

POLITECNICO DI TORINO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale
In Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

Utilizzo dell'olio essenziale di menta per la modifica superficiale di biomateriali



Relatori

Prof. Silvia Spriano
Dott. Sara Ferraris

Candidato
Carla Giustizieri

Luglio 2022

Indice

1. Gli oli essenziali	5
1.1 Terpeni	6
1.2 Composti aromatici	7
1.3 Metodi di estrazione	11
1.4 Proprietà antiossidante	17
1.5 Proprietà antibatterica	19
1.6 Proprietà antitumorali	24
1.7 Effetti tossici	25
1.8 Stabilità	26
1.9 Mentha x piperita	27
1.9.1 Proprietà	27
1.9.2 Tossicità	27
2. Rivestimenti antibatterici	29
2.1 Rivestimenti sul titanio	34
2.2 Rivestimenti sull'UHMWPE	36
2.3 Coating con Oli Essenziali	37
3. Lubrificazione nelle articolazioni	39
3.1 Meccanismi di lubrificazione	40
3.2 Proprietà e additivi	41
3.3 Lubrificanti a base vegetale in campo industriale	41
3.4 Modifiche chimiche	45
3.5 Lubrificanti nelle protesi	45
3.5.1 Lubrificanti vegetali in campo medicale	48
3.6 Oli essenziali come lubrificanti	48
4. Materiali e metodi	50
4.1 Preparazione dei campioni	50
4.1.1 Olio essenziale di Mentha e metodo di estrazione	51
4.2 Trattamento superficiale	51

4.2.1 Plasma atmosferico	51
4.2.2 Funzionalizzazione, coating e soaking	53
4.3 Misure dell'angolo di contatto	53
4.4 Analisi al SEM	54
4.5 Analisi FTIR-ATR	55
4.6 Osservazione al microscopio confocale	56
4.7 Misura elettrocinetica del potenziale zeta	57
4.8 Reometro	59
4.9 Tribometro	60
4.10 Profilometro.....	62
4.11 Microscopio ottico	63
4.12 Profilometro per la rugosità	63
4.13 Test biologici	64
4.13.1 Antibattericità	64
4.13.2 Citotossicità.....	65
5. Risultati e discussione.....	67
5.1 Caratterizzazione dell'olio essenziale di Mentha di Pancalieri	67
5.1.1 Analisi gascromatografica e confronto	67
5.2 Trattamento dei materiali.....	69
5.3 Misura dell'angolo di contatto	70
5.4 Osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM).....	76
5.5 Analisi al microscopio confocale	79
5.6 Analisi FTIR.....	80
5.7 Potenziale z e punto isoelettrico.....	87
5.8 Reometro e misura della viscosità.....	88
5.9 Test tribologici	90
5.10 Profili e rugosità	92
5.11 Microscopia	97
5.12 Test biologici	99
5.12.1 Citocompatibilità	99
5.12.2 Attività antibatterica.....	100
6. Conclusioni.....	102

Bibliografia 106

1. Gli oli essenziali

Le erbe e gli oli essenziali (EO) sono sempre stati largamente usati per diversi scopi, non solo come condimenti per aromatizzare gli alimenti, ingredienti nei profumi o in applicazioni cosmetiche, ma anche e soprattutto per scopi medici, avendo mostrato delle proprietà antibatteriche, antimicotiche, virucide, antiparassitarie, insetticide, oltre ad essere buoni analgesici, sedativi, antinfiammatori, quindi molto utilizzati nell'industria farmaceutica¹.

