OH •, mentre gli elettroni nella banda di conduzione riducono l'ossigeno generando il radicale anionico superossido O₂^{-•}, che reagendo con i protoni produce gli intermedi HO₂•, e H₂O₂ [34].

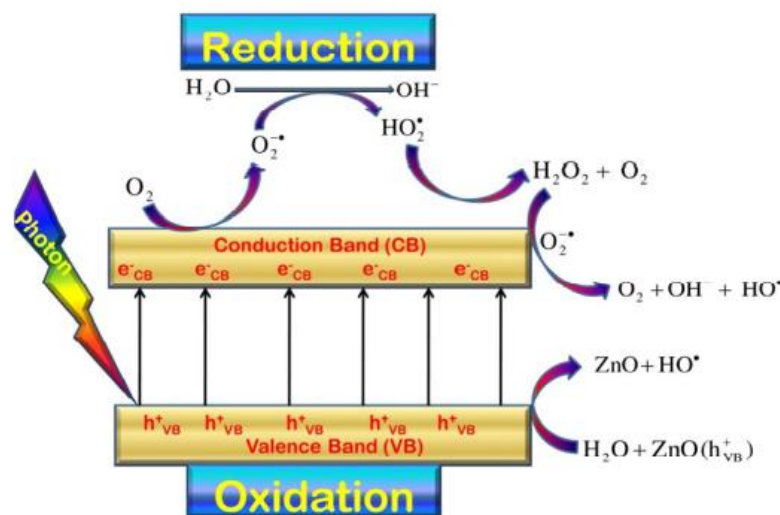


Figura 1.2: schema di produzione ROS [34].

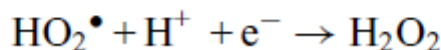
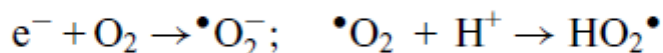
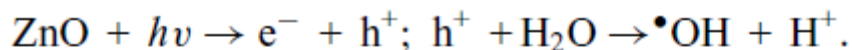


Figura 1.3: meccanismo di generazione ROS [34].

Di tali specie solamente H_2O_2 può penetrare attraverso la membrana e dar luogo all'attività biocida mentre i radicali anionici restano all'esterno a diretto contatto con la superficie della cellula.

La concentrazione di ROS generata può essere influenzata dal tempo di esposizione ai raggi UV e dalla concentrazione di particelle di ZnO.

Nonostante l'attività biocida dello ZnO sia ampiamente dimostrata in presenza di luce essa permane anche al buio e questo, oltre che dall'esistenza degli altri due meccanismi d'azione, può essere spiegato dalla possibilità di generazione di ROS per vie diverse da quelle fotoindotte. Infatti in assenza di luce queste possono comunque essere generate a causa della presenza di difetti sulla superficie della particella, che le consentono di immagazzinare gli elettroni e rilasciarli per ridurre l'ossigeno [34].

1.4 Metodi per la valutazione dell'attività antimicrobica

I metodi utilizzati per la valutazione dell'attività antimicrobica si distinguono in due principali categorie: metodi a diffusione e metodi a diluizione. Tra i primi rientrano il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar secondo la metodica standard EUCAST disk diffusion, il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato "Agar well diffusion", il metodo "Agar plug diffusion", il metodo delle strisce parallele secondo la metodica standard AATCC Test method 147-2011 ed il metodo del gradiente antimicrobico. Tra i metodi a diluizione vi sono il "Broth macro-dilution" ed il "Broth micro-dilution", eseguiti secondo la metodica standard CLSI M07-A9 sviluppata per i batteri aerobi, ed il metodo di Agar diluizione.

1.4.1 Metodi a diffusione

Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar

Il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar secondo la metodica standard EUCAST disk diffusion è quello ufficiale utilizzato nei laboratori microbiologici per i test di suscettibilità antimicrobica. La tecnica si articola nelle seguenti fasi, schematizzate nella figura 1.4:

1. preparazione dell'inoculo standardizzato del microrganismo da testare a partire da una coltura batterica pura cresciuta per 18-24 ore su terreno solido Mueller Hinton Agar (MHA); L'inoculo è preparato in modo da ottenere una opacità simile a quella dello standard McFarland 0.5 e deve essere utilizzato entro un'ora.
2. inoculazione del microrganismo su terreno solido utilizzando un tampone impregnato della sospensione microbica;
3. deposizione di dischi di carta filtro del diametro di 6 mm contenenti il composto da testare alla concentrazione desiderata sul terreno solido precedentemente inoculato con la sospensione microbica.

4. Incubazione per 16-20 ore alla temperatura ottimale per il microrganismo testato, durante la quale l'agente antimicrobico diffonde nel mezzo agar inibendo la crescita microbica.
5. Al termine del tempo di incubazione si misura il diametro dell'alone di inibizione, zona attorno al dischetto dell'agente antimicrobico in cui non si osserva crescita microbica.

Dalla valutazione della dimensione dell'alone di inibizione è possibile distinguere qualitativamente i batteri in resistenti, mediamente resistenti o sensibili all'agente antimicrobico.

Questo metodo grazie alla sua semplicità ed al basso costo è uno dei più utilizzati per i test di suscettibilità antimicrobica. Tuttavia, fornisce solo dei risultati qualitativi e non permette la valutazione della minima concentrazione inibente (MIC) perché non è possibile stabilire la quantità di antimicrobico diffusa dal dischetto nel mezzo agar [37].

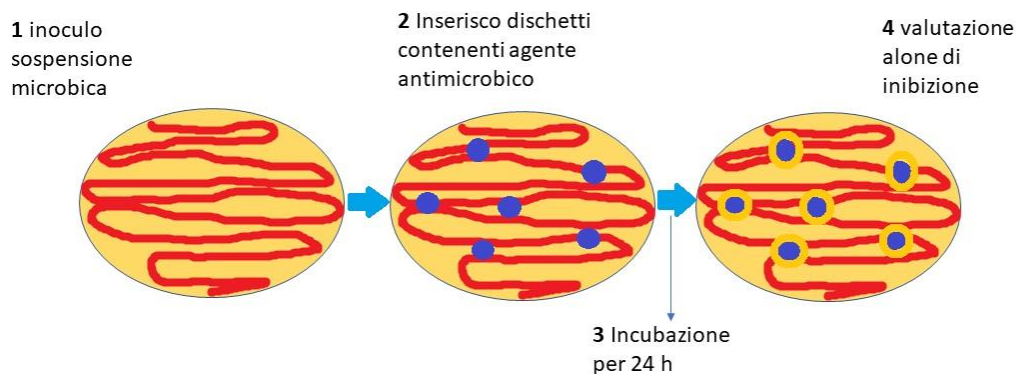


Figura 1.4: schema del metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar.

Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato “Agar well diffusion”

Questa tecnica è una variante del metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar, che viene utilizzata quando non è possibile impregnare i dischetti dell'agente antimicrobico. Il metodo consiste nelle seguenti fasi:

1. Preparazione dell'inoculo standardizzato del microrganismo da testare;
2. Inoculazione della sospensione microbica su terreno solido;
3. Realizzazione di pozzetti del diametro di 6-8 mm sul terreno solido utilizzando una punta;
4. Riempimento dei pozzetti con un volume compreso tra i 20 ed i 100 μL di sospensione dell'agente antimicrobico da testare alla concentrazione desiderata;
5. Incubazione della piastra alle condizioni ottimali per il microrganismo;
6. Valutazione della dimensione dell'alone di inibizione generatosi attorno al foro, dalla quale si ricavano informazioni sull'efficacia battericida della sostanza [37].

Metodo “Agar plug diffusion”

Questo metodo, utilizzato per testare l'antagonismo tra diversi microrganismi si articola nelle seguenti fasi:

1. Preparazione dell'inoculo standardizzato partendo da una coltura batterica pura;

2. Inoculazione della sospensione microbica su terreno solido;
3. Incubazione della piastra; durante il tempo di incubazione il microrganismo secerne delle sostanze di cui si vuole studiare l'azione antimicrobica nei confronti di un altro microrganismo;
4. Al termine del periodo di incubazione si ritaglia asetticamente un cilindro dal terreno solido su cui sono diffuse le sostanze secrete dal primo microrganismo e lo si dispone su una seconda piastra, precedentemente inoculata con l'altro microrganismo.
5. Questa seconda piastra viene incubata ed al termine del periodo di incubazione si valuta la dimensione dell'alone di inibizione generatosi [37].

Metodo delle strisce parallele

Il metodo delle strisce parallele è un metodo qualitativo utilizzato per la valutazione dell'attività antimicrobica dei materiali tessili. Esso è stato standardizzato nel metodo AATCC Test method 147-2011, che si articola nelle seguenti fasi:

1. Preparazione dell'inoculo standardizzato del microrganismo da testare a partire da una coltura cresciuta su terreno liquido per 24 ore;
2. Deposizione dell'inoculo sul terreno solido generando con l'ausilio di un'ansa cinque strisce parallele della lunghezza di 6 cm e distanziate le une dalle altre di 1 cm in modo da coprire la parte centrale della piastra. Il prelievo della sospensione microbica è effettuato una sola volta in modo da generare delle bande a diversa concentrazione di inoculo. Le strisce sono effettuate da sinistra verso destra partendo dall'alto verso il basso, in modo che la concentrazione maggiore sia nella parte sinistra della prima striscia e quella minore nella parte destra dell'ultima.
3. Successivamente il materiale da testare, dopo essere stato tagliato per assumere la forma di un rettangolo delle dimensioni di 2,5x5cm, viene depositato trasversalmente rispetto alle cinque strisce, come mostrato nella figura 1.5. Per consentire una perfetta adesione è necessario pressare il materiale sulla superficie della piastra con l'ausilio di una spatola precedentemente sterilizzata.
4. Una volta allestita, la piastra viene incubata per 18-24 ore;
5. Al termine del tempo di incubazione si valuta l'ampiezza della zona di inibizione mediante la seguente equazione:

$$W = \frac{T - D}{2}$$

Nella formula W rappresenta l'ampiezza della zona di inibizione, T la larghezza della zona di inibizione sommata a quella del campione e D la larghezza del campione.

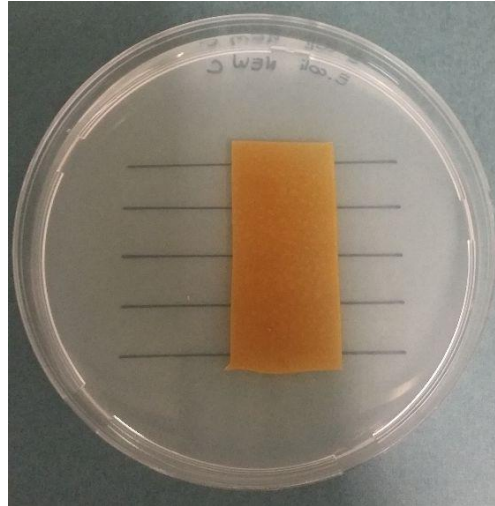


Figura 1.5: disposizione del materiale da testare sulla piastra inoculata con le cinque strisce parallele[5]

Metodo del gradiente antimicrobico

Questo metodo consiste nell'impregnare una striscia con un gradiente di agente antimicrobico crescente da una estremità all'altra da depositare sul terreno solido su cui è stato inoculato il microorganismo. Successivamente la piastra è incubata ed al termine dell'incubazione se l'antimicrobico ha avuto un effetto si potrà osservare un'ellisse di inibizione della crescita. Il metodo consente la valutazione della MIC, determinata dall'intersezione tra la striscia e l'ellisse di inibizione, come mostrato in figura 1.6. Queste strisce con il gradiente di concentrazione di antimicrobico possono essere realizzate manualmente o acquistate già pronte nella versione commerciale Etest (BioMérieux).

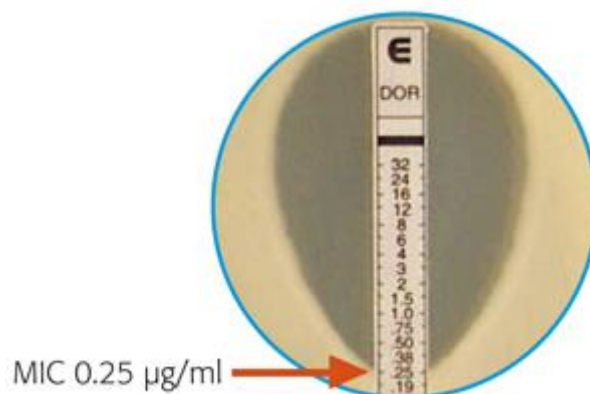


Figura 1.6: valutazione della MIC con il metodo del gradiente antimicrobico utilizzando le strisce ETEST [38].

1.4.2 Metodi a diluizione

Metodo di Brodo diluizione

Il metodo di brodo diluizione, essendo un test di tipo qualitativo è quello tradizionalmente utilizzato per la valutazione della MIC, fornita in $\mu\text{g/mL}$. La procedura da utilizzare per l'allestimento del test è stata standardizzata nel metodo CLSI M07-A9. Il test consiste nel realizzare delle diluizioni seriali dell'agente antimicrobico, da inserire nel brodo di coltura contenuto nei pozzetti di una piastra multiwell da 96 pozzetti (micro-diluizione) oppure all'interno di provette del volume minimo di 2 mL (macro-diluizione). Ciascun pozzetto, o

provetta, contiene una diversa concentrazione di agente antimicrobico, ma in ognuno viene inserito lo stesso volume di inoculo standardizzato. Dopo il tempo di incubazione si passa alla valutazione della concentrazione di agente antimicrobico in grado di non dare segno visibile di crescita microbica: questa concentrazione viene identificata come MIC.

Metodo di Agar diluizione

Questo metodo, come il precedente è un test quantitativo che consente la determinazione della MIC ed è molto utilizzato quando si vuole testare l'efficacia di un nuovo antibiotico nei confronti di più specie batteriche. Il metodo consiste nel realizzare diluizioni seriali 1:2 in acqua dell'agente antimicrobico che si vuole testare, in modo da ottenere diverse concentrazioni. Successivamente ogni diluizione viene incorporata nel terreno di coltura ancora liquido ed una volta solidificato si ottengono delle piastre aventi diverse concentrazioni di agente antimicrobico. Su ciascuna di esse viene depositato in forma di goccia l'inoculo standardizzato con concentrazione di 10^4 UFC/mL e poi le piastre sono incubate per 18 ore. Al termine dell'incubazione si valuta l'eventuale presenza di crescita microbica e si definisce come MIC la concentrazione in grado di inibirla completamente [37]. Questa tecnica offre il vantaggio di poter inoculare microrganismi diversi nella stessa piastra, per valutare la MIC dell'agente antimicrobico verso specie batteriche differenti.

1.5 Compositi contenenti ZnO

In letteratura si trovano diversi studi riguardanti la realizzazione di compositi funzionalizzati con ZnO allo scopo di ottenere materiali con proprietà antimicrobiche. Rajendran et al [39] hanno realizzato dei tessuti impregnati con lo ZnO e degli altri solo rivestiti superficialmente e poi hanno testato la loro efficacia antimicrobica rispetto al tessuto non funzionalizzato. I test antimicrobici sono stati condotti sia su *E.coli*, batterio Gram(-), che su *S.aureus*, batterio Gram(+), per stabilire se vi fossero differenze sull'efficacia antimicrobica nei confronti delle diverse tipologie di batteri. A tal proposito, l'azione antimicrobica valutata sia con il metodo di diffusione su Agar che con quello delle strisce parallele è risultata maggiore nel caso di *S.aureus*. Questo risultato può essere attribuito alla differenza strutturale esistente tra queste due tipologie di batteri. Infatti i Gram(-) hanno una parete batterica costituita da uno strato di peptidoglicano molto meno spesso rispetto ai Gram(+). Questo comporta una maggiore resistenza da parte dei Gram negativi verso la perossidazione lipidica in presenza di ROS e una maggiore tendenza delle nanoparticelle di ZnO con valenze cariche positivamente ad essere intrappolate nel grosso strato di peptidoglicano dei Gram positivi [34].

Inoltre, dai risultati ottenuti in questo studio è emerso che i biocompositi impregnati con l'ossido di zinco sono più efficaci rispetto a quelli solo rivestiti superficialmente, mentre invece quelli non funzionalizzati non presentano alcun effetto antimicrobico.

Rakhshaei et al [40] hanno invece realizzato dei compositi costituiti dalla combinazione di idrogeli di carbossimetilcellulosa (CMC) con silice mesoporosa (MCM-41) impregnata di ZnO, utilizzato in questo caso come *carrier* per il rilascio della tetraciclina (TC). Questo antibiotico è stato incorporato nelle ZnO NPs per massimizzare l'azione antimicrobica ed escludere un qualsiasi tipo di resistenza da parte del microrganismo. Sul composito sono state effettuate diverse caratterizzazioni per studiare l'effetto delle nanoparticelle sulle proprietà meccaniche, sullo *swelling* e sulla permeabilità. I risultati delle prove di solubilità e *swelling* hanno mostrato che il composito CMC/MCM-41 si disintegrava già nelle prime ore del test, mentre il composito CMC/ZnO-MCM-41 aveva maggiore resistenza. Quest'ultimo inoltre, presentava maggiore resistenza a trazione e migliori proprietà anche dal punto di vista dello *swelling* e della

permeabilità al vapore acqueo e all'ossigeno. Per quanto riguarda l'azione antibatterica, sono stati fatti dei test di suscettibilità antibatterica nei confronti del batterio Gram(+) *S.aureus* e del Gram(-) *E.coli*, dai quali è emersa un'attività antimicrobica non solo del composito contenente l'antibiotico TC, ma anche in quello contenente solo silice mesoporosa impregnata di ZnO NPs, grazie all'attività antimicrobica di queste ultime.

2.MATERIALI E METODI

2.1 Ossido di Zinco

2.1.1 Sintesi per precipitazione chimica

La sintesi delle nanoparticelle di ossido di Zinco mesoporoso è stata effettuata per precipitazione seguendo la procedura riportata da Mitra et al [41]. La procedura è stata ripetuta due volte ed i materiali ottenuti da ciascuna sintesi sono stati miscelati meccanicamente, in modo da ottenere un quantitativo di ZnO sufficiente. La miscela ottenuta è quella utilizzata per le prove antimicrobiche dello ZnO in sospensione e per la realizzazione dei biocompositi.

Come materiali di partenza sono stati utilizzati 14.75 g di acetato di zinco diidrato come precursore, sciolti in 60 ml di metanolo e 7,4 g di idrossido di potassio in 32 ml di metanolo. Dopo aver ottenuto le due soluzioni, quella di idrossido di potassio è stata versata lentamente nell'altra mantenendo la temperatura ambiente e una agitazione sostenuta [42]. Successivamente la miscela è stata collegata ad un condensatore ad acqua, che ha consentito di condurre la reazione evitando l'evaporazione del metanolo.

La reazione è stata condotta a 60 gradi per 72 ore ed al suo termine la sospensione biancastra ottenuta è stata separata in due provette di egual peso e sottoposta a cicli di centrifugazione a 4000 rpm per 30 minuti e lavaggio con metanolo per eliminare i residui di idrossido di potassio. L'operazione di centrifuga e lavaggio è stata ripetuta per tre volte e una volta ottenuto il prodotto, questo è stato essiccato in una stufa a 50°C per 24 ore, ottenendo il solido mostrato nella figura 2.1.



Figura 2.1: cristalli di ZnO.

Infine, il campione è stato polverizzato in modo da predisporlo alle successive prove di caratterizzazione del materiale, ottenendo la polvere mostrata in figura 2.2.



Figura 2.2: polvere di ZnO.

2.1.2 Caratterizzazione ossido di Zinco

2.1.2.1 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X è una tecnica utilizzata per l'individuazione delle fasi cristalline e del grado di cristallinità di un materiale, che ci dà anche informazioni sulle dimensioni reticolari, sulla purezza e sulla rugosità superficiale. Prima di iniziare la prova il materiale da analizzare è stato finemente polverizzato ed inserito nel supporto sul quale è stato analizzato dallo strumento PANalytical X'Pert Pro (Cu K α radiation) *diffractometer* nel range di angolo tra 10° e 80°. La diffrazione a raggi X è basata sull'interferenza costruttiva di raggi X filtrati per avere una radiazione monocromatica, con il materiale. La radiazione viene concentrata verso il campione e se la legge di Bragg $n\lambda=2d \sin \theta$ è soddisfatta l'interazione dei raggi incidenti con esso produce una interferenza costruttiva. Questa legge correla la lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica con l'angolo di diffrazione e la distanza tra i piani. Il campione è analizzato con varie angolature e le radiazioni diffratte sono analizzate per produrre un diffrattogramma, dalla cui forma si risale alle proprietà del materiale. Dallo spettro XRD si apprendono diverse informazioni:

- dalla posizione angolare dei picchi si risale alle fasi presenti e alla struttura del materiale;
- dall'intensità dei picchi si ricava l'abbondanza relativa tra le varie fasi e l'orientazione preferenziale;
- dal profilo dei picchi otteniamo informazioni sulla cristallinità e sulla dimensione dei grani.

2.1.2.2 Analisi di fisisorbimento di azoto

Il fisisorbimento, a differenza del chemisorbimento, è un processo reversibile che, a temperature sufficientemente basse, può avvenire con qualsiasi coppia adsorbente/adsorbato e può anche dar luogo ad adsorbimento multistrato. Essendo un fenomeno superficiale è regolato da parametri quali: area superficiale specifica, volume poroso e dimensione media dei pori. Tali parametri sono valutati dalle isoterme di adsorbimento, ottenute misurando la quantità di gas adsorbite sulla superficie del materiale in un ampio range di pressioni relative, a temperatura costante[43]. Di solito per questo tipo di analisi si utilizzano gas chimicamente non reattivi verso il campione, come l'azoto.

La misura dell'adsorbimento dell'azoto è stata effettuata con lo strumento Quantachrome AUTOSORB-1, mostrato in figura 2.3, mediante l'utilizzo di 100 mg di polvere di campione.

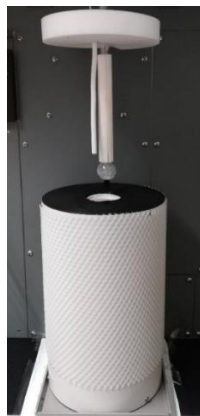


Figura 2.3: strumento Quantachrome AUTOSORB-1

La fase preliminare alla misura è quella del degasaggio, condotto a 150°C per 2 ore per rimuovere eventuali specie adsorbite nella superficie.

Successivamente, dopo aver portato la temperatura a 77 K è stata avviata la misura dell'area superficiale specifica e della distribuzione dei pori, i cui valori sono stati ottenuti rispettivamente con il modello BET (Brauner-Emmet-Teler) nell'intervallo di pressioni relative 0,04-0,1 e con il modello BJH (Barret-Joyner-Helenda).

Lo strumento fornisce i valori della quantità adsorbita al variare della pressione relativa, dai quali si ricava l'isoterma di adsorbimento. Confrontando la forma dell'isoterma ottenuta con quelle della classificazione IUPAC è possibile risalire alla tipologia di porosità.

In relazione alla loro dimensione caratteristica, i pori possono essere classificati in:

- macropori (diametro superiore a 50 nm);
- mesopori (diametro compreso tra 2 e 50 nm);
- micropori (diametro inferiore a 2 nm) [43].