L'interesse crescente nei loro confronti è correlato all'aumento, negli ultimi anni, della resistenza agli antibiotici da parte degli organismi batterici, dovuta ad un'assunzione eccessiva e prolungata (somministrazione anche indiretta, dato l'utilizzo non trascurabile nell'industria del pollame e dei bovini), oltre a fattori culturali che influiscono sulla loro prescrizione (con dosaggi errati), se non all'incremento degli spostamenti intercontinentali, che ha favorito la diffusione di specie maggiormente resistenti¹. Nel 2006 è stata vietata l'aggiunta di antibiotici insieme ad additivi sintetici nell'alimentazione degli animali da allevamento da parte dell'EU (regolamento 1831/2003/EC); uno dei motivi per i quali risultano utili in questo campo è la riduzione delle emissioni di metano e produzione di azoto tramite l'urina, attraverso una manipolazione dell'ecosistema microbico ruminale. Ci si è indirizzati perciò su alternative fitochimiche come gli oli essenziali, intesi come metaboliti tossici secondari prodotti dalle piante come difesa contro erbivori e microbi. In uno studio si è visto come basse concentrazioni di alcuni componenti di EO possono avere effetti positivi sulla riduzione della degradazione proteica nel rumine, quindi della fermentazione².

In aggiunta a questi motivi vi è una ricerca sempre maggiore di nuovi conservanti e alternative agli antiossidanti usati solitamente nel packaging dell'industria alimentare (come il butil idrossianisolo (BHA) e il butil idrossitoluene (BHT)), che siano naturali e rispondano ad un approccio sempre più "green".

Quando si parla di oli essenziali, ci si riferisce a dei composti volatili, naturali, con una composizione complessa, liposolubili e solubili in solventi organici, con una densità generalmente più bassa di quella dell'acqua, caratterizzati da un forte odore e ottenuti a partire da piante aromatiche, come metaboliti secondari³. Le specie esistenti di queste piante sono numerose, appartenenti tutte a determinate famiglie, tra le quali troviamo le *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Zingiberaceae* e *Asteraceae* tra le principali; la maggior parte di queste sono localizzate in zone temperate e calde, come il Mediterraneo o regioni tropicali. Gli EO ottenuti possono essere sintetizzati da ogni parte di queste, come germogli, fiori, foglie, steli, ramoscelli, semi, frutti, radici, dal legno o corteccia; solitamente sono biosintetizzati e accumulati in strutture istologiche specializzate, le ghiandole secretorie che possono essere di due tipi (Figura 1): quelle localizzate sulla superficie della pianta (parliamo in tal caso di secrezioni

estrogene) e quelle interne alla pianta (parliamo di secrezioni endogene)⁴. Possono inoltre trovarsi nel citoplasma, in alcune cellule secretorie³.

Secretory structures specialized in accumulation and stockage of essential oils.				
Secretory structures	Description	Organ plant	Example	Botanic family
External secretory tissues				
Epidermic papillae	Conical epidermal secretory cells	Flower Petals	<i>Rosa damascena</i> <i>Convallaria majalis</i>	Rosaceae Asparagaceae
Secretory bristles or glandular trichomes	Terminal cells of trichomes secreting EOs	Stem Leaves	<i>Pelargonium</i> sp. <i>Salvia</i> sp., <i>Mentha</i> sp.	Geraniaceae Lamiaceae
Internal secretory tissues				
The schizogenous or secretory pockets	Intercellular space filled with the cells secretions	Epicarp of fruit	<i>Citrus</i> sp.	Rutaceae
Secretory canals	Small canals formed of aggregated secreting cells throughout the plant	Stem	<i>Petroselinum</i> sp. <i>Pimpinella</i> sp. <i>Daucus</i> sp.	Myrtaceae Apiaceae
Intracellular secretory cells	Cells specialized in the EOs accumulation inside their vacuoles	Stem Leaves Rhizome	<i>Cinnamomum ceylanicum</i> <i>Laurus nobilis</i> <i>Acorus calamus</i>	Lauraceae

Figura 1: Strutture secretorie specializzate nell'accumulo degli EO³

Gli oli essenziali possono contenere dai 20 ai 60 componenti a differenti concentrazioni, 2-3 dei quali sono maggiormente presenti, è il caso ad esempio dei terpenoidi e derivati di fenilpropanoidi (dal 20% al 70%, in confronto ad altri presenti solamente come traccia)^{5,6} e ne determinano le proprietà. Alcuni esempi possono essere il linalool presente nell'EO del *Coriandrum sativum* in una percentuale del 68%, il carvacrol (30%) e thymol (27%) nell'EO dell'*Origanum compactum* e il menthol (59%) e menthone (19%) nell'EO della *Mentha piperita* (= *Mentha x piperita*)⁴.