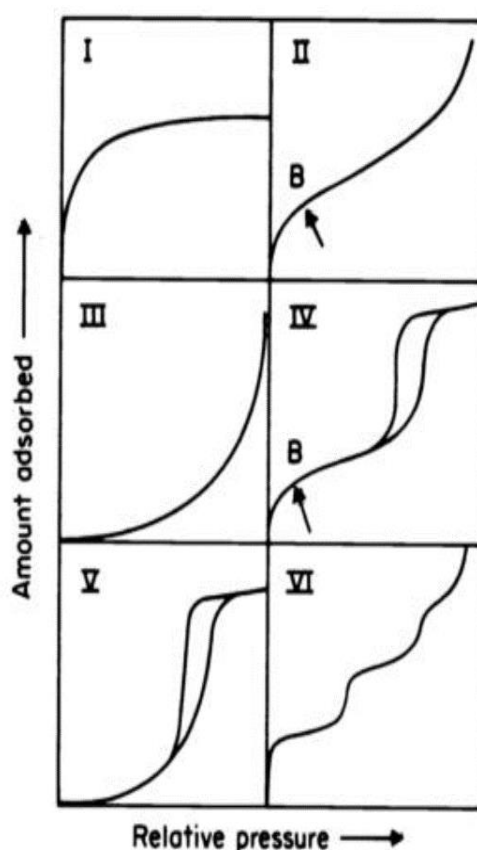


Figura 2.4: classificazione IUPAC delle isoterme di adsorbimento[43].

La classificazione IUPAC, come si nota dalla figura 2.4 distingue le isoterme di adsorbimento in sei classi, a seconda della loro forma.

L'isoterma di tipo I, relativa ai materiali microporosi, ha una forma concava rispetto alle ascisse e, superata una certa pressione parziale, la quantità adsorbita non aumenta più ma si mantiene costante.

L'isoterma di tipo II è invece caratteristica dei solidi macroporosi e non porosi. Si distingue per la presenza di un punto di flesso, a partire dal quale si inizia a formare il multistrato molecolare.

L'isoterma di tipo III non è molto comune e fa riferimento a legami deboli tra adsorbente e adsorbato e si distingue per essere convessa rispetto alle ascisse lungo tutto il dominio.

L'isoterma di tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi, è caratterizzata da fenomeni di

condensazione capillare e di *pore blocking* e può essere accompagnata dalla presenza di un ciclo di isteresi. In questo caso il ciclo di isteresi è preceduto da un primo tratto, che si estende fino al completamento del *monolayer*, uguale all'isoterma di tipo II.

L'isoterma di tipo V, anch'essa molto rara, presenta un ciclo di isteresi dovuto al riempimento e svuotamento dei pori.

L'isoterma di tipo VI ha una forma a gradini ed è tipica dei materiali non porosi, in cui i gradini indicano gli step di riempimento dei singoli strati [43].

2.1.2.3 Microscopia a Scansione Elettronica ad emissione di campo (FESEM)

La microscopia a scansione elettronica ad emissione di campo è una tecnica che consente una risoluzione e degli ingrandimenti superiori rispetto alla microscopia ordinaria[30] e viene utilizzata per valutare la morfologia del materiale, effettuando registrazioni di immagini su diverse scale tramite diversi ingrandimenti. Nel nostro caso sono state registrate immagini a 5000, 25000 e 250000 X.

Il microscopio a scansione elettronica utilizza un fascio di elettroni primari generato da una sorgente elettronica, che interagisce con la superficie inducendo l'emissione di raggi X, elettroni retrodiffusi ed elettroni secondari, dall'intensità dei quali si ricostruisce la topografia del materiale. Il SEM opera in condizioni di vuoto e il campione da analizzare deve essere conduttivo per cui i materiali non conduttivi devono essere metallizzati. Nel nostro caso lo ZnO è stato metallizzato con del platino prima di effettuare la misura.

2.2 Film proteici

2.2.1 Preparazione di idrogeli non funzionalizzati con ZnO

La preparazione dei film è resa possibile grazie alle proprietà filmogene dei polimeri naturali dovute alla loro struttura chimica, che consente l'associazione delle catene polimeriche tramite ponti disolfuro. In particolare, per la realizzazione di film aventi azione antimicrobica sono molto spesso utilizzate le proteine (proteine del siero, della soia, del pesce), i polisaccaridi (chitosano, amido, carbossimetilcellulosa) e miscele dei due[20]. Nel nostro caso sono stati realizzati degli idrogeli di base proteica utilizzando il concentrato proteico MILEI 80, ottenuto per ultrafiltrazione e spray drying del siero del latte ed avente le caratteristiche riportate nella tabella 2.1.

Minimo quantitativo di proteine	80%
Massimo quantitativo di grassi	7%
Massimo quantitativo di lattosio	8.5%
Massimo quantitativo di umidità	5%

Tabella 2.1: caratteristiche concentrato proteico

Nella preparazione, oltre al concentrato proteico è necessario includere anche un solvente (di solito acqua o etanolo), un agente basico che aggiusti il pH, ed un plasticizzante che aumenti lo spazio intermolecolare [21]. Nel nostro lavoro è stata utilizzata acqua come solvente, una soluzione 1,5 M di NaOH come agente basico ed il glicerolo e il sorbitolo come agenti plasticizzanti.

La metodologia seguita è stata quella precedentemente adottata da Tricoli [21] nella sua tesi di laurea:

1. Preparazione di 100 mL di sospensione madre con concentrazione di proteine pari a 104 g/L disperdendo 10.4 grammi di concentrato proteico MILEI 80 in acqua.

2. Neutralizzazione della sospensione con una soluzione di soda 1.5 M, in modo da portare il pH da 5.8 a 7.
3. Denaturazione termica delle proteine per distruggere la loro struttura terziaria. Questo cambiamento strutturale consente alle proteine di gelificare mediante la formazione di legami intermolecolari, come i ponti disolfuro che portano alla formazione di un reticolo tridimensionale[21]. La denaturalizzazione è stata effettuata immergendo la sospensione proteica in un bagnetto termostatico (vedi figura 2.5) a 90°C, mantenendo una agitazione costante per 20 minuti.



Figura 2.5: denaturazione delle proteine nel bagnetto termostatico

4. Raffreddamento della sospensione fino a temperatura ambiente immergendo la beuta in acqua fredda.
5. Aggiunta del plastificante in quantitativo pari al 60% su base secca.
6. Degasaggio sottovuoto per favorire la fuoriuscita di eventuali gas disciolti nella sospensione (vedi figura 2.6).



Figura 2.6: degasaggio sottovuoto

7. Riempimento degli stampi con un volume di prodotto tale da garantire un rapporto volume/superficie pari a 0.135
8. Essiccamento in stufa a 60°C per 3 h. L'essiccamento all'aria aperta è stato scartato perchè causava un eccessivo trattenimento di solvente che dava origine a film labili, che si laceravano molto facilmente. Tutti i parametri dell'operazione ed i rispettivi valori sono elencati nella Tabella 2.2

Solvente	acqua distillata
Temperatura di denaturazione	90°C
Tempo di denaturazione	20 min
Concentrazione plastificante	60% wt
Materiale stampo	Silicone
Temperatura di essiccamento	60°C
Tempo di essiccamento	3 h

Tabella 2.2: parametri dell'operazione

2.2.2 Preparazione di idrogeli funzionalizzati con ZnO

La procedura per la realizzazione dei film funzionalizzati con lo ZnO è analoga a quella descritta nel paragrafo 2.2.1, ma con alcune variazioni. La sospensione proteica in questo caso è stata ottenuta disperdendo il concentrato proteico (104 g/L) in un volume d'acqua minore. Il volume di solvente mancante è stato utilizzato per la realizzazione della sospensione di ossido di zinco da unire in una fase successiva a quella proteica in modo da ottenere un volume complessivo di 100 mL ed una concentrazione proteica di 104 g/L. La sospensione di ZnO è stata preparata utilizzando un quantitativo di polvere che consentisse di ottenere nella sospensione finale una concentrazione di 40000 µg/mL per lo ZnO commerciale e di 30000 µg/mL per quello di sintesi. Una volta realizzata, è stata sonicata in bagnetto ad ultrasuoni per 10 minuti in modo da favorire la dispersione della polvere nel liquido e rompere eventuali aggregati di particelle. Successivamente le due sospensioni sono state unite e quella risultante è stata neutralizzata con della soluzione di NaOH 1.5 M prima della denaturazione. Da questo punto in poi la procedura utilizzata è analoga a quella riportata nel paragrafo 2.2.1 a partire dal punto 3.

2.2.3 Scelta del plastificante e della sua concentrazione

Il plastificante è un elemento fondamentale per la realizzazione dei film. Esso riduce le forze intermolecolari tra le catene polimeriche, conferendo al film proprietà plastiche e facilitando il suo distacco dallo stampo, alle spese però della resistenza meccanica e delle proprietà barriera[24]. In questo lavoro sono stati testati due diversi plastificanti: il glicerolo ed il sorbitolo. Essi sono stati utilizzati alle concentrazioni di: 60%, 80% e 120% su base secca, per stabilire quale tra esse conferisse al film le proprietà migliori. Successivamente, utilizzando uno spessimetro è stata valutata la variazione dello spessore del film in funzione della percentuale di plastificante utilizzata.

2.2.4 Scelta dello stampo

Nella realizzazione dei film sono stati testati vari stampi, di diversi materiali, per stabilire quali tra essi favorisse il più rapido distacco del film e conferisse le migliori proprietà strutturali al materiale. In particolare, sono stati testati stampi in silicone, plastica, alluminio e poliestere.

2.2.5 Caratterizzazione film proteici

2.2.5.1 Misura della permeabilità del film

In questa prova è stata misurata la permeabilità dei film proteici all'ossigeno, utilizzando un permeometro. Tale strumento è costituito da due camere, tra le quali il campione oggetto di test viene posizionato. La camera superiore è investita da un flusso di ossigeno a portata controllata, mentre quella inferiore da una portata controllata di azoto che trasporta il gas verso l'uscita. Questa camera è dotata di un sensore di concentrazione in grado di rilevare la presenza di ossigeno e valutare la quantità dello stesso permeata attraverso il film. Al film testato è stato applicato un riduttore di superficie prima della prova. La misura è stata condotta alla temperatura costante di 25°C e ad un valore fisso di umidità relativa del 50%.

2.2.5.2 Misure di solubilità

La prova di solubilità consente di stabilire la quantità di materiale che si scioglie in un dato solvente in 24 ore. Prima di iniziare la prova il film è stato essiccato in stufa a 60°C per favorire la completa disidratazione. Una volta registrato il peso secco iniziale, il film è stato immerso in un volume d' acqua sterile sufficiente a coprirlo interamente all'interno di una provetta mantenuta in agitazione da un agitatore basculante come mostrato in figura 2.7. La prova ha una durata di 24 ore, al termine delle quali il campione viene nuovamente essiccato fino al raggiungimento del peso secco. Infine, viene calcolato il rapporto di solubilità mediante la seguente equazione:

$$\text{rapporto di solubilità} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Nella formula P_i rappresenta il peso secco iniziale del campione, mentre P_f il peso secco finale.



Figura 2.7: agitatore basculante

2.2.5.3 Prova di *swelling*

La prova di *swelling* consente di stabilire la quantità di liquido massima che il materiale è in grado di assorbire quando immerso in un solvente. Nel nostro caso sono state effettuate delle prove su quattro campioni: due immersi in acqua e due in tampone fosfato salino. I film sono

stati essiccati in stufa a 60 gradi fino al raggiungimento del peso secco e poi immersi nei solventi, come mostrato nella figura 2.8.

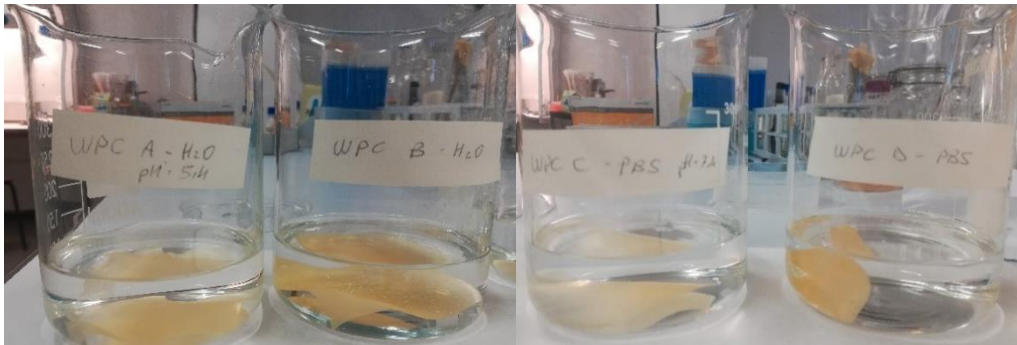


Figura 2.8: allestimento prova di *swelling*

Successivamente ogni 30 minuti ciascun campione è stato asciugato superficialmente e poi pesato. La procedura è stata ripetuta fino alla stabilizzazione del peso. Al termine della prova si calcola il rapporto di rigonfiamento mediante la seguente equazione:

$$\text{rapporto di rigonfiamento} = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100$$

Nella formula P_i rappresenta il peso secco iniziale del campione, mentre P_f il peso finale.

2.2.5.4 Analisi FESEM

Sui film, sia funzionalizzati che non, sono state effettuate delle analisi FESEM per valutare la morfologia del materiale e la dispersione delle particelle nella matrice proteica. In questa prova sono stati analizzati 4 diversi campioni: due frammenti di film proteici non funzionalizzati e due frammenti di biocompositi realizzati con le particelle di ZnO commerciale. I campioni uguali sono stati posizionati nel supporto in modi opposti così da esporre al fascio di elettroni entrambe le facce del film. Il biocomposito analizzato in questa prova è stato realizzato depositando un primo volume di sospensione priva di ZnO e poi, dopo l'essiccamento, un secondo volume uguale al precedente di sospensione contenente lo ZnO. In questo modo è stato ottenuto biocomposito a strati.

2.3 Prove per la valutazione dell'attività antimicrobica

Sono state effettuate diverse prove, applicando varie metodiche standard adattate al caso in esame, al fine di testare l'efficacia antimicrobica del solo ZnO in sospensione e dei biocompositi. In entrambi i casi sono stati utilizzati sia lo ZnO commerciale che la miscela dei due ossidi di sintesi. I microrganismi nei confronti dei quali è stato testato sia lo ZnO in sospensione che il biocomposito sono il batterio Gram(+) *S. epidermidis* (LMG 10474) ed il batterio Gram(-) *E.coli* (LMG 08063). In tutte le prove i due batteri sono stati testati alla temperatura di 37°C.

I metodi utilizzati per testare l'azione antimicrobica dello ZnO in sospensione sono quattro:

- Metodo “Broth macro-dilution” effettuato in provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL;
- Metodo “Broth micro-dilution” effettuato in piastre multiwell da 96 pozzetti;
- Metodo Kirby-Bauer- della diffusione in agar modificato, “agar well-diffusion”;
- Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia.

Per testare l'efficacia antimicrobica del biocomposito è stato utilizzato invece il metodo standard delle "strisce parallele" AATCC Test method 147-2011.

Per tutte le prove, sia con lo ZnO in sospensione che con il biocomposito, sono stati utilizzati il terreno liquido Mueller Hinton Broth (MHB) e quello solido Mueller Hinton Agar (MHA), come indicato nelle procedure standard seguite.

2.3.1.1 Metodo "Broth macro-dilution" effettuato in provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL

Il metodo è stato eseguito secondo la procedura standard CLSI M07-A9 per batteri aerobi, apportando alcune modifiche. Applicando tale metodica è stata testata l'efficacia antimicrobica dello ZnO sia commerciale che di sintesi, posto in sospensione in tampone fosfato salino, nei confronti del batterio *S. epidermidis*.

Preparazione dell'inoculo standardizzato

L'inoculo standardizzato è stato ottenuto a partire da una coltura batterica cresciuta su terreno solido Mueller Hinton agar (MHA) per 12 ore alla temperatura di 37°C. Da questa è stata ottenuta una sospensione microbica in acqua, opportunamente diluita fino ad ottenere un valore di densità ottica, alla lunghezza d'onda di 600 nm (OD_{600}), pari a 0.5; tale sospensione è stata poi ulteriormente diluita di 10 volte per ottenere un inoculo corrispondente a 10^6 UFC/ml.

Preparazione delle sospensioni di ZnO

Le sospensioni di ZnO, sia commerciale che di sintesi, sono state realizzate, in condizioni di sterilità, utilizzando un tampone fosfato salino (PBS) avente pH di 7,4. Le concentrazioni preparate sono 15000 e 7500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le sospensioni prima di essere utilizzate per il test sono state sottoposte a sonicazione per un'ora in bagnetto ad ultrasuoni alla frequenza di 35 kHz, all'interno di provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL. La sonicazione è effettuata per rompere qualsiasi aggregato eventualmente formatosi e favorire una maggiore dispersione dell'antimicrobico nel solvente.

Allestimento del test antimicrobico

Questo test antimicrobico è stato eseguito con il batterio *S.epidermidis* allestendo 3 provette tipo Eppendorf della capacità di 2 mL aventi le seguenti caratteristiche:

- un campione biotico contenente l'inoculo batterico testato con una concentrazione di ZnO di 7500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,
- un secondo campione biotico contenente l'inoculo batterico testato con concentrazione di ZnO di 15000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- un controllo biotico contenente l'inoculo batterico, ma privo di ZnO.

Le concentrazioni di ZnO per i due campioni biotici sono state scelte sulla base di un precedente lavoro [44].

Il volume complessivo con cui le provette sono state riempite è di 500 μL , di cui l'inoculo costituisce il 10% (50 μL), in modo che una volta inserito esso venga diluito ulteriormente di 1:10. I restanti 450 μL sono ripartiti equamente in soluzione di PBS sterile e terreno liquido di coltura Mueller Hilton Broth (MHB) nel caso del controllo biotico, e in sospensione di ZnO in PBS e MHB nel caso dei campioni biotici. Le sospensioni di ZnO in PBS sono state realizzate con concentrazione di 30000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 15000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ed una volta diluite 1:2 con il terreno di

coltura sono state ottenute le concentrazioni da testare rispettivamente pari a 15000 µg/ mL e 7500 µg/ mL. Anche il terreno liquido è stato preparato doppiamente concentrato, in modo che una volta unito al pari volume di sospensione di ZnO diluendosi 1:2 raggiungesse la concentrazione richiesta.

Una volta preparati, i campioni sono stati incubati per 24 ore in condizione di agitazione alla velocità di 200 rpm a 37°C. All'interno dell'incubatore la loro disposizione è stata scelta sulla base dei risultati di alcune prove, effettuate in precedenza, con lo scopo di capire quale fosse la migliore posizione delle provette tale da garantire una ottimale dispersione dello ZnO. In seguito a tali prove si è stabilito che la condizione ottimale fosse quella di disporre le provette in posizione orizzontale con l'asse perpendicolare rispetto alla parte frontale dell'incubatore come mostrato in Figura 2.9. In questo modo si riesce ad ottenere una adeguata miscelazione del liquido e si evita la sedimentazione dello ZnO sul fondo della provetta.

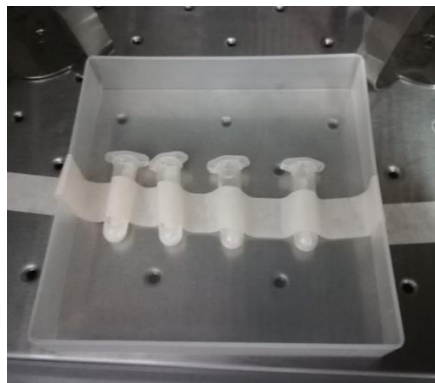


Figura 2.9: disposizione delle provette nell'incubatore.

Successivamente, al termine dell'incubazione, è stato effettuato un prelievo sia dal controllo biotico che dai campioni contenenti lo ZnO. Il liquido colturale prelevato è stato opportunamente diluito e inoculato disperdendo un volume pari a 100 µL su terreno solido MHA. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore, al termine delle quali è stata effettuata la conta microbica al fine di determinare le Unità Formanti Colonia per mL (UFC/mL). Le UFC/mL sono valutate con la seguente formula:

$$\text{UFC/mL} = (n \times \text{FD})/v$$

in cui n è il numero di colonie contate, FD è il fattore di diluizione, mentre v è il volume seminato sulla piastra, espresso in ml.

2.3.1.2 Metodo “Broth micro-dilution” effettuato in piastre multiwell da 96 pozzetti

La procedura adottata per l'allestimento del test di suscettibilità antimicrobica per diluizione, così come per il metodo “Broth macro-dilution”, è stata quella dello standard CLSI M07-A9 sviluppato per i batteri aerobi. Applicando tale metodica è stata testata l'azione antimicrobica dello ZnO, sia commerciale che di sintesi, posto in sospensione in PBS. Il microrganismo testato è *S.epidermidis*, in quanto essendo un Gram(+) risulta maggiormente sensibile all'azione dell'agente antimicrobico[44].

Preparazione dell'inoculo standardizzato

L'inoculo è stato preparato prelevando tre colonie da una coltura batterica cresciuta per 12 ore a 37°C su terreno solido MHA e disperdendole in 5 mL di soluzione salina sterile (NaCl 0.85%),

in modo da ottenere una sospensione contenente 10^8 UFC/mL. Questa è stata diluita 1:1000 in terreno MHB ottenendo un inoculo concentrato 10^5 UFC/mL.

Preparazione delle sospensioni di ZnO

Per la preparazione delle sospensioni alle varie concentrazioni di ZnO commerciale e di sintesi si è partiti dalla realizzazione di quelle concentrate: 40000, 35000 e 30000 $\mu\text{g/mL}$. Queste sono state realizzate, in condizioni di sterilità, all'interno di provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL utilizzando il PBS come solvente. Prima di essere utilizzate per il test, le sospensioni sono state sottoposte a sonicazione in bagnetto ad ultrasuoni alla frequenza di 35 kHz all'interno delle stesse provette per un'ora. Successivamente per diluizioni seriali 1:2 con il terreno di coltura MHB sono state ottenute tutte le concentrazioni di ZnO da testare.

Allestimento del test antimicrobico

Lo scopo del metodo Broth micro-dilution è quello di individuare la minima concentrazione inibente (MIC), ossia la concentrazione in grado di inibire visibilmente la crescita del microorganismo. La prova è stata allestita in piastre multiwell da 96 pozzetti, costituite da 8 righe e 12 colonne, testando sia lo ZnO commerciale che quello di sintesi. In ogni colonna della piastra è stata testata una concentrazione di ZnO diversa, da 20000 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$, come è messo in evidenza nella tabella 2.3, che riporta le concentrazioni di ZnO con cui è stato testato il batterio.

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

Tabella 2.3: concentrazioni di ZnO testate

Come si può notare dallo schema esemplificativo riportato nella figura 2.10 la piastra è stata divisa in due parti: nella prima metà (righe A, B, C e D) si è testata una concentrazione di inoculo del 10% (rispetto al volume colturale totale), mentre nella seconda (righe E, F, G e H) una del 50%. La scelta di testare due diverse concentrazioni di inoculo è stata fatta per stabilire se la concentrazione di microorganismo abbia un'influenza sull'effetto antimicrobico dello ZnO.

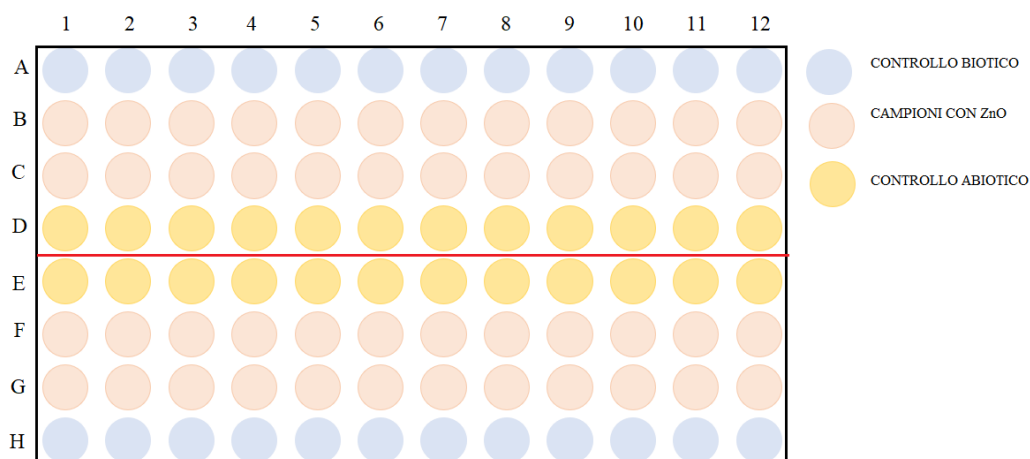


Figura 2.10: schema di allestimento della prova nelle piastre multiwell da 96 pozzetti

La prima e l'ultima riga corrispondono al controllo biotico e sono state riempite con il terreno di coltura e l'inoculo (al 10% nella riga A ed al 50% nella riga H). Le righe B e C per l'inoculo al 10%, e la F e la G per quello al 50%, sono due repliche degli stessi campioni contenenti lo ZnO, il terreno MHB e l'inoculo. Le righe D ed H rappresentano il controllo abiotico e contengono le sospensioni di ZnO alle varie concentrazioni ma non l'inoculo, sostituito da un pari volume di MHB. I pozzetti delle righe A, B, C e D contengono un volume complessivo di 110 μL , mentre quelli delle righe E, F, G e H di 100 μL . I volumi di MHB, inoculo e sospensione di ZnO presenti nei pozzetti di ciascuna riga sono riportati nella tabella 2.4.

A	100 μl MHB 10 μl inoculo in MHB
B	100 μl MHB+ ZnO 10 μl inoculo in MHB
C	100 μl MHB+ ZnO 10 μl inoculo in MHB
D	100 μl MHB+ ZnO 10 μl MHB
E	50 μl MHB+ ZnO 50 μl MHB
F	50 μl MHB+ ZnO 50 μl inoculo in MHB
G	50 μl MHB+ ZnO 50 μl inoculo in MHB
H	50 μl MHB 50 μl inoculo in MHB

Tabella 2.4: quantitativo di MHB, inoculo e sospensione di ZnO

Una volta riempita, la piastra è stata avvolta nella pellicola per evitare una eccessiva evaporazione del solvente, ed incubata a 37°C per 12 ore in agitazione a 150 rpm. Al termine della incubazione, dopo aver lasciato la piastra in condizioni statiche per 15 min, è stato effettuato un confronto della torbidità dei pozzetti contenenti la sospensione di ZnO e l'inoculo microbico, rispetto al controllo abiotico e a quello biotico per una eventuale determinazione della minima concentrazione inibente (MIC). Secondo questa procedura viene definita come MIC, la più bassa delle concentrazioni in grado di inibire la crescita batterica. La torbidità è segno di crescita microbica, per cui se il campione biotico risulta limpido come il controllo abiotico si può concludere che c'è stata inibizione della crescita microbica, mentre se la torbidità è confrontabile con quella del controllo biotico si può affermare che non c'è stato effetto di inibizione. L'assenza di crescita microbica è stata indagata visivamente, senza l'utilizzo del microscopio, come prevede la metodica. Una volta individuata la MIC, è stata effettuata una prova per la determinazione della minima concentrazione battericida (MBC), concentrazione in grado di uccidere il 99% dei batteri. A tal fine, sono stati prelevati 10 µL di liquido colturale dai pozzetti in cui visibilmente non sembrava esserci crescita e questi sono stati inoculati su terreno solido MHA. Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C ed al termine dell'incubazione si è verificata l'eventuale assenza di colonie batteriche.

2.3.1.3 Metodo Kirby-Bauer- della diffusione in agar modificato, “agar well-diffusion”

Per la preparazione dell'inoculo e l'allestimento del test è stato seguito il metodo “Kirby Bauer” secondo la procedura standard “EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing – 8.0”, alla quale sono state apportate alcune modifiche. In particolare, sono stati realizzati dei pozzetti, direttamente nell'agar, all'interno dei quali sono state dispensate le sospensioni di ZnO. Tali sospensioni di ZnO, commerciale e di sintesi, sono state realizzate in PBS e testate nei confronti del batterio Gram(+) *S.epidermidis*.

Preparazione dell'inoculo standardizzato

L'inoculo è stato ottenuto diluendo 1:100 in MHB la sospensione microbica ottenuta disperdendo in 5 mL di soluzione salina sterile (NaCl 0.85%) tre colonie prelevate da una coltura batterica cresciuta per 12 ore a 37°C su terreno solido MHA. In questo modo si è ottenuta una concentrazione di 10⁶ UFC/mL, più elevata rispetto a quella utilizzata per il metodo precedente per assicurare una completa copertura della piastra con il microrganismo.

Preparazione delle sospensioni di ZnO

Anche in questo caso, come per il metodo “Broth micro-dilution” nelle piastre multiwell da 96 pozzetti si è partiti dalla preparazione delle sospensioni di ZnO sia commerciale che di sintesi, realizzate all'interno di provette tipo Eppendorf della capacità di 2 mL utilizzando come solvente il PBS. Per prime sono state preparate le sospensioni di ZnO con concentrazione 40000, 35000 e 30000 µg/mL e tramite diluizioni seriali 1:2 in PBS sono state ottenute le altre concentrate 20000, 17500, 15000, 10000 e 7500, 3750, 1920, 960, 480, 240 µg/mL. Prima di essere utilizzate per il test, ciascuna sospensione è stata sottoposta a sonicazione alla frequenza di 35 kHz per un'ora all'interno della provetta stessa.

Allestimento del test antimicrobico

Il test è stato allestito utilizzando piastre di MHA, sulle quali dopo aver depositato 100 µL di inoculo contenente 10⁶ CFU/mL, e lasciato asciugare per 10 minuti sono stati realizzati dei pozzetti del diametro di 0.8 cm utilizzando un foratappi in acciaio sterile. Il fondo è stato sigillato con una goccia di MHA liquido e poi lasciato solidificare per evitare che la sospensione

di ZnO si disperdesse dal fondo del pozzetto. Successivamente ogni pozzetto è stato riempito con 70 μ L di sospensione di ZnO ad una diversa concentrazione, come si vede dalla figura 2.11, procedendo in senso orario dalla maggiore alla minore. In questa prova le concentrazioni di ZnO più elevate sono state separate da quelle più basse realizzando delle piastre per le concentrazioni di 40000, 35000, 30000, 20000, 17500, 15000 e 10000 μ g/mL e delle altre per quelle di 7500, 3750, 1920, 960, 480, 240 μ g/mL. La prova è stata effettuata in doppio ed in totale sono state realizzate otto piastre, quattro per lo ZnO commerciale e quattro per quello di sintesi. Al centro della piastra è stato riempito un pozzetto del solo solvente privo di ZnO, da utilizzare come controllo. Una volta allestite, le piastre sono state incubate a 37°C per 12 ore. Al termine dell'incubazione le piastre sono state analizzate per valutare la presenza di un alone di inibizione attorno al pozzetto.



Figura 2.11 Agar well diffusion method

2.3.1.4 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia.

Il metodo “Kirby Bauer”, secondo la procedura standard EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing 8.0”, è stato seguito sia per la preparazione dell'inoculo che per l'allestimento del test. Ad esso sono state apportate alcune modifiche. Infatti, per evitare che una volta depositata la sospensione di antimicrobico, la polvere di ZnO si compattasse sul dischetto, la sospensione di ZnO è stata depositata direttamente sul terreno solido. In questa prova le sospensioni di ZnO, commerciale e di sintesi, sono state realizzate sia in acqua che in PBS. I microrganismi testati sono il batterio Gram(+) *S.epidermidis* e del batterio Gram(-) *E.coli*.

Preparazione dell'inoculo standardizzato

L'inoculo è stato preparato diluendo 1:100 in soluzione salina sterile (NaCl 0.85%), la sospensione ottenuta disperdendo in 5 mL di soluzione salina tre colonie prelevate da una coltura cresciuta su terreno solido MHA per 12 ore a 37°C. In questo modo è stato ottenuto un inoculo corrispondente a 10^6 UFC/mL.

Preparazione delle sospensioni di ZnO

Per questo test sono state realizzate, in condizioni di sterilità all'interno di provette tipo Eppendorf della capacità di 2 mL, delle sospensioni di ZnO, sia commerciale che di sintesi, con

concentrazione di 40000, 35000, 30000, 20000, 17500, 15000, 10000, 7500 $\mu\text{g/mL}$. Queste sospensioni sono state realizzate in due diversi solventi:

- Acqua distillata con pH nel range tra 6.0-6.2;
- Soluzione di PBS in acqua, con pH 7.4;

La scelta di testare due solventi aventi un diverso valore di pH è stata fatta per valutare l'influenza di questo parametro sull'azione antimicrobica dello ZnO.

Una volta realizzate, le sospensioni di ZnO alle varie concentrazioni sono state sottoposte a sonicazione alla frequenza di 35 kHz all'interno delle stesse provette per un'ora.

Allestimento del test antimicrobico

Il test è stato allestito su delle piastre di terreno solido MHA, sulle quali dopo aver depositato 100 μL di inoculo standardizzato e atteso 10 minuti affinché la sospensione microbica si asciugasse, sono stati depositati 20 μL di ognuna delle sospensioni di ZnO da testare sotto forma di goccia. La deposizione è stata fatta proseguendo in senso orario dalla maggiore alla minore concentrazione come mostrato nella figura 2.12, avendo cura di miscelare adeguatamente la sospensione con l'utilizzo di un vortex prima di effettuare ciascun prelievo. Per essere certi di ottenere una goccia ben definita sono state fatte per ciascuna sospensione due deposizioni successive da 10 μL ciascuna. Al centro di ogni piastra è stata depositata anche una goccia, 20 μL , del solo solvente, acqua o PBS da utilizzare come controllo abiotico.



Figura 2.12: allestimento metodo della goccia

Le piastre sono state avvolte nella pellicola, per evitare l'evaporazione del solvente, ed incubate a 37°C per 12 ore. Trascorso il tempo di incubazione si è passati alla valutazione dell'alone di inibizione, ovvero la zona attorno alla goccia di sospensione in cui non c'è crescita microbica. L'alone di inibizione viene valutato in millimetri, sottraendo al diametro esterno della zona inibita il diametro della goccia di sospensione depositata.

2.3.2 Valutazione efficacia antimicrobica del biocomposito

2.3.2.1 Metodo delle strisce parallele

La valutazione dell'azione antimicrobica del biocomposito è stata effettuata con il metodo delle strisce parallele, seguendo la metodica standard AATCC Test Method 147-2011, normalmente

utilizzata per valutare l'efficacia antimicrobica dei tessuti, alla quale anche in questo caso sono state apportate alcune modifiche. Nel metodo standard i campioni sono testati nella forma di rettangoli delle dimensioni di 5x 2.5 cm. Nel nostro caso, non potendo realizzare dei campioni sufficientemente grandi, sono stati testati dei campioni più piccoli preparati mantenendo inalterato il rapporto tra base ed altezza. In particolare, sono stati realizzati dei biocompositi di dimensioni di 4x2 cm. Un'altra modifica apportata al metodo standard riguarda la preparazione dell'inoculo standardizzato. La metodica standard prevede di realizzare l'inoculo a partire da una coltura batterica cresciuta in terreno liquido per 24 ore, mentre nel nostro caso l'inoculo è stato realizzato a partire da una coltura batterica cresciuta su terreno solido MHA per 12 ore a 37°C. In questo modo è stato possibile testare il biocomposito utilizzando un tipo di inoculo simile a quello impiegato per testare lo ZnO in sospensione.

Inoltre, il metodo standard prevede di inoculare il microrganismo sul terreno solido realizzando 5 strisce parallele della lunghezza di 6 cm distanziate di 1 cm tra loro. Nel nostro caso invece, dovendo testare un campione di dimensioni più piccole, sono state realizzate 4 strisce parallele della lunghezza di 5 cm e distanziate tra loro di 1 cm.

Questa prova è stata effettuata con il batterio Gram(+) *S. epidermidis* e con il Gram(-) *E. coli* testando sia i campioni contenenti lo ZnO commerciale che quello di sintesi. Le concentrazioni di agente antimicrobico presenti all'interno del biocomposito sono 40000 µg/mL per lo ZnO commerciale e 30000 µg/mL per quello di sintesi.

Preparazione dell'inoculo standardizzato

L'inoculo è stato ottenuto diluendo 1:100 in MHB la sospensione microbica ottenuta disperdendo in 5 mL di soluzione salina sterile (NaCl 0.85%) tre colonie prelevate da una coltura batterica cresciuta per 12 ore a 37°C su terreno solido MHA. In questo modo si è ottenuto un inoculo contenente 10^6 UFC/mL, come quello utilizzato nel metodo Kirby-Bauer-della diffusione in agar modificato.

Preparazione del biocomposito

Prima di iniziare la prova, il film è stato tagliato manualmente nella forma di un rettangolo avente base di 2 cm ed altezza di 4 cm. Il film non è stato sterilizzato.

Allestimento del test antimicrobico

La sospensione microbica contenente 10^6 UFC/mL è stata inoculata su una piastra di terreno solido MHA effettuando 4 strisce parallele, lunghe 5 cm e distanziate 1 cm l'una dall'altra. Per realizzare delle strisce a concentrazione di microrganismo differenti, l'inoculo è stato prelevato una sola volta utilizzando un'ansa da 4 mm. Le strisce sono state effettuate procedendo da sinistra verso destra e partendo dall'alto verso il basso, in modo da avere la massima concentrazione in corrispondenza della parte sinistra della banda superiore e la minima concentrazione in corrispondenza della parte destra della banda inferiore. Successivamente, biocomposito è stato prelevato con delle pinze sterili e depositato al centro della piastra, in modo da coprire con la sua altezza le quattro strisce di inoculo. Per consentire una adeguata adesione ed evitare che si distaccasse, il film è stato pressato sulla superficie della piastra con l'ausilio dell'ansa. Infatti, qualora venisse perdesse il contatto con la sospensione microbica, il biocomposito non sarebbe più in grado di esercitare la sua azione antimicrobica. La piastra è stata incubata per 24 ore alla temperatura di 37°C e, trascorso il tempo di incubazione, è stata valutata la dimensione della zona inibita attorno al biocomposito con la seguente formula:

$$W = \frac{T - D}{2}$$

Nella quale W rappresenta l'ampiezza della zona di inibizione, T la larghezza della zona di inibizione sommata a quella del campione e D la larghezza del campione.

3.RISULTATI

3.1 Sintesi e caratterizzazione della miscela dei due ZnO

Come detto precedentemente, il materiale utilizzato per le prove antimicrobiche è una miscela di due ossidi sintetizzati in laboratorio in due momenti diversi con il medesimo metodo. In questo modo è stato ottenuto il quantitativo necessario per effettuare tutte le prove antimicrobiche, in quanto da una singola sintesi si ottengono circa 4 grammi di campione. In questo paragrafo sono mostrati i risultati della diffrattometria a raggi X, del fisisorbimento di azoto e delle analisi FESEM.

Diffrattometria a raggi X

La figura 2.7 mostra lo spettro XRD dell'ossido di zinco, nel quale si nota la presenza di picchi in corrispondenza dell'angolo $2\theta = 31.67^\circ, 34.31^\circ, 36.14^\circ, 47.40^\circ, 56.52^\circ, 62.73^\circ, 66.28^\circ, 67.91^\circ, 69.03^\circ, \text{ e } 72.48^\circ$. Questi riflessi sono correlati rispettivamente ai piani (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201) e (004). Questo spettro XRD è tipico dell'ossido di zinco policristallino con struttura wurtziteica. Inoltre, l'assenza di picchi caratteristici di altre fasi dimostra l'ottenimento di ossido di Zinco puro[45][32].

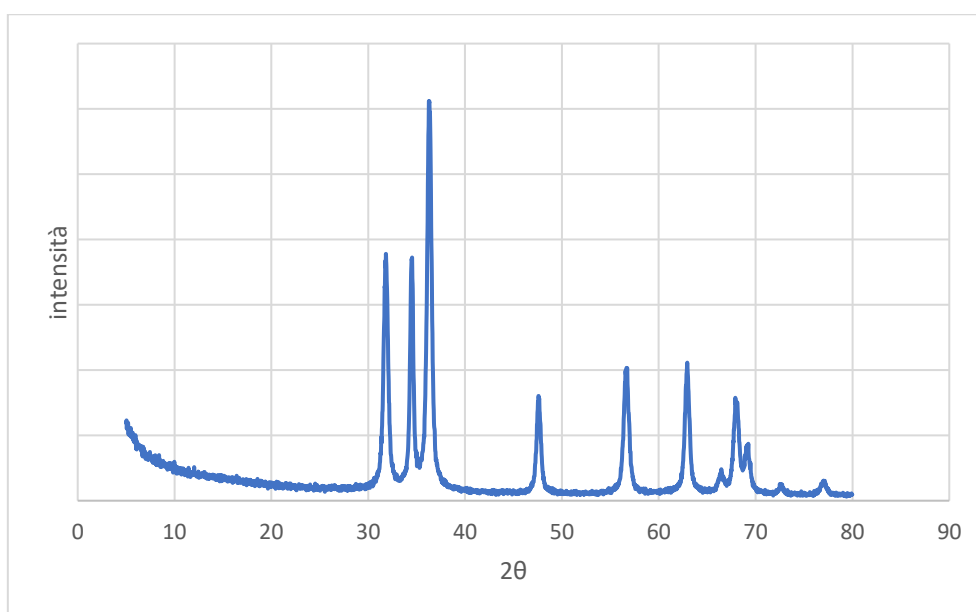


Figura 3.1: Spettro XRD della miscela dei due ossidi

Fisisorbimento di azoto

Nella figura 3.2 è riportata l'isoterma di adsorbimento ottenuta dall'analisi di fisisorbimento di azoto. Confrontando la forma della curva con quelle della classificazione IUPAC, possiamo ricondurla alla tipologia IV, con ciclo di isteresi. Questo risultato ci informa sull'ottenimento di un ossido di Zinco mesoporoso con area superficiale specifica, calcolata tramite BET, pari a $29,67 \text{ m}^2/\text{g}$. Il volume poroso specifico risultante dal modello BJH è invece pari a $0,07 \text{ cm}^3/\text{g}$. Dalla distribuzione porosimetrica il diametro medio dei pori è risultato pari a 12 nm.

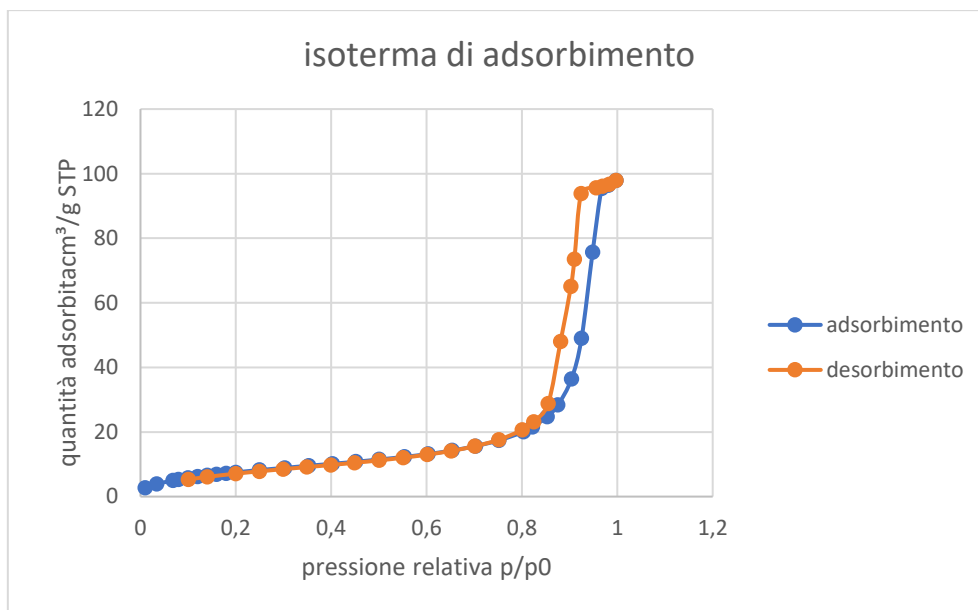


Figura 3.2: isoterma di adsorbimento della miscela dei due ossidi.

Microscopia a Scansione Elettronica ad emissione di campo (FESEM)

L'analisi FESEM è stata effettuata su entrambi gli ossidi di sintesi, prima della loro miscelazione. I risultati ottenuti per i due campioni sono molto simili, per cui si riportano solo quelli relativi all'ossido ottenuto dalla prima sintesi. Le figure 3.3, 3.4 e 3.5 riportano la morfologia delle ZnO NPs a diversi ingrandimenti: 5000, 25000 e 250000 X.