I componenti possono essere suddivisi in due gruppi di diverse origini biosintetiche: il principale è composto da terpeni e terpenoidi, il secondo da costituenti aromatici e alifatici, tutti con basso peso molecolare.

1.1 Terpeni

Sono costituiti da una combinazione di diverse unità di isoprene (5-carbon-base (C₅), Figura 2);

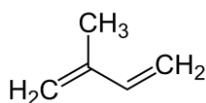


Figura 2: Terpene⁷

a loro volta i terpeni sono suddivisi in:

- Monoterpeni (Figura 3) → formati da una coppia di 2 unità di isoprene (C₁₀) con uno o più doppi legami; sono molto volatili, poco idrosolubili, reagiscono velocemente se esposti all'ossigeno o elevate temperature. Sono le molecole più rappresentative, costituendo circa il 90% dell'EO e consentono una grande varietà di strutture. Ne distinguiamo diverse famiglie, quali carburi, alcoli, aldeidi, fenoli, chetoni, eteri (questi ultimi tre potenzialmente tossici),

esteri e perossidi. Come detto sono molto instabili e in alcuni casi irritanti per la pelle e le mucose, ma con funzioni antibatteriche, antivirali, anti-infiammatorie, sedative⁴;

- Sesquiterpeni → formati dall'unione di 3 unità di isoprene (C₅); altobollenti, con proprietà anti-infiammatorie e immunomodulanti. Essendo una catena più estesa, sono permesse più strutture appartenenti a diverse tipologie: carburi, alcoli, chetoni, epossidi⁴.

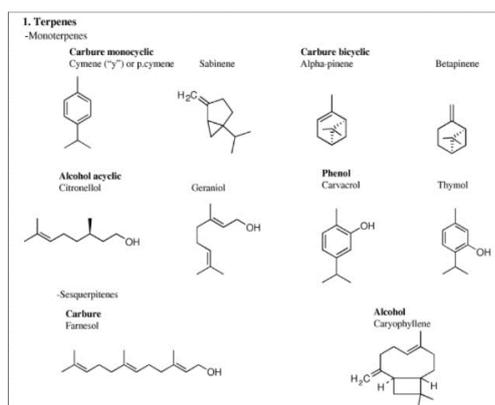


Figura 3: Struttura chimica di alcuni terpeni⁴

- Troviamo anche i diterpeni (C₂₀), triterpeni (C₃₀), tetraterpeni (C₄₀) e i terpeni che contengono ossigeno, detti terpenoidi, con funzioni decongestionanti e mucolitiche, oltre ad aver mostrato effetti benefici nel caso di ischemia o ripercussione cardiaca, associato con l'inibizione dello stress ossidativo.

1.2 Composti aromatici

Derivano dall'unità di fenilpropano e comprendono: aldeidi, alcoli, fenoli, derivati metossilici e composti di diossi-metilene (Figura 4)⁴.

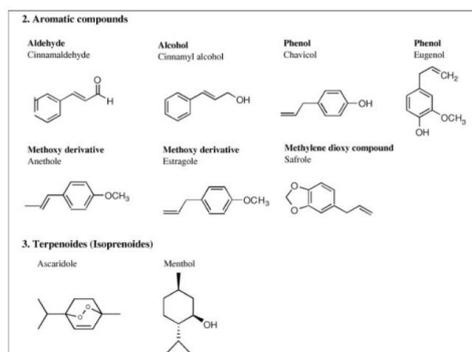


Figura 4: Composizione chimica di alcuni componenti aromatici⁴

Nella Tabella 1 sono riportati alcuni dei componenti degli oli essenziali, con la loro struttura, caratteristiche e proprietà:

Tabella 1: Alcuni componenti degli Oli Essenziali con la rispettiva formula chimica, struttura e proprietà³

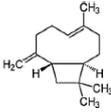
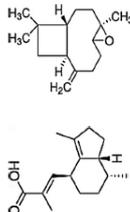
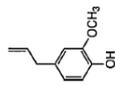
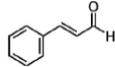
EO components	CAS number	Molecular structure	Chemical formula	Molecular weight	Boiling point °C	Refractive index (20°C)	Relative density g/mL (20°C)	Plant source	Some biological activities	References
Monoterpenes D-Limonène	5989-27-5		C ₁₀ H ₁₆	136.23	175.4	1.473	0.842	Citrus limon	Antifungal, antioxidant	(Singh et al., 2010)
α-Pinène	7785-70-8		C ₁₀ H ₁₆	136.23	157.9	1.465	0.858	Pinus pinaster	Anti-inflammatory, anti-oxidant	(Bae et al., 2012; Marija and Lesjak, 2014)
Sabinene	3387-41-5		C ₁₀ H ₁₆	136.23	164	1.467-1.473	0.844	Quercus ilex, Oenanthe crocata	Antifungal, antioxidant, anti-inflammatory	(Valente and Zuzarte, 2013)
Myrcène	123-35-3		C ₁₀ H ₁₆	136.23	167	1.469	0.791	Citrus aurantium	Gastroprotective antioxidant	(Flavia Bonamin, 2014)
γ-Terpinène	99-85-4		C ₁₀ H ₁₆	136.23	183	1.474	0.85	Origanum vulgare	Antioxydant	(Ruben Olmedo, 2014)
para-Cymène	99-87-6		C ₁₀ H ₁₆	136.23	176-178	1.49	0.86	Cuminum cyminum	Antifungal, antiatflatogénic, antioxidant	(Akash Kedia, 2013; Chen et al., 2014)
Terpenic alcohols Geraniol	106-24-1		C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	229.5	1.474	0.879	Pelargonium graveolens	Insecticide, antimicrobial, anticancer, antioxidant	(Chen and Viljoen, 2010)
Linalool	78-70-6		C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	197.5	1.462	0.87	Lavandula officinalis	Insect-repellent, anti-tumor, anti-inflammatory, antimicrobial	(Changmann Yoon, 2011; Miyashita and Sadzuka, 2013; Huo et al., 2013; Park et al., 2012)
Borneol	464-43-7		C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	213	-	1.011	Thymus satureioides	Broad-spectrum, antimicrobial,	(Abdelrhafour Tantaoui-

ha formattato: Tipo di carattere: (Predefinito) Times New Roman, Italiano (Italia)

Tabella 1 (Continua)

EO components	CAS number	Molecular structure	Chemical formula	Molecular weight	Boiling point °C	Refractive index (20 °C)	Relative density g/mL (20 °C)	Plant source	Some biological activities	References
Aldehyde terpenes										
Citral	5392-40-5		C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	229	1.488	0.888	<i>Aloysia citrodora</i>	Antifungal, antibacterial, painkiller	(Fan et al., 2014; Nengguo Tao, 2014; Clara Miracle Belda-Galbis, 2013; Nishijima et al., 2014)
Citronellal	5949-05-3		C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	201–207	1.446	0.851	<i>Cymbopogon citratus</i>	Insecticide, antifungal, antimicrobial, antioxydant	(Sadaka et al., 2013; Singh et al., 2012)
Ketones alcohols										
Camphor	76-22-2		C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	204	–	0.999	<i>Lavandula stoechas</i>	Antispasmodic, sedative, diuretic, antirheumatic, anti-inflammatory, anti-anxiety	(Braden et al., 2009)
Carvone	6485-40-1		C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	231	1.497	0.959	<i>Mentha spicata</i>	Antispasmodic, antimicrobial, antihyperglycemic	(Souza et al., 2013; Esfandyari-Manesh et al., 2013; Udaiyar Muruganathan, 2013)
Phenolic terpenes										
Thymol	89-83-8		C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	233	–	0.965	<i>Thymus vulgaris</i>	Strong antimicrobial, antiseptic, antitussive, anti-inflammatory, cicatrizing	(Wattanasatcha et al., 2012; Gavliakova and Biringerova, 2013; Riella et al., 2012)
Carvacrol	499-75-2		C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	237.7	1.522	0.977	<i>Thymus maroccanus</i>	Strong antimicrobial, anti-inflammatory	(Lima et al., 2013)
Terpenic oxides										
1,8-Cineole	470-82-6		C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	176	1.457	0.921	<i>Eucalyptus polybractea</i>	Anti-inflammatory activity (asthma)	(Juergens et al., 2003)
Linalool oxide (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	60047-17-8		C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170.25	198.5	–	0.945	<i>Pelargonium graveolens</i>	Anxiolytic-like effects	(Flávia Negromonte Souto-Maior, 2011)
Terpenic oxides										
Cis-Rose oxide	3033-23-6		C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	70–71	1.454	0.871	<i>Rosa damascena</i>	Anti-inflammatory, relaxant	(Nonato et al., 2012; Boskabady et al., 2006)