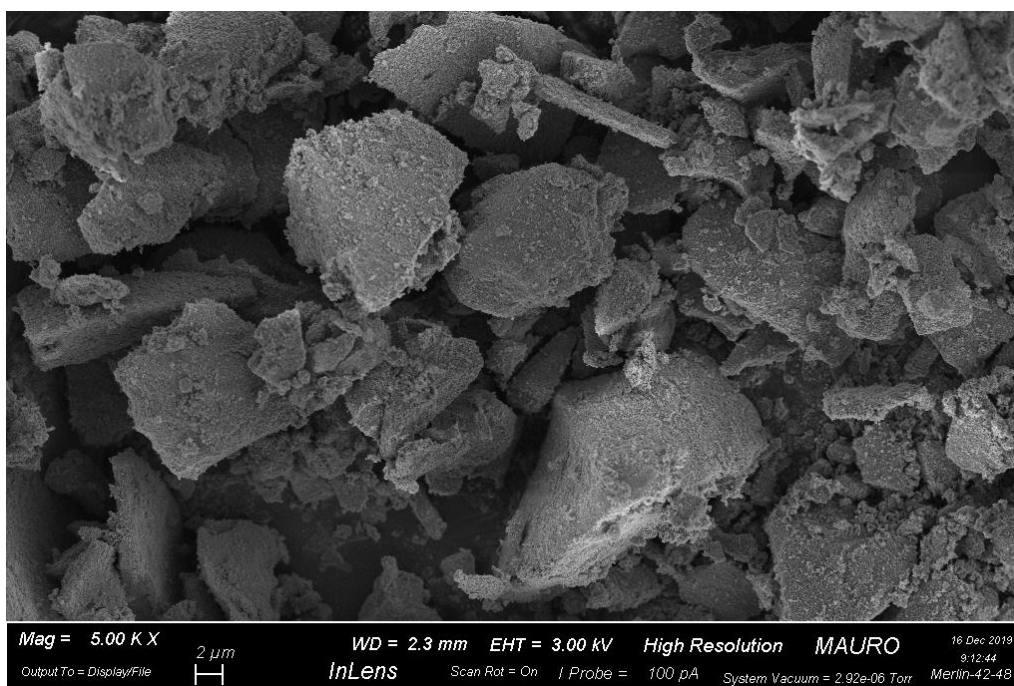


Figura 3.3: immagine FESEM con ingrandimento 5000 X

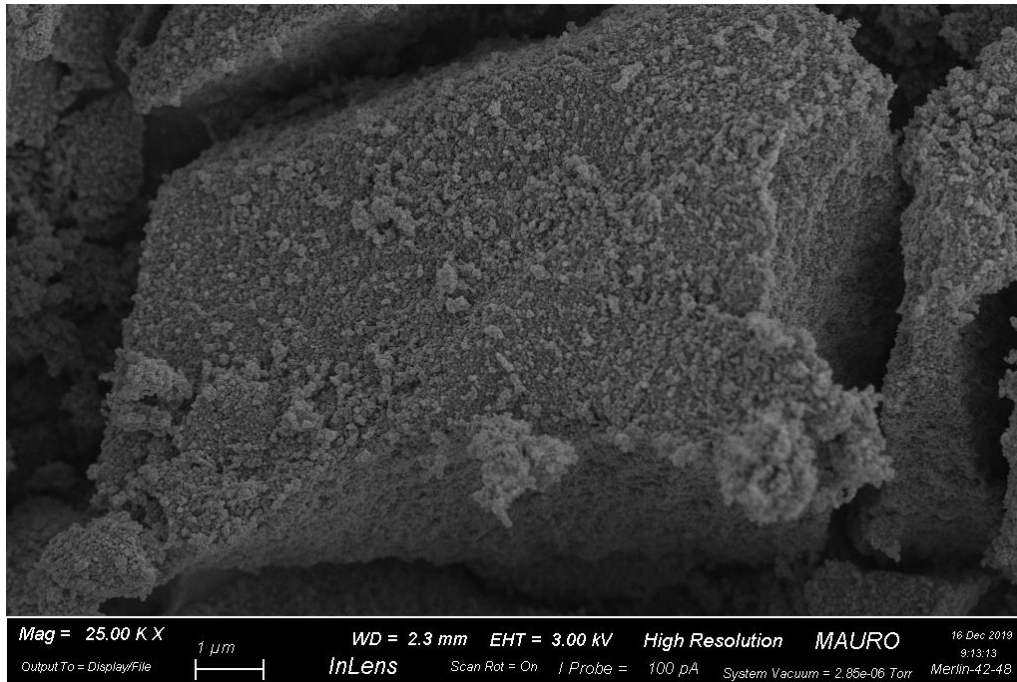


Figura 3.4: immagine FESEM con ingrandimento 25000 X

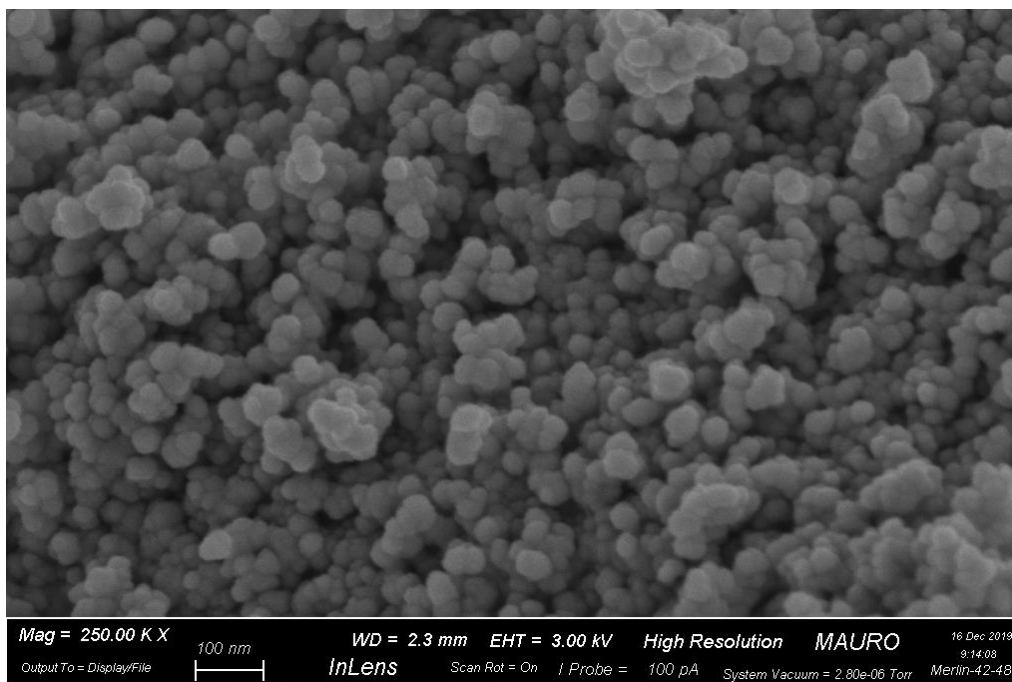


Figura 3.5: immagine FESEM con ingrandimento 250000 X

Le immagini FESEM ci danno informazioni riguardanti la morfologia, la topografia e le dimensioni delle particelle del materiale in esame[46]. Le figure mostrano aggregati micrometrici formati da nanoparticelle di forma non definita interconnesse tra loro. Le dimensioni di tali particelle, calcolate con imagej, sono variabili tra 25 e 60 nm. La dimensione media delle particelle è invece di 30 nm.

3.2 Caratterizzazione ZnO commerciale

Diffrazione a raggi X

L'analisi di diffrazione a raggi X effettuata sullo ZnO commerciale ci ha fornito lo spettro XRD mostrato in figura 3.6, caratteristico di un materiale cristallino con struttura wurtzita. Anche in questo caso, come per lo ZnO di sintesi, non si osservano picchi caratteristici di altre fasi.

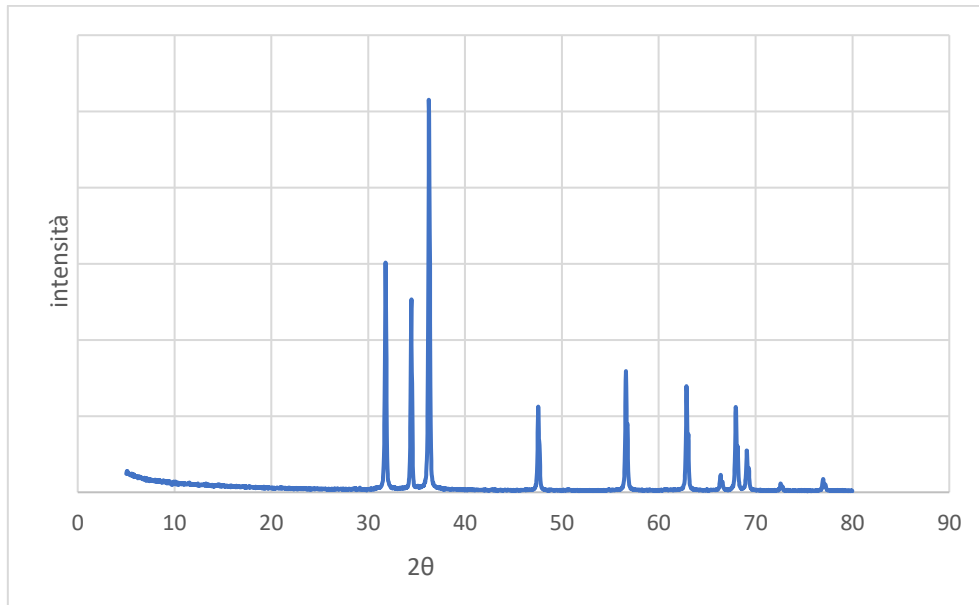


Figura 3.6: Spettro XRD dello ZnO commerciale

Fisisorbimento di azoto

Le analisi di fisisorbimento di azoto sullo ZnO commerciale hanno rivelato un'area superficiale specifica di 7,7 m²/g ed un volume poroso specifico di 0,03 cm³/g. L'isoterma di adsorbimento ottenuta, mostrata in figura 3.7, può essere riconosciuta in una isoterma di tipo II, caratteristica dei materiali non porosi.

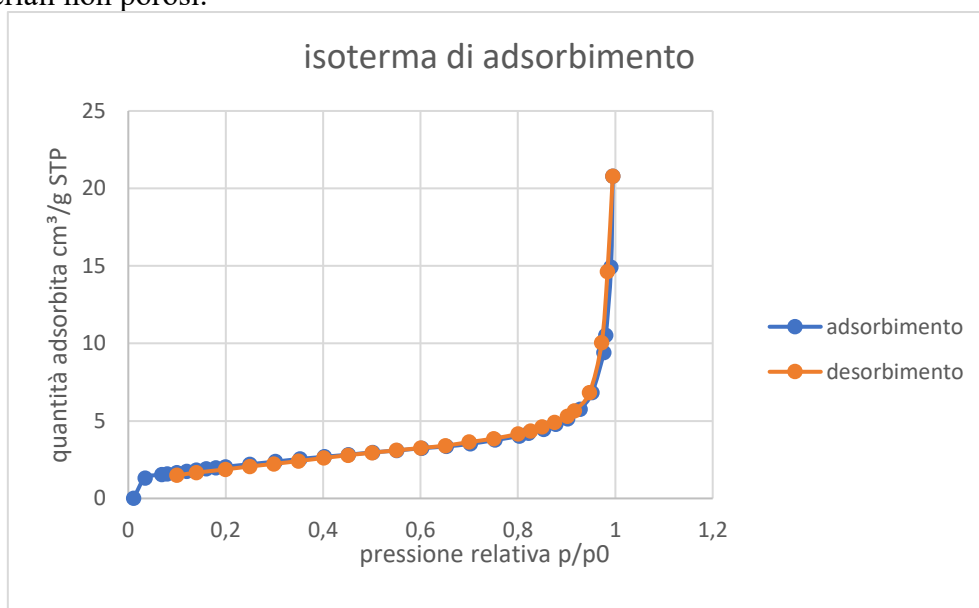


Figura 3.7 isoterma di adsorbimento ZnO commerciale

Microscopia a Scansione Elettronica ad emissione di campo (FESEM)

Le figure 3.8, 3.9 e 3.10 mostrano i risultati delle prove FESEM effettuate sul campione di ZnO commerciale.

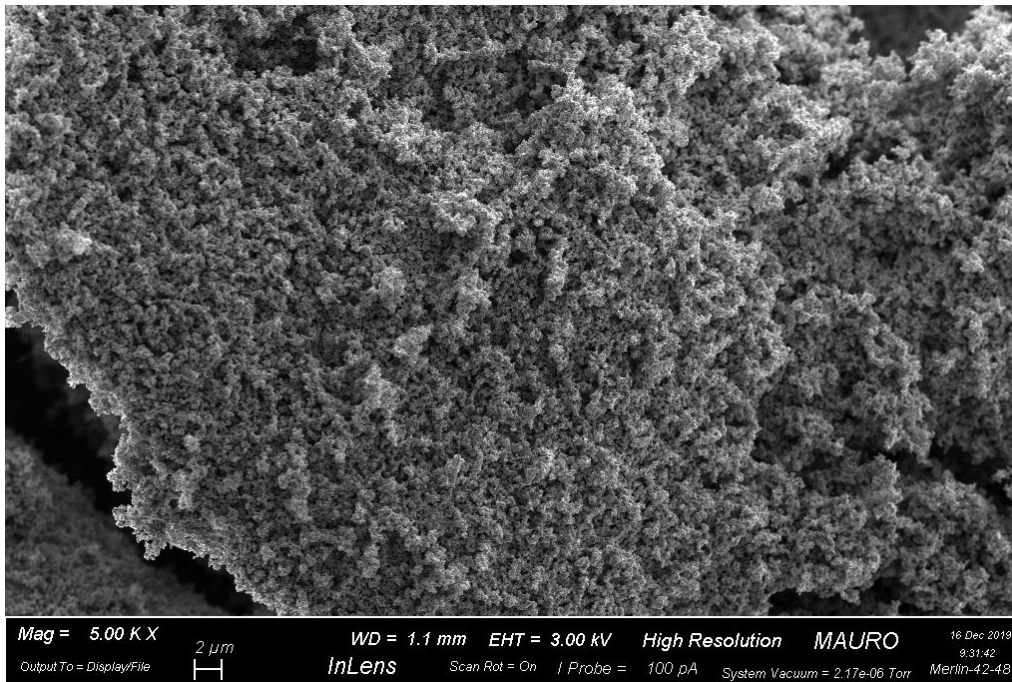


Figura 3.8: immagine FESEM con ingrandimento 5000 X

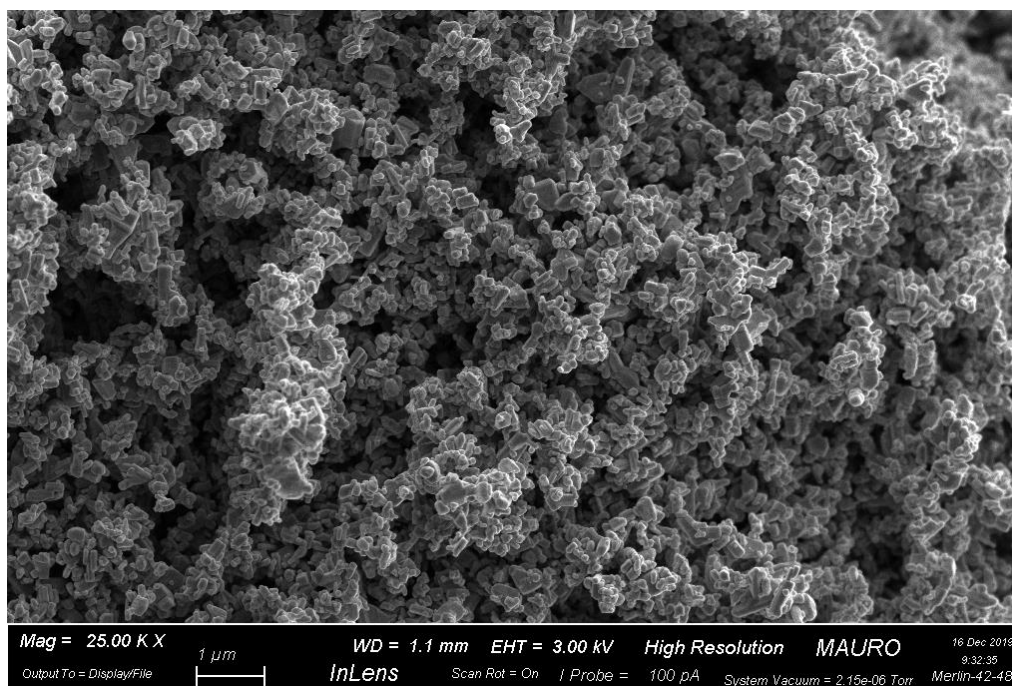


Figura 3.9: immagine FESEM con ingrandimento 25000 X

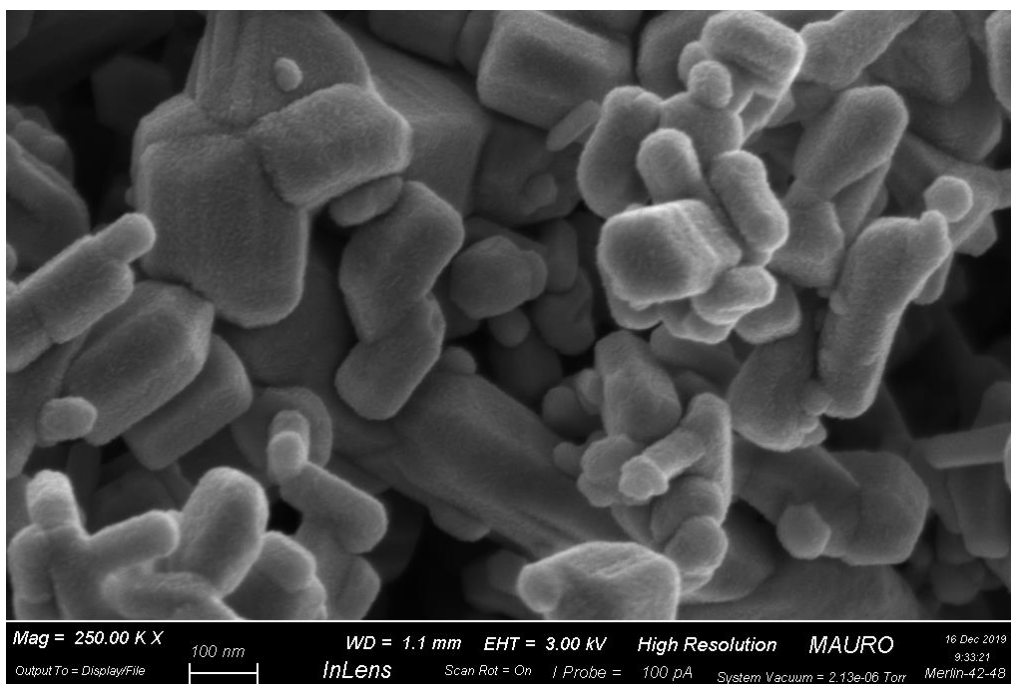


Figura 3.10: immagine FESEM con ingrandimento 250000 X

La forma delle particelle di ZnO commerciale risulta allungata, come visibile chiaramente nella figura 3.10 relativa all'ingrandimento 250000X.

Le dimensioni delle particelle, calcolate con imagej, sono variabili tra gli 80 ed i 450 nm, mentre la dimensione media è pari a 230 nm.

3.3 Confronto tra lo ZnO di sintesi e commerciale

Dalle caratterizzazioni effettuate sullo ZnO sintetizzato in laboratorio e sullo ZnO commerciale sono emerse importanti differenze tra i due materiali, riassunte nella tabella 3.1.

Parametro	ZnO di sintesi	ZnO commerciale
Porosità	poroso	Non poroso
Dimensione media particelle	30 nm	230 nm
SSA	29.67 m ² /g	7.7 m ² /g

Tabella 3.1: principali differenze tra ZnO di sintesi e commerciale

Lo ZnO di sintesi e quello commerciale sono costituiti da particelle che, oltre che per le dimensioni, differiscono anche per la morfologia. Come si può vedere dal confronto tra i due materiali mostrato in figura 3.11, le particelle dello ZnO di sintesi sono sferiche, mentre quelle dello ZnO commerciale hanno forma allungata.

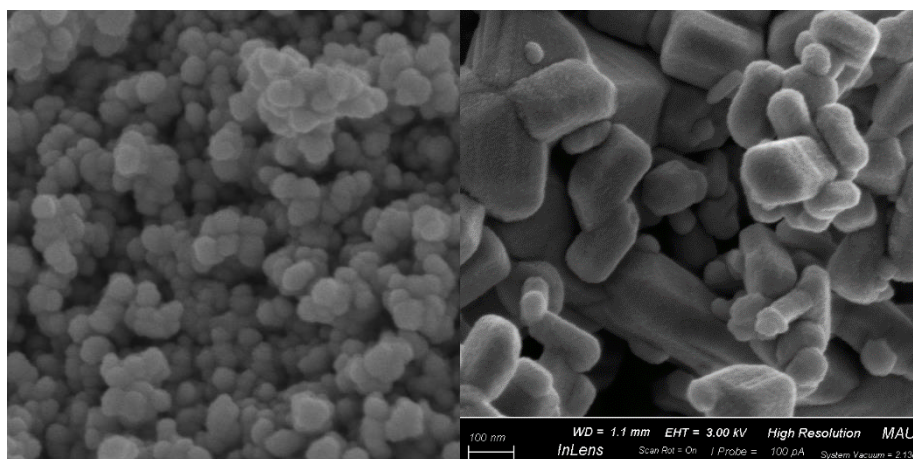


Figura 3.11: confronto tra la morfologia dello ZnO di sintesi (a sinistra) e ZnO commerciale (a destra)

3.4 Sintesi e caratterizzazione dei film proteici

3.4.1 Scelta del plastificante e della sua concentrazione

Come si è detto nel paragrafo 2.2.3, nella realizzazione dei film sono stati testati sia il glicerolo che il sorbitolo. I risultati ottenuti confermano quanto riscontrato in letteratura, ovvero che il glicerolo è il più adatto tra tutti i plastificanti perché produce dei film stabili, flessibili e resistenti a varie condizioni di umidità relativa[24]. Il sorbitolo invece è stato scartato perché i film prodotti sono molto fragili e difficilmente estraibili dagli stampi senza essere spezzati. Per quanto concerne il quantitativo di plastificante, sono state testate le concentrazioni di 60%, 80% e 120 % su peso secco delle proteine e per ciascuna di esse è stato valutato lo spessore del film ottenuto. I risultati sono mostrati in tabella 3.2.

% wt glicerolo	Spessore medio μm
60%	50.13
80%	130.31
120%	115.43

Tabella 3.2: variazione dello spessore medio del film in funzione della concentrazione di glicerolo.

Dalla tabella si nota un aumento dello spessore all'aumentare del quantitativo di plastificante. Questo comportamento è attribuibile alla natura idrofila del glicerolo che consente ai film di assorbire grossi volumi di acqua. Delle tre concentrazioni è stata scelta il 60% del peso secco, già utilizzata da Tricoli nel suo lavoro [21].

3.4.2 Scelta dello stampo

Come descritto nel paragrafo 2.2.4, sono molteplici gli stampi testati per la realizzazione dei film proteici. Tra tutti, quelli migliori sono risultati gli stampi in silicone perché consentono l'estrazione dallo stampo senza causare danni al film. Tuttavia, gli idrogeli prodotti su questi supporti hanno delle bolle al loro interno. La formazione di tali bolle andrebbe evitata perché queste aumentano la fragilità del film e ne riducono le proprietà barriera verso i gas.

3.4.3 Caratterizzazione dei film proteici

Analisi di solubilità

Per la prova di solubilità sono stati esaminati 4 campioni, aventi peso iniziale di 0.23, 0.29, 0.11 e 0.21 g. Al termine della prova, della durata di 24 ore, nessun campione risultava completamente solubilizzato, per cui ciascuno di essi è stato essiccato in stufa a 60°C fino al

raggiungimento del peso secco. Successivamente per ciascun campione è stato calcolato il rapporto di solubilità ottenendo i risultati mostrati in tabella 3.3.

Campione	Peso secco iniziale [g]	Peso secco finale [g]	Rapporto di solubilità
1	0.2338	0.1003	57.1%
2	0.2938	0.1216	58.6%
3	0.1076	0.0423	60.7%
4	0.2081	0.0784	62.3%

Tabella 3.3: risultati prove di solubilità

Dalla media tra i valori dei quattro campioni è stato ottenuto un rapporto di solubilità dei film proteici in acqua del 60%.

Analisi di permeabilità

Le prove di permeabilità all'ossigeno sono state effettuate su dei campioni di film proteici non funzionalizzati con lo ZnO. Da questa prova è risultato un valore medio di trasmissione pari a $24.5 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \text{ 24ore})$, dal quale i film sembrerebbero avere un buon effetto barriera verso l'ossigeno.

Analisi di swelling

Per la prova di swelling sono stati testati 4 campioni, due testati in acqua e due in tampone fosfato salino. I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 3.4:

campione	solvente	Peso secco iniziale [g]	Peso finale [g]	Rapporto di rigonfiamento
1	Acqua	0.269	0.918	241.3%
2	Acqua	0.41	1.257	206.6%
3	PBS	0.137	0.367	167.9%
4	PBS	0.225	0.534	137.3%

Tabella 3.4: risultati prove di swelling

Dalla media dei rapporti di rigonfiamento dei quattro campioni si ottiene un rapporto di rigonfiamento di 223.9% in acqua e 152,6% in PBS.

Analisi FESEM

Le analisi FESEM sono state effettuate su un campione funzionalizzato con le particelle di ZnO commerciale e su uno non funzionalizzato. Nella figura 3.12 è mostrata una immagine della superficie del film privo di ossido, dalla quale si riscontra una morfologia simile a quella trovata in letteratura, ma anche la presenza di bolle. La formazione di bolle nei film andrebbe evitata perché danno luogo ad una struttura disomogenea e permeabile ai gas. Questa porosità è presente anche nei film funzionalizzati, come è possibile notare dalla figura 3.13. In tutte le immagini si osservano delle cricche nel materiale, che si sono probabilmente generate durante la prova stessa a causa delle condizioni di vuoto spinto da essa richieste.

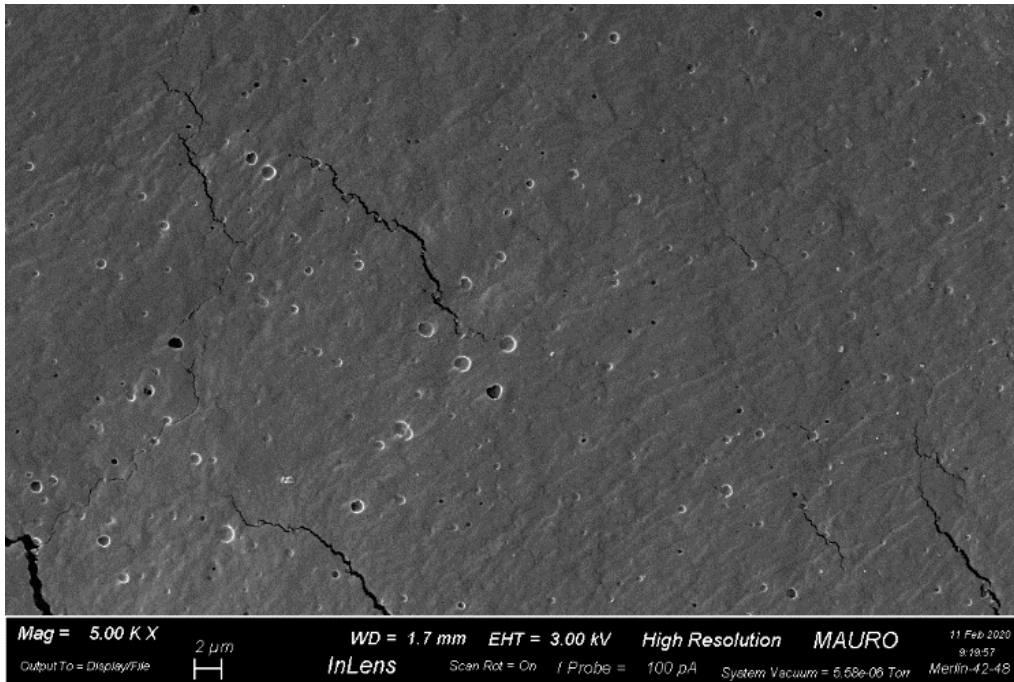


Figura 3.12: immagine FESEM del film non funzionalizzato con ingrandimento 5000 X

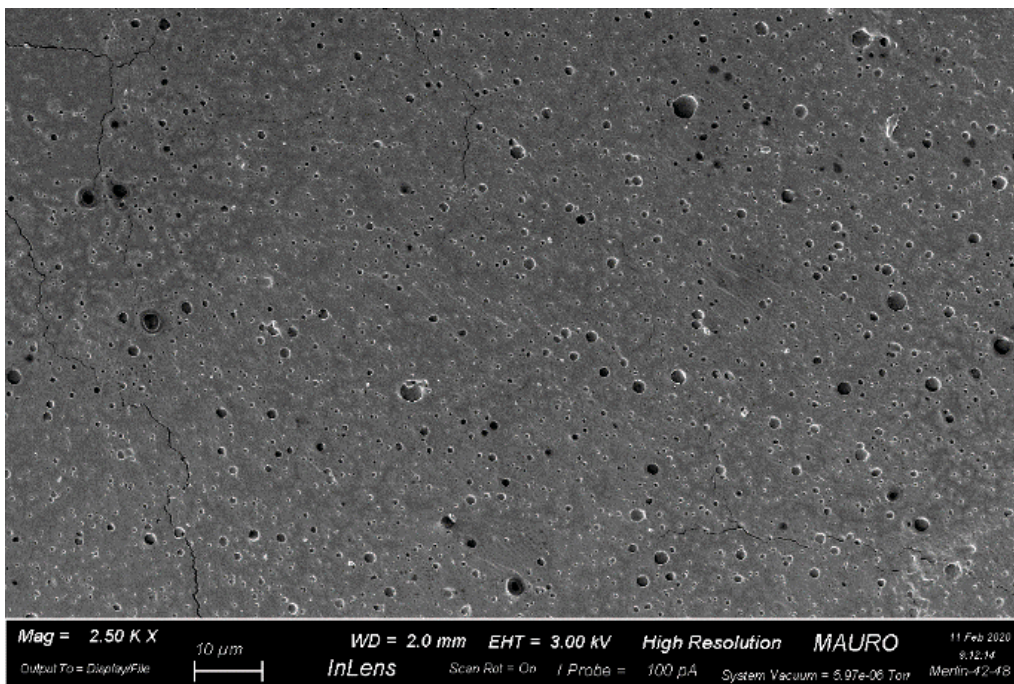


Figura 3.13: immagine FESEM del film funzionalizzato con ingrandimento 2500 X

Dall'ingrandimento superiore della superficie dei film mostrato nella figura 3.14, è possibile riconoscere degli aggregati di particelle dispersi nella matrice. L'aggregazione della polvere è un fenomeno che andrebbe evitato, in quanto in forma di aggregato l'azione antimicrobica delle nanoparticelle si riduce.

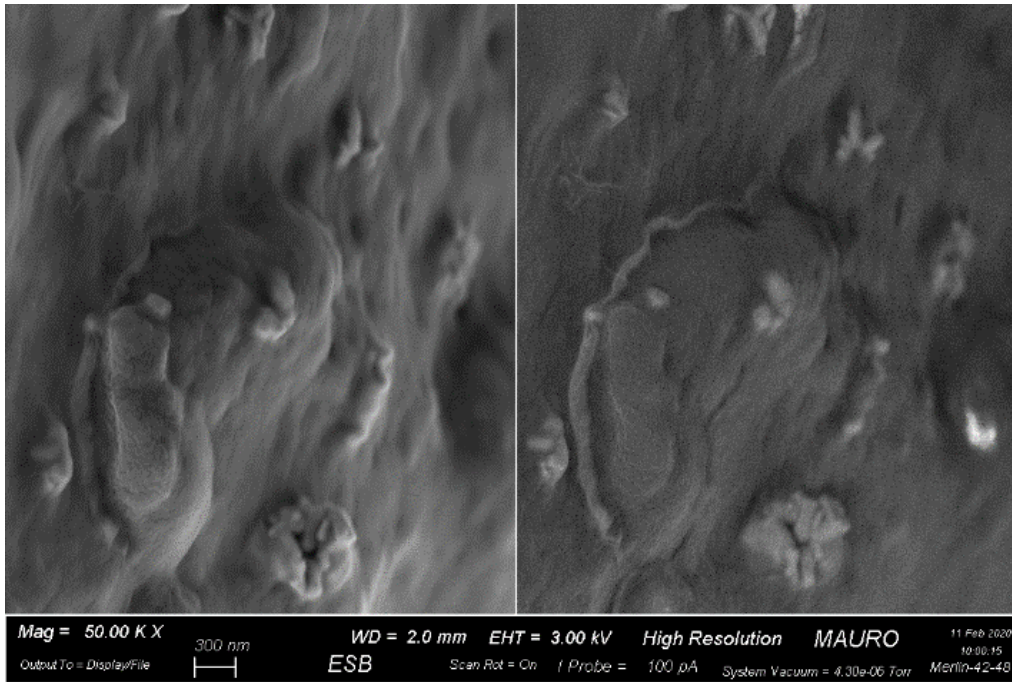


Figura 3.14: immagine FESEM ottenuta con ingrandimento 50000 X rappresentante particelle di ZnO commerciale disperse nel film sotto forma di aggregato

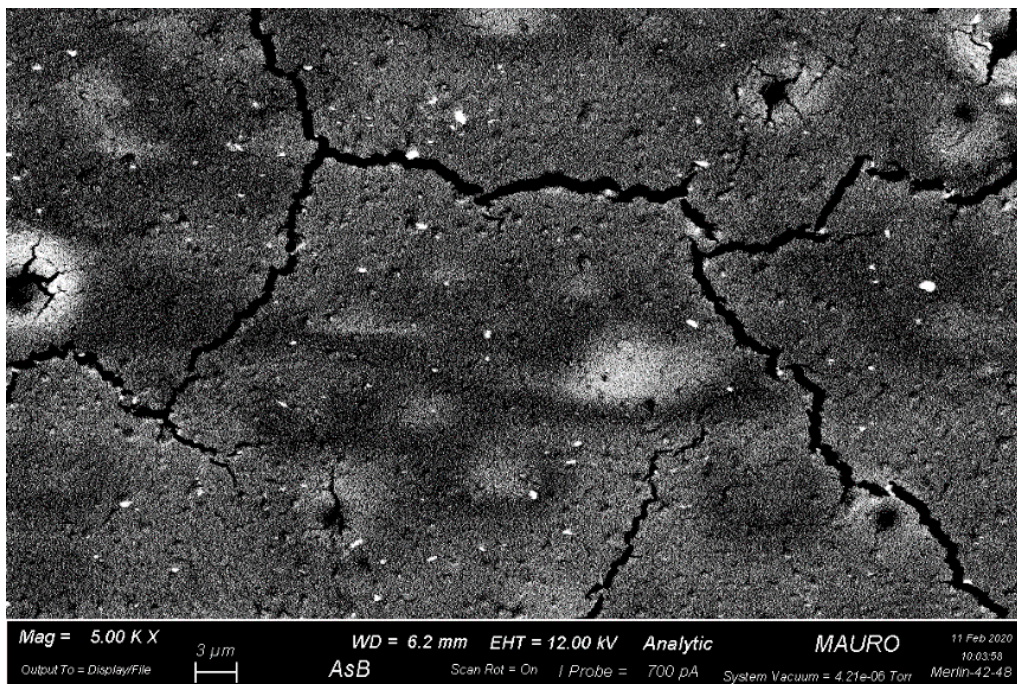


Figura 3.15: immagine FESEM ottenuta con ingrandimento 5000 X rappresentante la distribuzione delle nanoparticelle nel film

Le analisi FESEM ci hanno consentito di valutare anche la distribuzione delle nanoparticelle nella matrice proteica che, come si può notare dalla figura 3.15, risulta disomogenea. Le chiazze più chiare visibili nell'immagine rappresentano zone a maggiore densità di particelle di ZnO.

3.5 Prove per la valutazione dell'attività antimicrobica

Le prove per la valutazione dell'attività antimicrobica dello ZnO commerciale e di sintesi sono state effettuate testando sia lo ZnO in sospensione, che il biocomposito. I test con le sospensioni di ZnO sono stati effettuati applicando quattro diversi metodi: il metodo "Broth macro-dilution" effettuato in provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL, il metodo "Broth micro-dilution" effettuato in piastre multiwell da 96 pozzetti, ed i due metodi Kirby-Bauer della diffusione in agar modificati "Agar well-diffusion" e metodo della goccia. Le prove antimicrobiche con i biocompositi sono state effettuate invece con il metodo delle strisce parallele. In tutte le prove antimicrobiche sono state testate due differenti tipologie di ZnO: uno commerciale (controllo) e uno di sintesi. Nel primo caso si tratta di un materiale bulk costituito da particelle solide di forma allungata e dimensione tra gli 80 ed i 450 nm, mentre nel secondo di un materiale nanostrutturato con particelle di dimensioni comprese tra i 25 ed i 60 nm. Lo ZnO commerciale ha area superficiale specifica circa quattro volte inferiore ($7.6 \text{ m}^2/\text{g}$) rispetto a quello di sintesi ($29.67 \text{ m}^2/\text{g}$) e questo ci ha consentito di valutare l'influenza di tale parametro nell'attività antimicrobica.

3.5.1. Metodo "Broth macro-dilution" effettuato in provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL

Il metodo "Broth macro-dilution" è stato eseguito applicando la procedura descritta nel paragrafo 2.3.1.1. Le prime prove, effettuate per definire quale fosse il metodo migliore per valutare l'efficacia antimicrobica dello ZnO in sospensione, sono state realizzate testando il batterio Gram (+) *S. epidermidis*. La scelta di testare lo ZnO con un batterio Gram(+) è dovuta ai risultati di precedenti studi trovati in letteratura. Azam et al (2012) [29] hanno valutato l'azione antimicrobica dello ZnO nanostrutturato con il metodo Kirby-Bauer modificato "agar well-diffusion", nei confronti dei batteri Gram(+) *B.subtilis* ed *S.aureus* e dei Gram(-) *P.aeruginosa* ed *E.coli*. Leone et al (2019) [44] hanno valutato l'attività antimicrobica di due diverse morfologie di ZnO nei confronti del batterio Gram(+) *S.aureus* e del Gram(-) *K.pneumoniae* mediante il metodo "Broth micro-dilution". In entrambi gli studi i batteri Gram(+) si sono mostrati maggiormente sensibili all'azione antimicrobica dello ZnO. Per questo motivo in queste prove preliminari è stato deciso di testare l'agente antimicrobico solo nei confronti di *S.epidermidis*.

In questa prova sono stati allestiti in provette tipo Eppendorf di capacità 2 mL (macro-diluzione) due campioni biotici, contenenti l'inoculo e le sospensioni di ZnO a due diverse concentrazioni, ed un controllo biotico, contenente l'inoculo ma privo di agente antimicrobico. L'inoculo batterico iniziale è 10^5 UFC/mL, mentre la concentrazione di ZnO nei due diversi campioni biotici è pari rispettivamente a 15000 e 7500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Queste concentrazioni sono state scelte in base ai risultati ottenuti in un precedente lavoro (Leone et al 2019), nel quale rappresentavano le concentrazioni più elevate testate[44]. Una volta allestiti, i campioni sono stati incubati a 37°C in condizione di agitazione a 200 rpm per 24 ore. Al termine del tempo di incubazione, da ciascun campione biotico e dal controllo biotico è stato effettuato un prelievo del liquido colturale. Questo, dopo essere stato diluito opportunamente è stato inoculato disperdendo 100 μL di sospensione microbica su terreno solido MHA. Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C ed al termine dell'incubazione sono state esaminate per valutare l'effetto antimicrobico dello ZnO.

Dai risultati della prova antimicrobica è emerso che nessuna delle due concentrazioni testate (15000 e 7500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) per lo ZnO commerciale e per quello di sintesi è stata efficace

nell'inibire completamente la crescita microbica. Nonostante ciò, è stato comunque possibile riscontrare una influenza sulla crescita microbica da parte di entrambe le tipologie di ZnO testate. Infatti, come visibile chiaramente nella figura 3.16 per lo ZnO commerciale e nella 3.17 per quello di sintesi, il numero di colonie batteriche presenti nei due campioni biotici è nettamente inferiore rispetto al controllo biotico, a parità di diluizione. Tale effetto è più evidente per la concentrazione di ZnO di 15000 µg/mL.

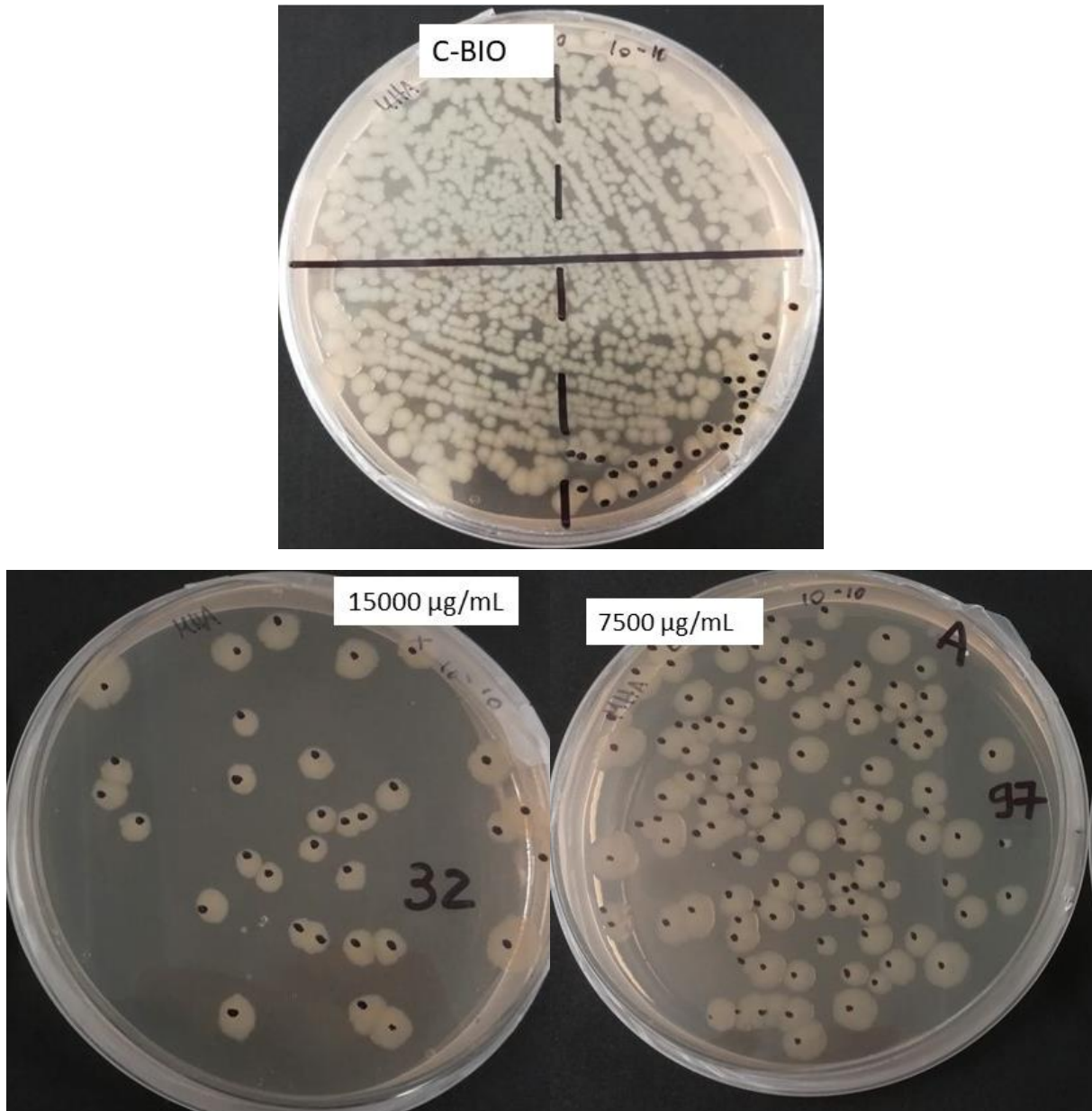


Figura 3.16: effetto dello ZnO commerciale testato con *S.epidermidis* nella diluizione 10^{-10} : confronto tra controllo biotico (C-BIO in alto), campione biotico con concentrazione di ZnO 15000 µg/mL (in basso a sinistra) e campione biotico con concentrazione di ZnO di 7500 µg/mL (in basso a destra);

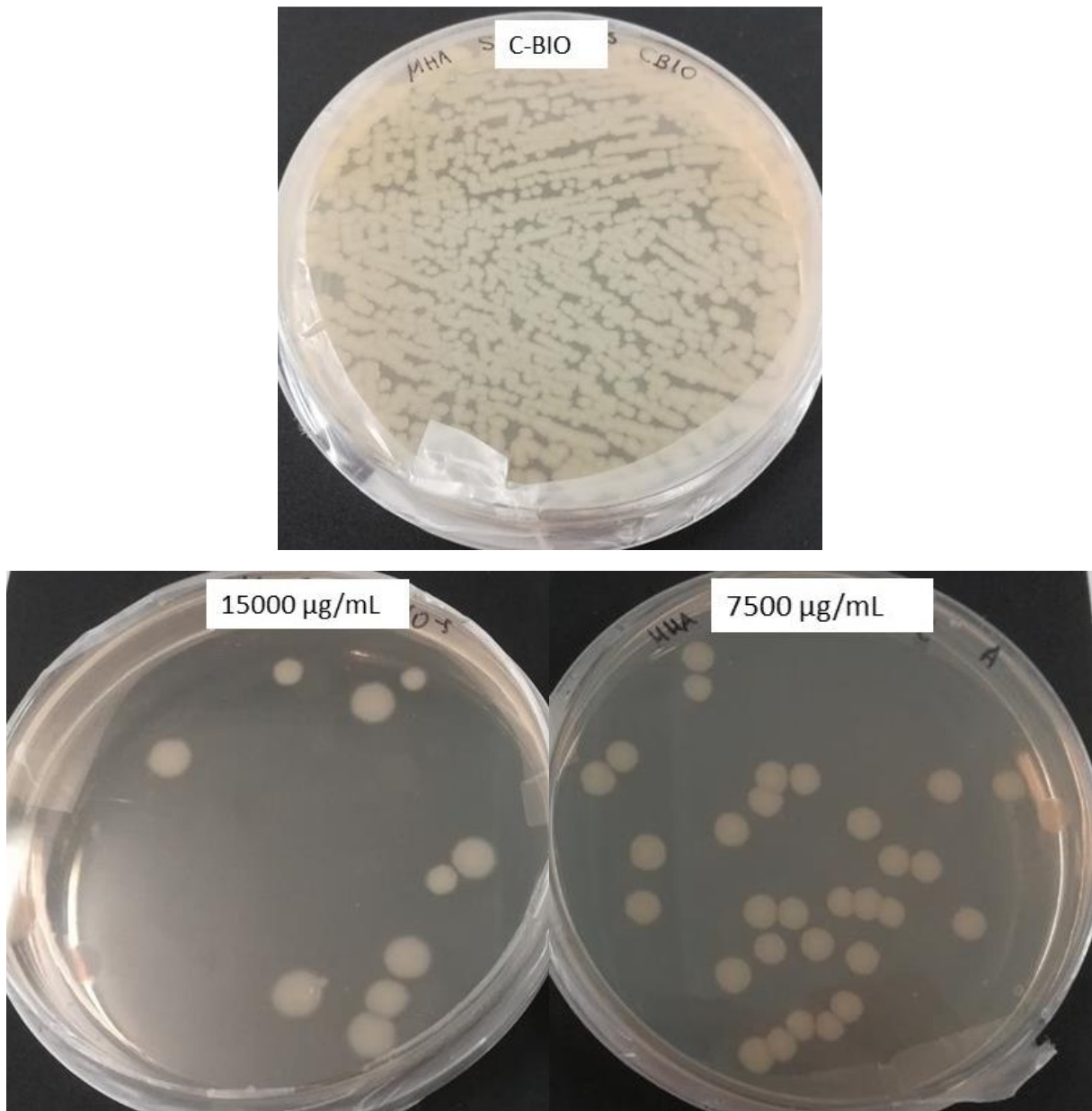


Figura 3.17: effetto dello ZnO di sintesi testato con *S.epidermidis* nella diluizione 10^{-5} : confronto tra controllo biotico (C-BIO in alto), campione biotico con concentrazione di ZnO 15000 $\mu\text{g/mL}$ (in basso a sinistra) e campione biotico con concentrazione di ZnO di 7500 $\mu\text{g/mL}$ (in basso a destra);

In questa prova è stato anche possibile notare una diversa efficacia dello ZnO commerciale rispetto a quello di sintesi nei confronti di *S.epidermidis*. Infatti, come si può vedere nella figura 3.18, a parità di fattore di diluizione e di concentrazione di ZnO (15000 $\mu\text{g/mL}$) il numero di colonie presenti nel campione con lo ZnO commerciale è nettamente superiore rispetto al campione con lo ZnO di sintesi.