Tabella 1 (Continua)

EO components	CAS number	Molecular structure	Chemical formula	Molecular weight	Boiling point °C	Refractive index (20 °C)	Relative density g/mL (20 °C)	Plant source	Some biological activities	References
Sesquiterpenes β-Caryophyllene	87-44-5		C ₁₅ H ₂₄	204.36	268.4	1.498–1.504	0.905	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Anti-inflammatory, antispasmodic, anticolitique	–
Oxygenated sesquiterpenes α-Bisabolol	23089-26-1		C ₁₅ H ₂₆ O	222.37	153	1.496	0.92	<i>Matricaria recutita</i>	Anti-irritant, anti-inflammatory, antimicrobial	–
Caryophyllen oxid	1139-30-6		C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	279.68	1.495	0.985	<i>Chenopodium ambrosioides</i> , <i>Psidium guajava</i>	Induced apoptosis in human cancer cells (prostat & breast cells). Analgesic and anti-inflammatory	(Park et al., 2011; Chavan et al., 2010)
Valeric acid	3569-10-6		C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.33	374.5		1.06	<i>Valeriana officinalis</i>	Sedatif, anti-anxiolytic	(Houghton, 1999; Stevinson and Ernst, 2000)
Phenylpropanoids Eugenol	97-53-0		C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.20	254	1.544	1.067	<i>Eugenia</i> , <i>Caryophyllata</i>	Antifungal, antibacterial-dental care	(Abbaszadeh et al., 2014; Ghosh et al., 2014)
Cinnamaldehyde	104-55-2		C ₉ H ₈ O	132.16	248–250	1.621	1.05	<i>Cinnamomum Zeylanicum</i>	Bactericide, fungicide, insecticide	(Ye et al., 2013)

Ma la composizione di un olio essenziale e il suo profilo chimico può variare in base al tipo di estrazione scelta, se non dalle condizioni ambientali in cui è cresciuta pianta da cui deriva, la composizione del terreno, il clima, l'età e quindi il suo stato nel ciclo vegetativo⁴. Un esempio è il *Thymus vulgaris* L., del quale sono stati individuati nel sud della Francia 6 chemiotipi (cioè con lo stesso genotipo e fenotipo, quindi uguale corredo cromosomico e caratteristiche morfologiche, ma con principi attivi differenti), distinti in base al monoterpene dominante, il cui valore in percentuale è stato ricavato tramite gas cromatografia: geraniol (G), α-terpineol (A), thuyanol-4 (U), linalool (L), carvacrol (C) e thymol (T). I primi quattro sono componenti non fenolici, abbondanti nelle aree

caratterizzate da freddi inverni, mentre gli ultimi due sono fenolici e si trovano soprattutto in zone a bassa quota, vicino al mar Mediterraneo⁸.