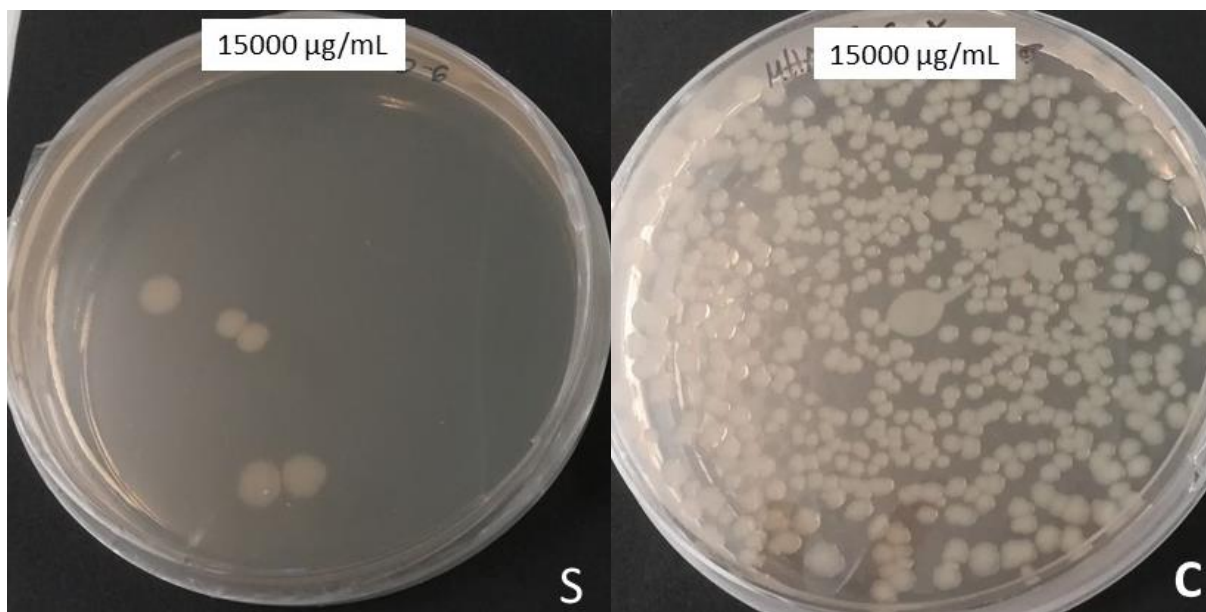


Figura 3.18: confronto tra effetto inibitorio dello ZnO di sintesi (a sinistra) e di quello commerciale (a destra) testati con *S.epidermidis* a parità di fattore di diluizione (10^{-6}) e concentrazione di ZnO (15000 µg/mL)

Sebbene sia stata riscontrata una influenza sulla crescita microbica maggiore da parte dell'ossido di zinco di sintesi rispetto a quello commerciale ed un effetto dovuto alla concentrazione, non è stato possibile osservare una completa inibizione della crescita batterica. Probabilmente il metodo utilizzato non è particolarmente adatto per testare sospensioni scarsamente disperse come quella di ZnO oggetto del presente lavoro di tesi. Per questo motivo si è deciso di provare altri test di suscettibilità antimicrobica, più adatti alla matrice in esame, al fine di giungere alla determinazione della minima concentrazione inibente la crescita microbica (MIC).

3.5.2. Metodo “Broth micro-dilution” effettuato in piastre multiwell da 96 pozzetti

In questa prova è stata testata l'azione antimicrobica dello ZnO di sintesi e di quello commerciale con *S.epidermidis*, secondo la procedura descritta al paragrafo 2.3.1.2. Anche in questo caso il test è stato effettuato solamente con il batterio Gram(+), essendo questi batteri più sensibili all'azione dell'agente antimicrobico [44] [29][47].

Il metodo, allestito in piastre multiwell da 96 pozzetti, consiste nel testare concentrazioni scalari di ZnO mantenuto in sospensione in PBS, per la determinazione della MIC. Questa è valutata tramite un confronto visivo della crescita microbica (torbidità) nei campioni biotici (contenenti l'inoculo e la sospensione di ZnO) rispetto al controllo abiotico (contenente la sospensione di antimicrobico ma non il microrganismo). Per questa prova sono state allestite due piastre, una per lo ZnO commerciale ed una per quello di sintesi ed in entrambe sono state testate le seguenti concentrazioni di agente antimicrobico: 20000, 17500, 15000, 7500, 3750, 1920, 960, 480, 240, 120, 60, 30 µg/mL. Per questa prova è stato preparato un inoculo corrispondente a 10^5 UFC/mL che è stato utilizzato in una concentrazione pari al 10% ed al 50% del volume colturale complessivo

Dopo aver incubato le piastre per 12 ore alla temperatura di 37°C in agitazione a 150 rpm è stata fatta l'analisi visiva per la determinazione della MIC, dalla quale sono emersi i seguenti risultati:

- Nei campioni biotici contenenti un volume di inoculo del 50% nessuna delle concentrazioni testate sia di ZnO commerciale che di sintesi è stata in grado di inibire la crescita microbica. Il mancato funzionamento di entrambe le tipologie di ossido di zinco può essere attribuito all'insufficienza del numero di particelle di antimicrobico rispetto alla quantità di cellule batteriche presenti nell'inoculo.
- Nei campioni biotici contenenti lo ZnO commerciale e volume di inoculo del 10% non è stata osservata crescita microbica nei pozzetti con concentrazione di ossido pari a 20000 e 17500 $\mu\text{g/mL}$ (evidenziati dal riquadro rosso della figura 3.19). Quest'ultima concentrazione, essendo la più bassa in grado di inibire la crescita microbica è stata assunta come MIC nei confronti di *S.epidermidis* per lo ZnO commerciale.
- Nei campioni biotici contenenti lo ZnO di sintesi e il 10% di inoculo non è stata osservata la crescita nei pozzetti contenenti le concentrazioni di ZnO di 20000 e 17500 $\mu\text{g/mL}$ (evidenziati dal riquadro rosso nella figura 3.20). Per la concentrazione di 15000 $\mu\text{g/mL}$ la sola analisi visiva non ha invece consentito di escludere con certezza la presenza di crescita. Per questo motivo, anche per l'ossido di zinco di sintesi è stata assunta come MIC nei confronti di *S.epidermidis* la concentrazione di ZnO di 17500 $\mu\text{g/mL}$.

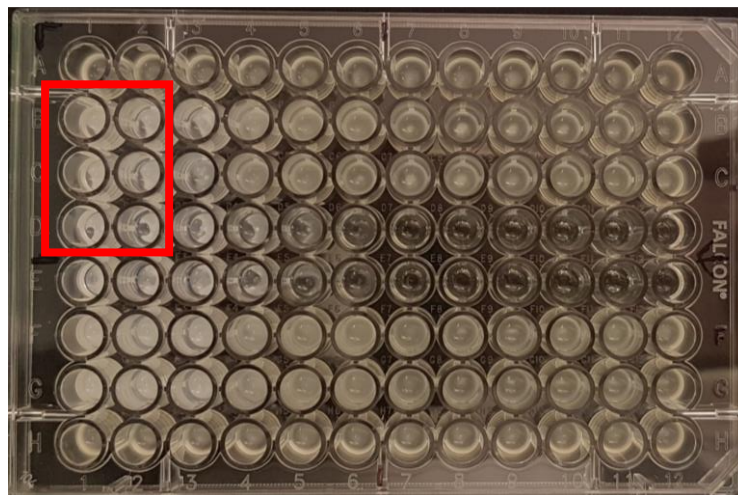


Figura 3.19: piastra multiwell da 96 pozzetti in cui è stato testato lo ZnO commerciale con *S.epidermidis*.



Figura 3.20: piastra multiwell da 96 pozzetti in cui è stato testato lo ZnO di sintesi con *S.epidermidis*.

Per i pozzetti dove non è stata osservata crescita microbica, contenenti l'antimicrobico (20000, 17500 $\mu\text{g/mL}$) e 10% di inoculo, è stata valutata la minima concentrazione battericida (MBC). Da ciascuno di questi pozzetti sono stati prelevati 10 μL di liquido colturale ed inoculati su terreno MHA. Al termine dell'incubazione (12 ore a 37°C), le piastre inoculate sono state osservate: in tutte era evidente una cospicua crescita microbica, come mostrato nella figura 3.21, relativa al campione con concentrazione di ZnO di 20000 $\mu\text{g/mL}$.

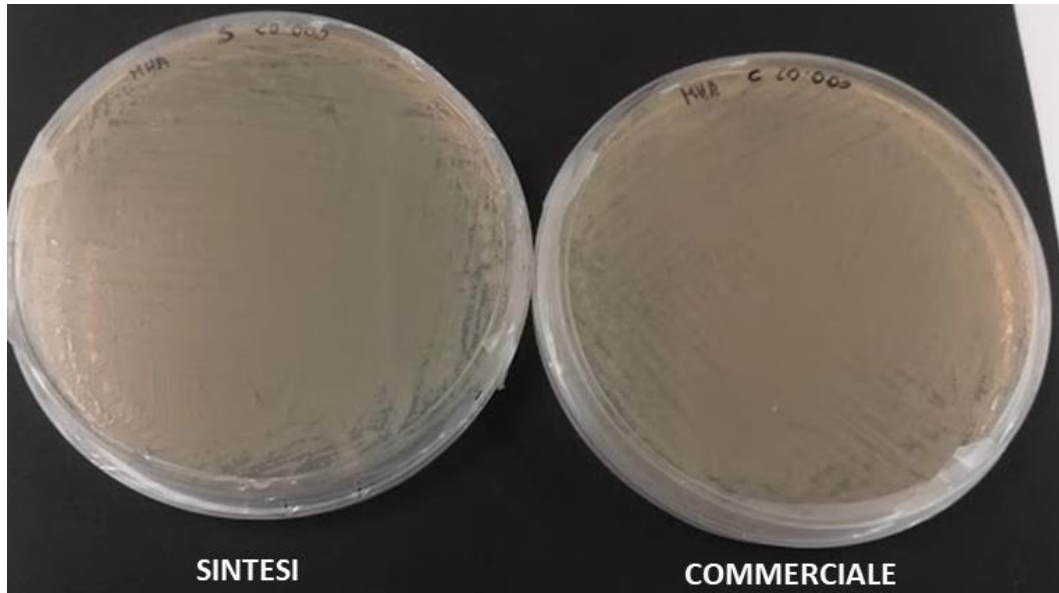


Figura 3.21: campioni biotici con concentrazione di ZnO (di sintesi a sinistra e commerciale a destra) di 20000 $\mu\text{g/mL}$ e 10% di inoculo di *S.epidermidis*.

Probabilmente anche questo metodo non è particolarmente adatto per valutare l'efficacia antimicrobica dello ZnO in sospensione. Infatti, nonostante le piastre multiwell siano state poste in agitazione, le particelle di ZnO non sono rimaste in sospensione ma sono sedimentate compattandosi sul fondo dei pozzetti. Una volta compattate tra loro, si perde il contatto diretto tra le particelle di antimicrobico e le cellule batteriche, necessario per una interazione di tipo fisico. Inoltre, il rilascio di ioni zinco dalle particelle compattate sul fondo risulta rallentato. Per questi motivi l'efficacia delle particelle di ZnO risulta notevolmente ridotta.

3.5.3 Metodo Kirby-Bauer- della diffusione in agar modificato, “agar well-diffusion”

Il metodo utilizzato è una variante del metodo “Kirby Bauer”, secondo la procedura standard “EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing – 8.0. In questa prova, è stato testato solo *S.epidermidis*, batterio Gram(+), particolarmente sensibile alla sostanza antimicrobica in esame [44][29][47]. Per questo microrganismo è stato realizzato un inoculo standardizzato con concentrazione 10^6 UFC/mL. L'ossido di zinco è stato testato sia nella forma nanostrutturata (ossido di sintesi) che nella forma bulk (ossido commerciale) e sono state testate le seguenti concentrazioni 40000, 35000, 30000, 20000, 17500, 15000, 10000, 7500, 3750, 1920, 960, 480, 240 $\mu\text{g/mL}$. In questa prova, oltre a quelle già utilizzate nelle precedenti, sono state testate concentrazioni di ZnO molto più elevate (40000, 35000, 30000 $\mu\text{g/mL}$).

Il metodo consiste nel disperdere 100 μL di inoculo standardizzato sul terreno solido MHA e nel realizzare sullo stesso terreno dei pozzetti del diametro di 8 mm. Ciascuno di essi è riempito con 70 μL di una sospensione di ZnO in PBS ad una diversa concentrazione; al termine

dell'incubazione (12 ore a 37°C), si esamina la dimensione dell'eventuale alone di inibizione attorno al pozzetto.

In questa prova, come possibile notare dalle figure 3.22 e 3.23, non è stato osservato l'alone di inibizione per nessuna delle concentrazioni di ZnO di sintesi e commerciale testate. L'inefficacia dell'antimicrobico, probabilmente, è stata causata dall'assorbimento del solvente nel terreno solido, che ha comportato la sedimentazione delle particelle di ZnO sul fondo. Una volta depositate, le particelle non sono state più in grado di diffondere ed inibire la crescita del microorganismo.

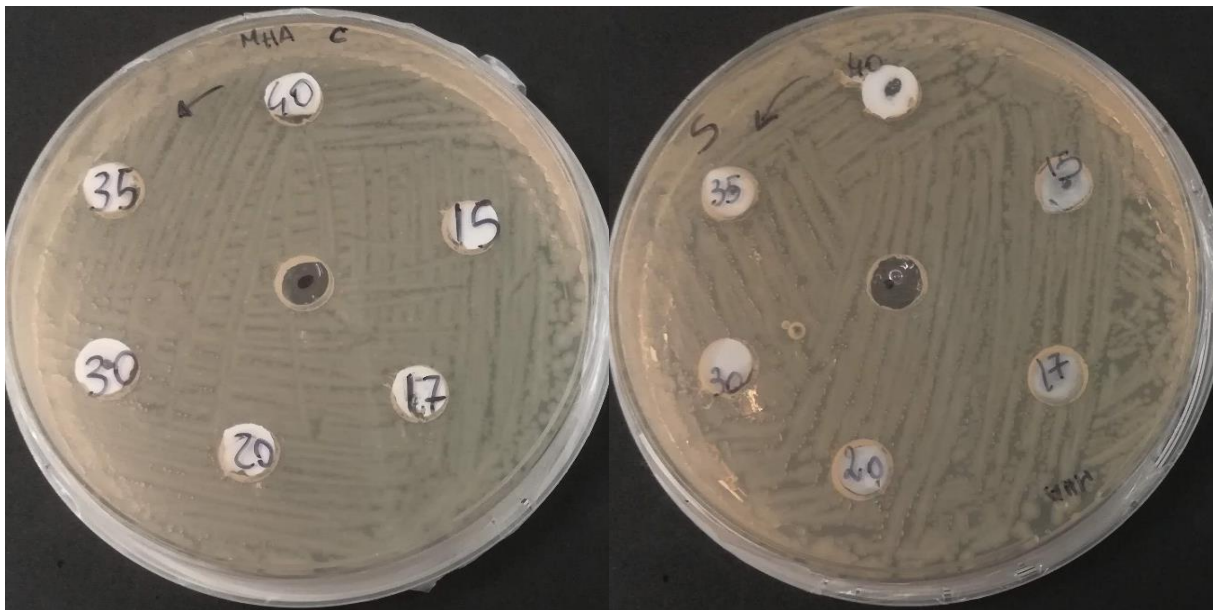


Figura 3.22: piastre di MHA inoculate con *S.epidermidis* testato con le concentrazioni di ZnO commerciale (a sinistra) e sintesi (a destra) dalla 40000 alla 15000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (proseguendo in senso antiorario) .

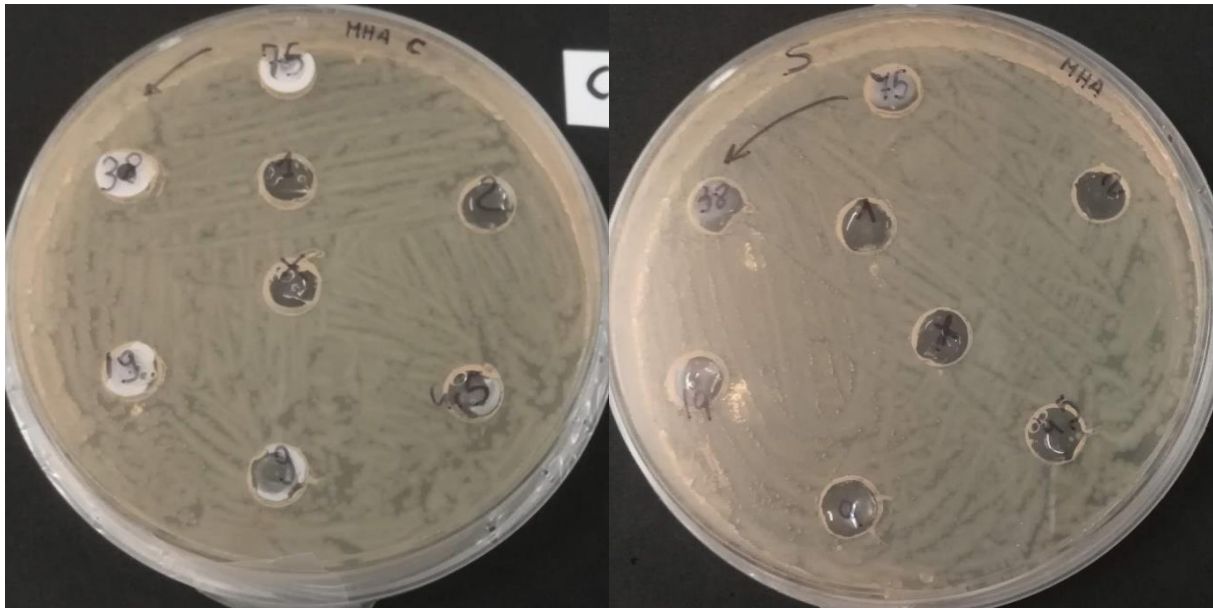


Figura 3.23: piastre di MHA inoculate con *S.epidermidis* testato con le varie concentrazioni di ZnO commerciale (a sinistra) e sintesi (a destra) dalla 7500 alla 220 µg/mL (proseguendo in senso antiorario) .

3.5.4 Metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar modificato, metodo della goccia.

In questa prova è stato applicato il metodo “Kirby Bauer”, secondo la procedura standard “EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing – 8.0”. A questo metodo sono state apportate delle modifiche in quanto, impregnando i dischetti di carta della sospensione di antimicrobico, si rischia che la polvere di ZnO si compatti su di essi e non riesca più a diffondere. Per questo motivo, le sospensioni di ZnO alle varie concentrazioni sono state depositate direttamente sul terreno inoculato in forma di goccia da 20 µL. In questa prova sono stati testati sia l’ossido di zinco commerciale che quello di sintesi con il batterio Gram(+) *S.epidermidis* ed il batterio Gram(-) *E.coli*. Per entrambi i batteri è stato utilizzato l’inoculo corrispondente a 10^6 UFC/mL. Le sospensioni di ZnO sono state realizzate in due diversi solventi:

- Acqua distillata, avente pH nel range 6.0-6.2;
- Tampone fosfato salino (PBS) avente pH di 7.4;

La scelta di realizzare le sospensioni di ZnO in due diversi solventi è stata fatta per stabilire se i pH acidi incrementino l’efficacia antimicrobica favorendo il rilascio di ioni Zn^{2+} .

Le concentrazioni di ZnO commerciale e di sintesi testate sono 40000, 35000, 30000, 20000, 17500, 15000, 10000 e 7500 µg/mL. Considerata l’inefficacia antimicrobica delle concentrazioni inferiori alla 7500 µg/mL, sperimentata nelle precedenti prove, le concentrazioni dalla 3750 alla 30 µg/mL non sono state testate in questa prova.

Effetto dello ZnO di sintesi

Questo metodo, tra tutti quelli testati, si è rivelato come il più efficace per la valutazione dell'attività antimicrobica dello ZnO in sospensione. Infatti, per entrambi i batteri testati con lo ZnO di sintesi, disperso sia in acqua che in PBS, è stato possibile osservare la presenza di un alone di inibizione. Le dimensioni (in mm) delle zone di inibizione, riportate nella tabella 3.5 per *S.epidermidis* e nella 3.6 per *E.coli*, sono da intendersi come valori mediati. Le tabelle riportano solamente le zone di inibizione relative alle concentrazioni di ZnO di 40000, 35000, 30000 e 20000 µg/mL, più facilmente distinguibili.

Concentrazione di ZnO [µg/mL]	Zona di inibizione [mm]	
	ZnO in acqua	ZnO in PBS
40000	3	2
35000	4	2
30000	4	2
20000	3	1

Tabella 3.5: zone di inibizione generati dalle sospensioni di ZnO di sintesi in acqua ed in PBS per *S.epidermidis*

Concentrazione di ZnO [µg/mL]	ZnO in acqua	ZnO in PBS
40000	1	1
35000	1	1
30000	2	1
20000	2	-

Tabella 3.6: zone di inibizione generati dalle sospensioni di ZnO di sintesi in acqua ed in PBS per *E.coli*

Dall'analisi dei risultati ottenuti con lo ZnO di sintesi è stato possibile trarre importanti considerazioni:

- L'attività antimicrobica dello ZnO è più efficace nei confronti di *S.epidermidis* rispetto a *E.coli*, confermando la maggiore sensibilità dei batteri Gram positivi all'agente antimicrobico, già dimostrata in precedenti studi [44][29][47]. Infatti, come si può vedere nelle figure 3.24 e 3.25, e dai valori riportati nelle Tabelle 3.5 e 3.6, l'alone di inibizione generatosi con le sospensioni di ZnO a più elevata concentrazione è maggiore per *S.epidermidis*. Le zone di inibizione nel caso delle sospensioni di ZnO in acqua con concentrazione 40000 e 35000 µg/mL sono pari rispettivamente a 3 e a 4 mm per *S.epidermidis* e ad 1 mm per *E.coli*. Nel caso invece delle sospensioni di ZnO in PBS, le zone di inibizione per le medesime concentrazioni di 40000 e 35000 µg/mL sono pari rispettivamente a 2 mm per *S.epidermidis*, ed a 1 mm per *E.coli*.

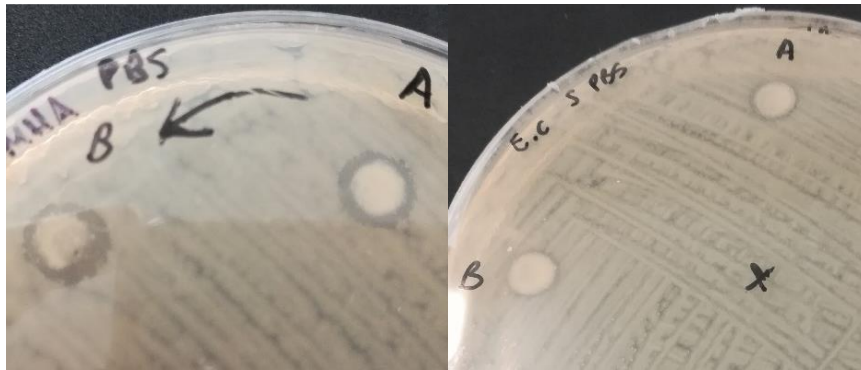


Figura 3.24: aloni di inibizione per le sospensioni di ZnO di sintesi in PBS con concentrazione di ZnO di 40000 µg/mL (A) e 35000 µg/mL (B) per *S.epidermidis* a sinistra ed *E.coli* a destra.

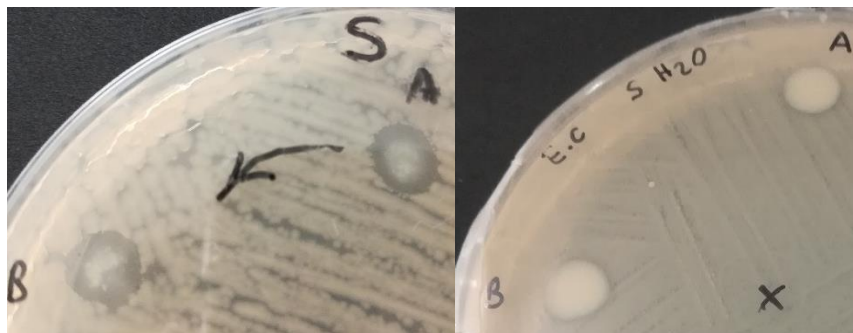


Figura 3.25: aloni di inibizione per le sospensioni di ZnO di sintesi in acqua con concentrazione di ZnO di 40000 µg/mL (A) e 35000 µg/mL (B) per *S.epidermidis* a sinistra ed *E.coli* a destra.

- L'effetto antimicrobico dello ZnO è influenzato dal pH del solvente in cui si realizza la sospensione. Infatti, nel caso di *S.epidermidis* a parità di concentrazione di antimicrobico l'effetto delle sospensioni di ZnO in acqua (pH circa pari a 6) è risultato maggiore rispetto a quello delle sospensioni di ZnO in PBS (pH 7.4). Infatti, come possibile notare nella figura 3.26, gli aloni di inibizione nel caso delle sospensioni di ZnO in acqua sono più grandi e più definiti; le zone di inibizione relative alle concentrazioni di ZnO di 40000 e 35000 µg/mL sono pari rispettivamente a 3 e 4 mm per le sospensioni in acqua ed a 2 mm per quelle in PBS. Il pH acido aumenta la solubilità delle particelle di ZnO, favorendo un maggiore rilascio di ioni zinco. Inoltre, favorisce la dispersione delle particelle nel solvente impedendo la formazione di aggregati che ridurrebbero l'azione antimicrobica dello ZnO[48][49]. Tuttavia, una seconda causa non correlata al pH della limitata azione dello ZnO in PBS, potrebbe essere il legame tra gli ioni zinco ed i fosfati, che provocherebbe una riduzione della concentrazione di ioni zinco disponibile per l'azione antimicrobica.



Figura 3.26: alone di inibizione dello ZnO di sintesi in PBS (a sinistra) ed in acqua (a destra) per le concentrazioni di 30000 µg/mL (1) e 20000 µg/mL (2) con *S.epidermidis*

- Per entrambi i microrganismi testati, è stato possibile valutare la MIC dello ZnO di sintesi. I valori delle MIC per i due batteri testati sono riportati nella tabella 3.7.

	<i>S.epidermidis</i> MIC [µg/mL]	<i>E.coli</i> MIC [µg/mL]
H ₂ O	15000	20000
PBS	17500	30000

Tabella 3.7: valori delle MIC dello ZnO di sintesi

Come possibile notare nella tabella 3.7, le MIC delle sospensioni di ZnO in PBS sono maggiori rispetto a quelle in acqua, confermando l'influenza del pH sull'effetto antimicrobico. Inoltre, le minime concentrazioni di ZnO necessarie per inibire la crescita di *E.coli* sono superiori rispetto a quelle di *S.epidermidis*. Questo risultato conferma la maggiore sensibilità dei batteri Gram(+) all'agente antimicrobico di cui si è discusso precedentemente.

- Per quanto riguarda le concentrazioni di ZnO di sintesi più basse rispetto al valore di MIC, è stato possibile osservare un parziale effetto inibitorio. Come si può vedere, ad esempio, nella figura 3.27 per *S.epidermidis* (concentrazioni di ZnO di sintesi di 10000 µg/mL in acqua e di 15000 µg/mL in PBS) e nella figura 3.28 relativa ad *E.coli* (concentrazioni di 17500 e 15000 µg/mL in acqua e di 20000 e 17500 µg/mL in PBS), si è formato un alone di inibizione, ma all'interno di questo erano presenti alcune colonie batteriche di piccole dimensioni.



Figura 3.27: alone di inibizione generato con *S.epidermidis* dalle sospensioni di ZnO di sintesi con concentrazione di 30000 µg/mL (1), 20000 µg/mL (2), 17500 µg/mL (3), 15000 µg/mL (4), 10000 µg/mL (5) e 7500 µg/mL (6) (proseguendo in senso orario a partire dalla freccia) in PBS a sinistra ed in H₂O a destra.

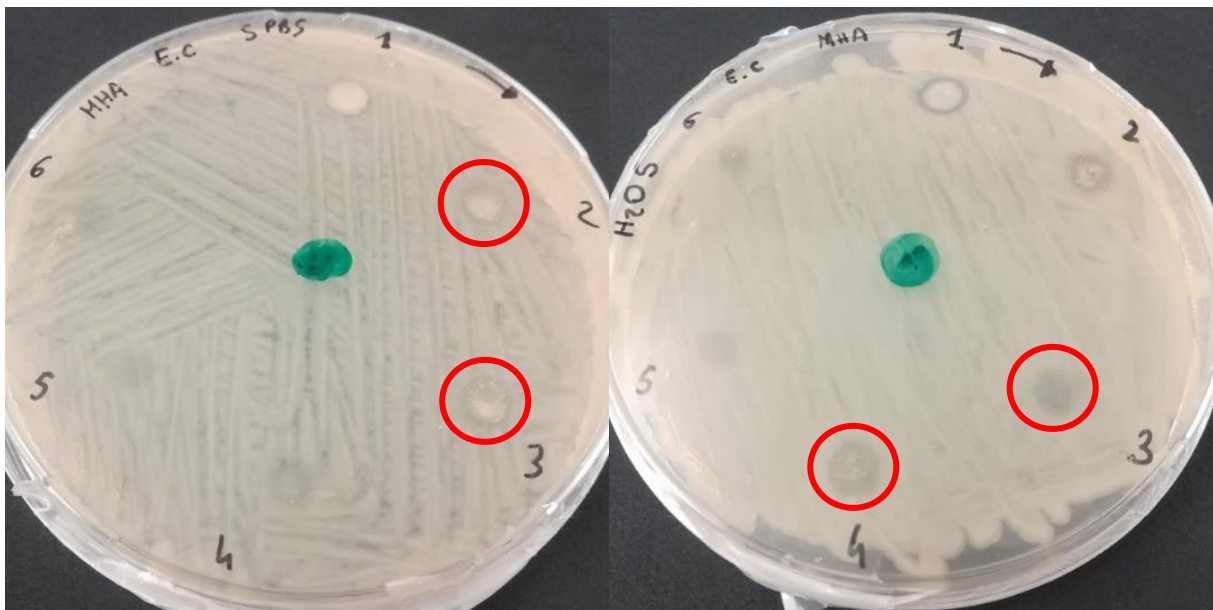


Figura 3.28: alone di inibizione generato con *E.coli* dalle sospensioni di ZnO di sintesi con concentrazione di 30000 µg/mL (1), 20000 µg/mL (2), 17500 µg/mL (3), 15000 µg/mL (4), 10000 µg/mL (5) e 7500 µg/mL (6) (proseguendo in senso orario a partire dalla freccia) in PBS a sinistra ed in H₂O a destra.

- La sospensione di ZnO di sintesi in acqua con concentrazione di 30000 µg/mL è risultata più inibente di quella concentrata 40000 µg/mL nel medesimo solvente. Questa considerazione, come si può vedere dalla figura 3.29, è valida per entrambi i microrganismi. Considerando l'effetto della sospensione di ZnO di sintesi in acqua con *S.epidermidis*, la zona di inibizione è pari a 4 mm per la concentrazione di 30000 µg/mL e a 3 mm per quella di 40000 µg/mL. Nel caso di *E.coli* invece, la zona di inibizione è

pari a 2 mm per la concentrazione di 30000 $\mu\text{g/mL}$ ed a 1 mm per quella concentrata 40000 $\mu\text{g/mL}$.

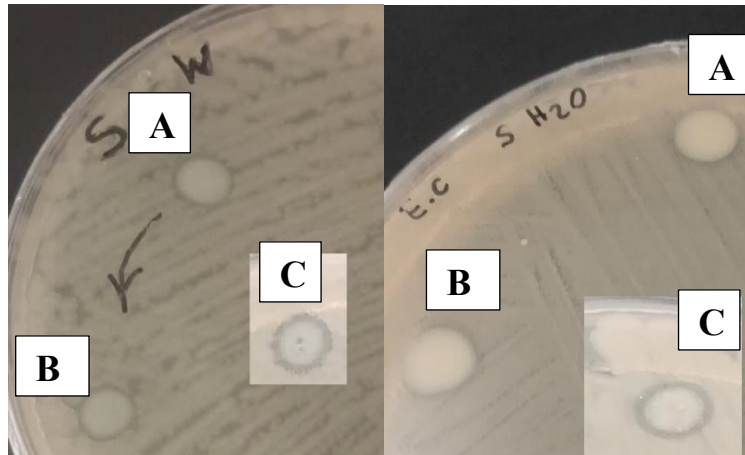


Figura 3.29: alone di inibizione per le sospensioni di ZnO di sintesi in acqua con concentrazioni di 40000 (A), 35000 (B) e 30000 $\mu\text{g/mL}$ (C) per *S.epidermidis* a sinistra e per *E.coli* a destra.

Effetto antimicrobico dello ZnO commerciale

Per quanto riguarda lo ZnO commerciale invece, sia per *S.epidermidis* che per *E.coli* non è stata riscontrata alcuna azione antimicrobica delle sospensioni di ZnO con concentrazione superiore pari a 40000 e 35000 $\mu\text{g/mL}$, né in acqua né in PBS, come si può vedere dalle figure 3.30 e 3.31.

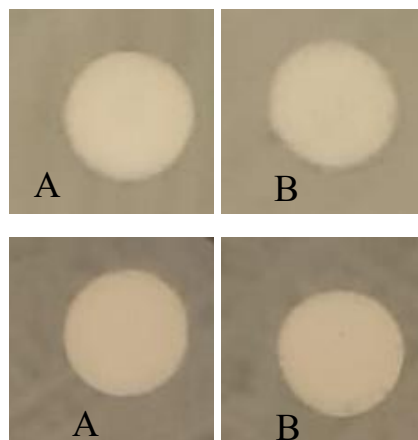


Figura 3.30: effetto antimicrobico delle sospensioni di ZnO commerciale con concentrazione di 40000 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 35000 $\mu\text{g/mL}$ (B) in PBS (in alto) ed in H₂O (in basso) con *S.epidermidis*.

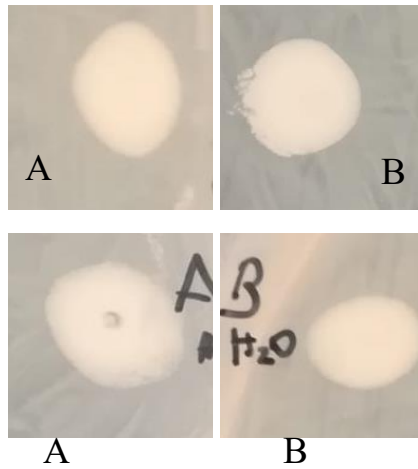


Figura 3.31: effetto antimicrobico delle sospensioni di ZnO commerciale con concentrazione di 40000 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 35000 $\mu\text{g/mL}$ (B) in PBS (in alto) ed in H₂O (in basso) su *E.coli*.

Tuttavia, come si può vedere dalle figure 3.32 per *S.epidermidis* e 3.33 per *E.coli*, è possibile notare un minimo effetto di inibizione nelle due sospensioni con concentrazioni di ZnO di 10000 e 7500 $\mu\text{g/mL}$ per entrambi i batteri.

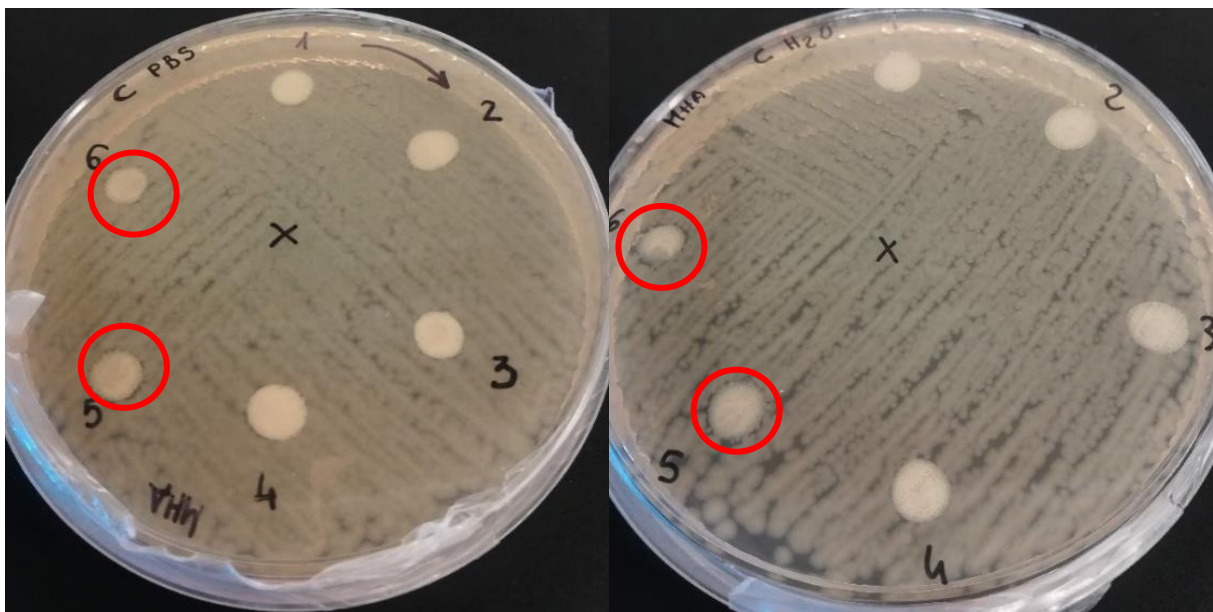


Figura 3.32: effetto delle sospensioni di ZnO commerciale con concentrazione di 30000 $\mu\text{g/mL}$ (1) e 20000 $\mu\text{g/mL}$ (2) 17500 $\mu\text{g/mL}$ (3), 15000 $\mu\text{g/mL}$ (4), 10000 $\mu\text{g/mL}$ (5) e 7500 $\mu\text{g/mL}$ (6) (proseguendo in senso orario) in PBS a sinistra ed in H₂O a destra con *S.epidermidis*.

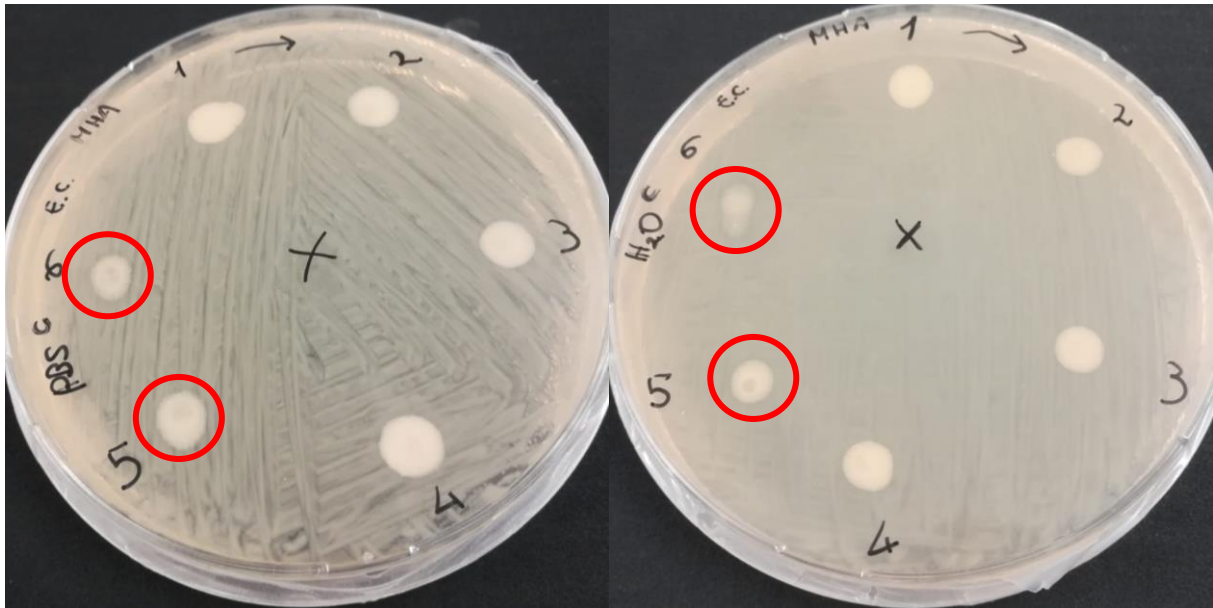


Figura 3.33: effetto delle sospensioni di ZnO commerciale con concentrazione di 30000 $\mu\text{g/mL}$ (1) e 20000 $\mu\text{g/mL}$ (2) 17500 $\mu\text{g/mL}$ (3), 15000 $\mu\text{g/mL}$ (4), 10000 $\mu\text{g/mL}$ (5) e 7500 $\mu\text{g/mL}$ (6) (proseguendo in senso orario) in PBS a sinistra ed in H₂O a destra con *E.coli*.

L'inefficacia antimicrobica dello ZnO commerciale rispetto a quello di sintesi è dovuta alle differenze nella morfologia e nell'area superficiale specifica dei due materiali. Lo ZnO di sintesi si presenta in forma nanostrutturata con particelle di forma non definita, diametro medio 30 nm e area superficiale specifica di 26.67 m^2/g . Quello commerciale è costituito da aggregati di particelle di forma allungata, diametro medio 230 nm e area specifica superficiale di 7.6 m^2/g . Avendo lo ZnO di sintesi mostrato effetto antimicrobico superiore rispetto allo ZnO commerciale si può affermare che l'effetto antimicrobico aumenti all'aumentare dell'area superficiale specifica ed al diminuire delle dimensioni delle particelle di ZnO. Questa osservazione è confermata da altri studi reperiti in letteratura, come quello di Leone et al (2019) [44]. In questo studio è stato valutato l'effetto antimicrobico dell'ossido di zinco nanostrutturato in due differenti morfologie:

1. Aggregati di *nanosheets* generati dall'aggregazione di particelle nanometriche della dimensione di 15-20 nm;
2. Aggregati micrometrici di nanoparticelle;

I due materiali, sintetizzati mediante due differenti metodi, differiscono oltre che per la morfologia, anche per il valore dell'area superficiale specifica e del volume specifico dei pori. Entrambi i parametri sono maggiori per lo ZnO nella forma di aggregati di *nanosheets*, essendo costituito da particelle di dimensioni minori. L'area superficiale specifica ed il volume specifico dei pori calcolati con l'analisi di fisisorbimento di azoto, sono pari rispettivamente a 68 m^2/g e 0.230 cm^3/g per la prima tipologia di ZnO e a 12 m^2/g e 0.05 cm^3/g per la seconda tipologia.

L'azione antimicrobica dei due ossidi di zinco è stata valutata nei confronti del batterio Gram(+) *S.aureus* e del Gram(-) *K.pneumoniae* mediante il metodo "Broth micro-dilution" su piastre multiwell da 96 pozzetti. Dai risultati delle prove antimicrobiche effettuate nel lavoro di Leone et al [44] è emersa la maggiore efficacia antimicrobica della prima tipologia di ZnO, avente area superficiale specifica maggiore e dimensioni delle particelle inferiori.

3.5.5 Metodo delle strisce parallele per la valutazione dell'attività antimicrobica del biocomposito

Per la valutazione dell'attività antimicrobica del biocomposito è stato utilizzato il metodo delle strisce parallele standardizzato come AATCC 147-2011. Il metodo standard è normalmente utilizzato per testare l'efficacia antimicrobica di campioni di tessuto. Nel caso in esame sono state apportate le seguenti modifiche:

- L'inoculo standardizzato è stato preparato a partire da una coltura batterica cresciuta a 37°C su terreno solido MHA per 24 ore.
- Il biocomposito è stato testato nella forma di un rettangolo di dimensioni 4x2 cm mantenendo inalterata la proporzionalità rispetto alle dimensioni standard, come consentito dalla metodica;
- Il microrganismo è stato inoculato realizzando 4 strisce parallele, a diversa concentrazione microbica, della lunghezza di 5 cm e distanziate tra loro di 1 cm.

In questa prova sono stati testati sia il batterio Gram(+) *S.epidermidis*, che il batterio Gram(-) *E.coli*. Prima di applicare il metodo per testare l'azione antimicrobica dello ZnO, sono state effettuate delle prove preliminari per stabilire la concentrazione microbica da testare con il biocomposito. Su terreno MHA sono state inoculate, realizzando delle strisce, le sospensioni microbiche con concentrazione di 10^5 e 10^6 UFC/mL, utilizzate rispettivamente nel metodo di Brodo diluizione sulle piastre multiwell da 96 pozzetti e nei due metodi Kirby-Bauer modificati per testare l'azione antimicrobica delle sospensioni di ZnO. Al termine dell'incubazione (12 ore a 37°C) le piastre sono state analizzate ed è stato deciso di testare la concentrazione di 10^6 UFC/mL, perché nelle piastre inoculate con la sospensione microbica con concentrazione di 10^5 UFC/mL non è stata osservata alcuna colonia batterica nelle strisce a minore concentrazione di microrganismo.

In questa prova sono stati testati sia il biocomposito realizzato con lo ZnO commerciale, che quello realizzato con lo ZnO di sintesi. Nel primo caso è stata testata la concentrazione di 40000 µg/mL, mentre nel secondo quella di 30000 µg/mL.

Dopo aver effettuato l'inoculo è stato depositato il biocomposito sulla piastra, ed atteso il tempo di incubazione (24 ore a 37°C), è stato valutato l'effetto di inibizione mostrato nelle figure 3.34 e 3.35.

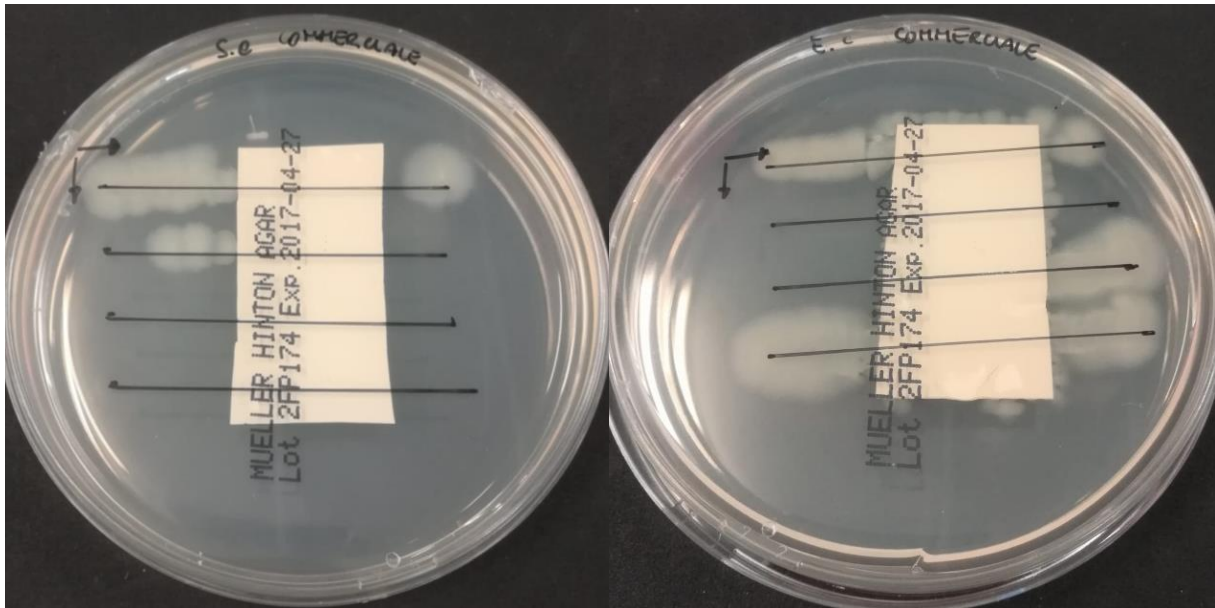


Figura 3.34: valutazione dell'efficacia antimicrobica del biocomposito realizzato con lo ZnO commerciale con concentrazione di 40000 µg/mL testato con *S.epidermidis* a sinistra e con *E.coli* a destra.

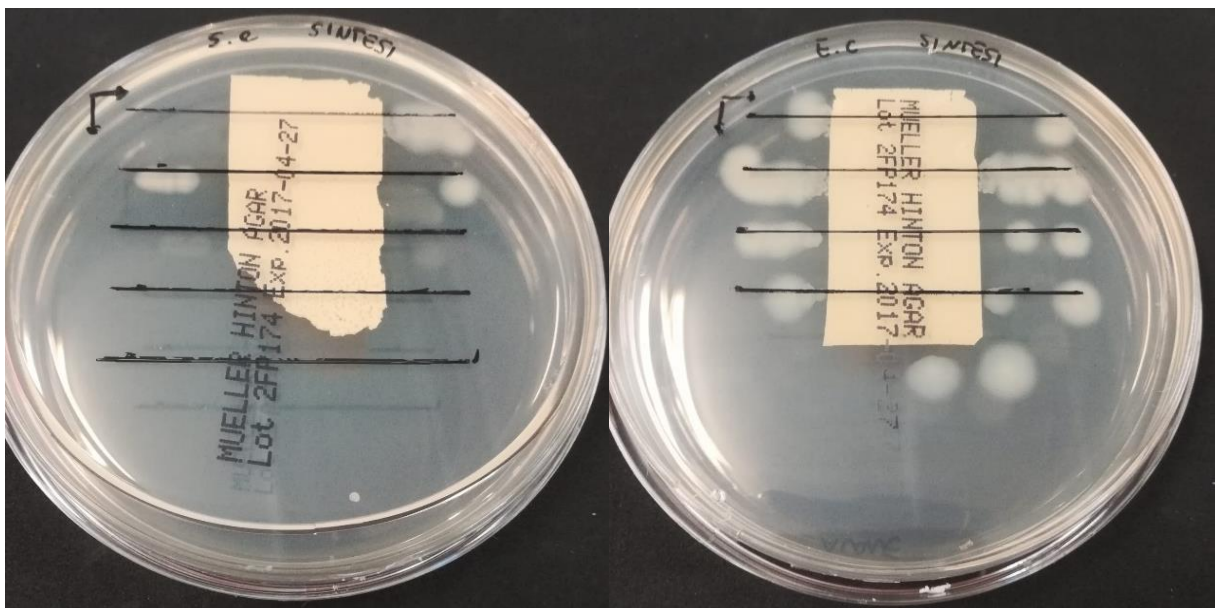


Figura 3.35: valutazione dell'efficacia antimicrobica del biocomposito realizzato con lo ZnO di sintesi con concentrazione di 30000 µg/mL testato con *S.epidermidis* a sinistra e con *E.coli* a destra.

Dai risultati ottenuti è possibile fare alcune considerazioni:

- Sia il biocomposito realizzato con lo ZnO commerciale (con concentrazione 40000 µg/mL), che quello realizzato con lo ZnO di sintesi (con concentrazione 30000 µg/mL), hanno mostrato efficacia nei confronti di *S.epidermidis*. In particolare, dove la concentrazione della sospensione microbica è più bassa (ultime due strisce in basso) non si osserva alcuna colonia batterica.
- Nessuno dei due composti testati ha inibito efficacemente la crescita di *E.coli*, confermando la maggiore resistenza del batterio Gram(-) all'antimicrobico, già osservata con il metodo “della goccia” nella prova con lo ZnO in sospensione. Nel caso

del biocomposito con lo ZnO di sintesi c'è stata crescita microbica in ogni riga, mentre nel caso del biocomposito con lo ZnO commerciale il microrganismo è cresciuto in maniera diffusa attorno al film, indipendentemente dalla concentrazione dell'inoculo. La crescita è particolarmente evidente sul lato destro del biocomposito, probabilmente a causa di una maggiore concentrazione di particelle di ZnO sul lato sinistro, causata da una loro distribuzione disomogenea all'interno della matrice.

4.CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il lavoro svolto in questa tesi ha consentito la realizzazione di film proteici funzionalizzati con ZnO, aventi proprietà antimicrobiche. I biocompositi sono stati prodotti a partire da un concentrato proteico WPC e sono stati realizzati dei campioni con lo ZnO commerciale e degli altri con una miscela di ZnO di sintesi, aventi rispettivamente concentrazione di nanoparticelle pari a 40000 e 30000 $\mu\text{g/mL}$. Per la preparazione dei film è stato utilizzato il metodo dell'evaporazione del solvente da una sospensione proteica realizzata con l'acqua come solvente e il glicerolo come plastificante. I film sono stati sottoposti a differenti caratterizzazioni tra cui le prove di solubilità e di *swelling*, dalle quali è stato ottenuto un rapporto di solubilità del 60% ed un rapporto di rigonfiamento di 224% in acqua. Per la sintesi dello ZnO è stato utilizzato il metodo di precipitazione chimica che ha permesso di ottenere un ossido di zinco mesoporoso avente area superficiale specifica di 29.67 m^2/g e volume dei pori specifico di 0,15 cm^3/g .

Le prove per la valutazione dell'attività antimicrobica dello ZnO commerciale e di sintesi sono state effettuate testando sia il solo ZnO in sospensione che il biocomposito con il batterio Gram(+) *S.epidermidis* ed il batterio Gram(-) *E.coli*. Per i test con i biocompositi è stato utilizzato il metodo delle strisce parallele, mentre per la valutazione dell'efficacia antimicrobica dello ZnO in sospensione sono stati testati vari metodi ("Broth macro-dilution", "Broth micro-dilution", Kirby-Bauer test). Di questi il più efficace è stato il metodo Kirby-Bauer della diffusione in agar, modificato e rinominato "metodo della goccia". In questa prova le sospensioni di ZnO commerciale e di sintesi sono state realizzate sia in acqua che in PBS, per valutare l'influenza del pH sull'effetto antimicrobico dello ZnO. Dalle prove in sospensione è stato possibile ricavare importanti conclusioni:

1. L'effetto inibitorio dello ZnO è favorito a pH acidi, infatti l'azione antimicrobica delle sospensioni di ZnO in acqua (con pH 6) è risultata superiore rispetto a quella delle sospensioni in PBS (con pH 7.4). Questa osservazione deriva dalla valutazione delle zone di inibizione e delle MIC per le sospensioni di ZnO nei due diversi solventi. In particolare, per le sospensioni di ZnO in acqua le MIC sono più basse e le zone di inibizione più grandi rispetto al caso dello ZnO in PBS.
2. I batteri Gram(+) sono più sensibili all'effetto antimicrobico dello ZnO. Infatti, nel caso di *S.epidermidis* le MIC (15000 $\mu\text{g/mL}$ in acqua e 17500 $\mu\text{g/mL}$ in PBS) sono inferiori rispetto a *E.coli* (20000 $\mu\text{g/mL}$ in acqua e 30000 $\mu\text{g/mL}$ in PBS).
3. L'effetto antimicrobico dello ZnO dipende oltre che dalla sua struttura, anche dall'area superficiale specifica e dalla dimensione delle particelle. Infatti, lo ZnO commerciale, costituito da particelle di dimensioni maggiori ed avente area superficiale specifica minore rispetto allo ZnO , ha esibito azione antimicrobica inferiore.

Dalle prove antimicrobiche effettuate con il metodo delle strisce parallele è emersa un'azione antimicrobica anche dei biocompositi. I film funzionalizzati con lo ZnO di sintesi e commerciale, rispettivamente con concentrazione di 30000 e 40000 $\mu\text{g/mL}$ sono risultati efficaci nell'inibire la crescita di *S.epidermidis*. *E.coli* invece, si è mostrato anche in questo caso più resistente, dimostrando la maggiore sensibilità dei batteri Gram(+) allo ZnO, già osservata con le prove antimicrobiche in sospensione.

In questo lavoro è stata stilata una procedura da adottare qualora si volesse proseguire in futuro con la realizzazione di biocompositi a base proteica funzionalizzati con ZnO e testare la loro efficacia antimicrobica e quella dello ZnO in sospensione. Nel proseguimento di questo lavoro si potrebbe migliorare la tecnica di realizzazione dei film funzionalizzati in modo da ridurre la loro fragilità e migliorare le proprietà meccaniche. La fragilità e le tensioni residue nel materiale potrebbero essere ridotte imponendo un raffreddamento graduale dei film, riducendo il tempo di essiccazione e migliorando la dispersione delle nanoparticelle di ZnO nella matrice. Al fine di migliorare le proprietà meccaniche si potrebbe ridurre la temperatura di essiccazione in stufa

favorendo in questo modo un'evaporazione più lenta del solvente, che consentirebbe alle proteine di organizzarsi meglio nel formare il reticolo tridimensionale. Sarebbe inoltre opportuno variare parametri di processo come pH, concentrazione in peso di WP, temperatura e tempo di denaturazione, allo scopo di trovare un valore ottimale per ciascuno di essi. Infatti, è stato dimostrato che anche questi parametri influiscono sulle proprietà finali dei film [9]. Migliorare lo step di degasaggio sarebbe importante per ottenere film con meno bolle e migliori proprietà barriera. Tuttavia, bisognerebbe capire se questo possa provocare una diminuzione considerevole della porosità, che a sua volta potrebbe alterare il rapporto di rigonfiamento ed il comportamento del dispositivo nella ferita.

Nei lavori successivi si potrebbe portare avanti la realizzazione dei film proteici con il concentrato proteico WPI, ma in questo caso si dovrà individuare una nuova procedura per la loro produzione perché quella utilizzata con le WPC si è rivelata inadeguata. Infatti, si è osservato un prematuro insorgere della gelificazione che rende impossibile la colatura nello stampo

Dal punto di vista delle prove antimicrobiche in lavori futuri si potrebbe valutare anche l'attività antifungina dello ZnO e testare altri ossidi di zinco con maggiore area superficiale specifica, in modo da approfondire l'influenza di tale parametro nell'azione antimicrobica. Inoltre, si potrebbero indagare i meccanismi di degradazione dell'ossido di zinco nel tempo a causa della corrosione atmosferica, per stabilire in che modo questa incida sull'area superficiale. Infine, si dovranno esplorare i meccanismi di rilascio degli ioni zinco attraverso la matrice proteica, per stabilire in che modo questa influisca sull'azione antimicrobica.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] B. Selvaraj Dhivyaa and * , Viswanadha Vijaya Padmab , Elango Santhinia, “Wound dressings – a review,” *Biomed. (ISSN 2211-8039)*, vol. 1, no. 2, pp. 47–68, 2014, doi: 10.7603/s40.
- [2] W. Li *et al.*, “All-natural injectable hydrogel with self-healing and antibacterial properties for wound dressing,” *Cellulose*, vol. 8, 2020, doi: 10.1007/s10570-019-02942-8.
- [3] K. Hoxha, “<https://www.nursetimes.org/il-processo-di-guarigione-delle-ferite/27760>.” .
- [4] A. Gupta, M. Kowalczyk, W. Heaselgrave, and S. T. Britland, “The production and application of hydrogels for wound management : A review,” *Eur. Polym. J.*, vol. 111, no. September 2018, pp. 134–151, 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.12.019.
- [5] F. Bosco, D. Duraccio, and M. D. Andrea, “Corso di Laurea Magistrale Tesi di Laurea Magistrale e proteici per il wound dressing,” 2018.
- [6] A. M. Díez-Pascual and A. L. Díez-Vicente, “Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 9, pp. 2631–2644, 2015, doi: 10.1021/acs.biomac.5b00447.
- [7] R. Ravaldi, “medicazioni-avanzate-lesioni-cutanee.” .
- [8] R. Silva, H. Ferreira, T. Matamá, A. C. Gomes, and A. Cavaco-Paulo, “Wound-healing evaluation of entrapped active agents into protein microspheres over cellulosic gauzes,” *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 11, pp. 1376–1385, 2012, doi: 10.1002/biot.201200142.
- [9] S. Gunasekaran, L. Xiao, and M. M. O. Eleya, “Whey Protein Concentrate Hydrogels as Bioactive Carriers,” no. April, 2005, doi: 10.1002/app.22838.
- [10] R. Narayanaswamy and V. P. Torchilin, “Drug Delivery,” 2019, doi: 10.3390/molecules24030603.
- [11] G. Alonci, “<http://www.chimicare.org/curiosita/la-chimica-dei-materiali/alla-scoperta-degli-idrogel-biomateriali-dalle-molteplici-applicazioni-cliniche/>.” .
- [12] “<https://prontuariomedicazioni.wordpress.com/>.” .
- [13] M. C. Catoira, L. Fusaro, D. Di, F. Martina, and R. Francesca, “Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2019, doi: 10.1007/s10856-019-6318-7.
- [14] Pasiakos, “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25169440>,” no. Clm, 2011.
- [15] N. S. Said, “Protein-Based Active Film as Antimicrobial Food Packaging: A Review.”
- [16] G. Suarato, R. Bertorelli, and A. Athanassiou, “Borrowing from nature: Biopolymers and biocomposites as smart wound care materials,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. OCT, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00137.
- [17] I. S. Savitskaya, A. S. Kistaubayeva, I. E. Digel, and D. H. Shokatayeva, “Physicochemical and antibacterial properties of composite films based on bacterial cellulose and chitosan for wound dressing materials,” *Eurasian Chem. J.*, vol. 19, no. 3, pp. 255–264, 2017, doi: 10.18321/ectj670.
- [18] Z. Lu *et al.*, “Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 156, pp. 460–469, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.051.
- [19] S. Y. Ong, J. Wu, S. M. Moochhala, M. H. Tan, and J. Lu, “Development of a chitosan-based

- wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 32, pp. 4323–4332, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.07.034.
- [20] M. Rocha, F. a Ferreira, M. M. Souza, and C. Prentice, “Antimicrobial films- a review,” *Microb. Pathog. Strateg. Combat. them Sci. Technol. Educ.*, pp. 23–31, 2013.
- [21] P. D. I. Torino, “Tesi di Laurea Valutazione dell ’ impiego di proteine del siero di latte,” 2012.
- [22] M. Keri Marshall MS, ND, “Therapeutic Applications of Whey Protein,” *Altern. Med. Rev.*, vol. 9, no. 2, pp. 136–56, 2004.
- [23] L. M. and F. B. Chiara Mollea, “Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry,” 2013.
- [24] Ó. L. Ramos *et al.*, “Food Hydrocolloids Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible fi lms manufactured therefrom,” *Food Hydrocoll.*, vol. 30, no. 1, pp. 110–122, 2013, doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.05.001.
- [25] G. Di Bonaventura and D. Ph, “Farmaci antibatterici:” .
- [26] E. Hoseinzadeh *et al.*, “REVIEW ARTICLE A Review on Nano-Antimicrobials : Metal Nanoparticles , Methods , and Mechanisms,” pp. 1–9, 2017, doi: 10.2174/13892002176661612011111.
- [27] “Antibatterici, Università degli studi di Trieste,” pp. 111–119.
- [28] F. Leone, “Nanostructured Zinc Oxide as drug carrier for pharmaceutical applications,” 2018.
- [29] A. Azam, A. S. Ahmed, M. Oves, M. S. Khan, S. S. Habib, and A. Memic, “Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A comparative study,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 6003–6009, 2012, doi: 10.2147/IJN.S35347.
- [30] P. D. I. Torino, “Sviluppo di ZnO nano-strutturato per rilascio di farmaci , in assenza di solventi organici,” 2018.
- [31] M. Vaseem, A. Umar, and Y. Hahn, *ZnO Nanoparticles : Growth, Properties, and Applications*, vol. 5. 2010.
- [32] Mohamed, “OSSIDO DI ZINCO MESOPOROSO PER IL RILASCIO DI CLOTRIMAZOLO.” pp. 23–25, 2012.
- [33] R. Wahab, Y. S. Kim, and H. S. Shin, “Effect of refluxing time on the morphology of pencil like zinc oxide nanostructures prepared by solution method,” *Met. Mater. Int.*, vol. 16, no. 5, pp. 767–772, 2010, doi: 10.1007/s12540-010-1011-x.
- [34] R. Kumar, A. Umar, G. Kumar, and H. S. Nalwa, “Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review,” *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 5, pp. 3940–3961, 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2016.12.062.
- [35] A. Król, P. Pomastowski, K. Rafińska, V. Railean-Plugaru, and B. Buszewski, “Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 249, pp. 37–52, 2017, doi: 10.1016/j.cis.2017.07.033.
- [36] M. Saliari, R. Jalal, and E. K. Goharshadi, “Mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells,” *Nanomedicine J.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–14, 2016, doi: 10.7508/nmj.2016.01.001.
- [37] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, 2016, doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.

- [38] “etestr @ www.biomerieux.it.” .
- [39] R. Rajendra, C. Balakumar, H. Ahammed, S. Jayakumar, K. Vaideki, and E. Rajesh, “Use of zinc oxide nano particles for production of antimicrobial textiles,” *Int. J. Eng. Sci. Technol.*, vol. 2, no. 1, pp. 202–208, 2010, doi: 10.4314/ijest.v2i1.59113.
- [40] R. Rakhshaei and H. Namazi, “A potential bioactive wound dressing based on carboxymethyl cellulose/ZnO impregnated MCM-41 nanocomposite hydrogel,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 73, pp. 456–464, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2016.12.097.
- [41] S. Mitra *et al.*, “Porous ZnO nanorod for targeted delivery of doxorubicin: In vitro and in vivo response for therapeutic applications,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 45, pp. 24145–24154, 2012, doi: 10.1039/c2jm35013k.
- [42] Z. Beyene and R. Ghosh, “Effect of zinc oxide addition on antimicrobial and antibiofilm activity of hydroxyapatite: a potential nanocomposite for biomedical applications,” *Mater. Today Commun.*, vol. 21, no. August, 2019, doi: 10.1016/j.mtcomm.2019.100612.
- [43] I. Industriale, “Tesi - caratterizzazione sperimentale delle isoterme di adsorbimento dei materiali essiccanti,” *Politec. di Milano*, 2015.
- [44] F. Leone *et al.*, “Nanostructured zno as multifunctional carrier for a green antibacterial drug delivery system—a feasibility study,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 3, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3390/nano9030407.
- [45] S. A. Alrokayan, “Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species,” pp. 845–857, 2012.
- [46] A. Miri, N. Mahdinejad, O. Ebrahimi, M. Khatami, and M. Sarani, “Zinc oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization, antifungal and cytotoxic activity,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, no. April 2018, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109981.
- [47] Zarrindokht Emami-Karvani, “Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram-positive and Gram-negative bacteria,” *African J. Microbiol. Res.*, vol. 5, no. 18, pp. 1368–1373, 2012, doi: 10.5897/ajmr10.159.
- [48] S. M. Majedi, B. C. Kelly, and H. K. Lee, “Combined effects of water temperature and chemistry on the environmental fate and behavior of nanosized zinc oxide,” *Sci. Total Environ.*, vol. 496, pp. 585–593, 2014, doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.07.082.
- [49] J. M. Berg, A. Romoser, N. Banerjee, R. Zebda, and C. M. Sayes, “The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations,” *Nanotoxicology*, vol. 3, no. 4, pp. 276–283, 2009, doi: 10.3109/17435390903276941.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la professoressa Bosco e la professoressa Onida, relatrici di questa tesi, per la disponibilità e la professionalità con cui mi hanno seguita durante la stesura della tesi e nel corso delle prove sperimentali.

Ringrazio la dottoressa Chiara Mollea, per l'impegno e la costanza con cui mi ha seguita durante le prove sperimentali e nella stesura dell'elaborato. La ringrazio inoltre per avermi trasmesso la passione e l'entusiasmo per il suo lavoro.

Ringrazio Paolo e Sara, per avermi guidata nel lavoro, condividendo con me le gioie e le difficoltà incontrate. I vostri consigli sono stati preziosi.

Ringrazio la mia famiglia e Gabriele, per avermi sempre incoraggiata in questo difficoltoso percorso e per non aver mai smesso di credere in me.

Ringrazio gli amici di sempre e quelli incontrati in questo nuovo percorso, per essere stati la mia famiglia in questi anni lontana da casa.