Inoltre, alcuni componenti degli oli, essendo poco volatili (come i diterpeni) o non-volatili (come i triterpeni o politerpeni, quali steroli o carotenoidi), durante la distillazione dell'olio possono perdersi e risultano presenti solo nelle resine vegetali o gomme, rimanendo poi nei residui⁹.

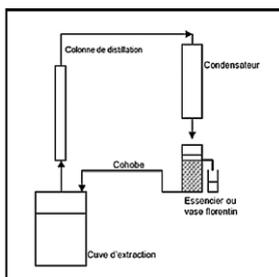
Vediamo quindi quali possono essere i diversi tipi di estrazione ad oggi usati.

1.3 Metodi di estrazione

Vengono suddivisi in due categorie: i metodi convenzionali/classici e quelli innovativi/avanzati, dato che, l'arrivo di nuove tecnologie ha permesso lo sviluppo di processi di estrazione innovativi e maggiormente efficienti.

- **Metodi convenzionali**

Si tratta dei metodi distillativi tramite acqua, utilizzando temperature elevate.



Idrodistillazione → il più semplice e vecchio, in cui la materia vegetale viene immersa direttamente nell'acqua, posta nell'alambicco, e il tutto portato a bollore. Il set-up quindi comprende una sorgente di calore, sormontata dall'alambicco, un condensatore e un decanter nel quale raccogliere il condensato e separare l'olio essenziale dall'acqua (Figura 5). Il processo quindi si basa su una distillazione azeotropica: l'acqua

Figura 5: Idrodistillazione³

portata a bollore crea un vapore, che attraversa il materiale vegetale e "trasporta" le molecole aromatiche di questo verso l'uscita dell'alambicco, passa poi per una camera di condensazione, dove si raffredda e diventa liquido; quest'ultimo viene raccolto nel decanter e qui l'EO è separato dall'acqua essendo più leggero.

È molto usato per l'estrazione dai petali e fiori; ha però diversi svantaggi: lunghi tempi di estrazione, alterazione chimica delle molecole terpeniche per contatto prolungato con l'acqua in ebollizione, surriscaldamento e perdita di alcune molecole polari durante l'estrazione.

Un'ottimizzazione di questo metodo è la *turbodistillazione*, in cui abbiamo il recupero dell'acqua aromatica, che viene riutilizzata nel ciclo successivo, una riduzione dei tempi di processo, grazie alle turbine e una maggior efficienza³.

Altre varianti possono essere:

Entrainment tramite vapore acqueo → differisce per il fatto che non c'è un contatto diretto tra il materiale vegetale e l'acqua, quindi permette di avere minori alterazioni chimiche e la durata dell'estrazione è minore³;

Idrodistillazione a vapore → l'estrazione avviene nell'alambicco, ma non ho un contatto diretto dato che è presente qui un piatto perforato o griglia che mantiene il materiale vegetale sospeso sopra la base contenente acqua (Figura 6); quest'ultima, portata a bollore, crea un vapore che porterà alla rottura dei pori nel materiale vegetale e al rilascio degli oli¹⁰. Si ottiene quindi un'estrazione veloce, e una minor perdita di molecole polari³;

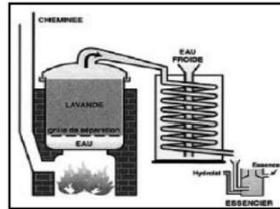


Figura 6: Idrodistillazione a vapore³

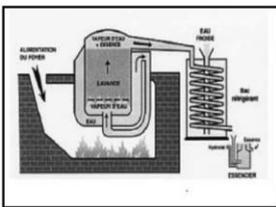


Figure 7: Distillazione a vapore³

Distillazione a vapore → molto simile alla tecnica precedente, ma in questo caso la generazione di vapore avviene al di fuori dell'alambicco (Figura 7). Si utilizza una pressione leggermente superiore a quella atmosferica, per indurre il vapore a circolare nella parte bassa del recipiente e poi attraversare il materiale³⁻¹¹;

ha formattato: Tipo di carattere: 8 pt, Italiano (Italia)

Formattato: Rientro: Sinistro: 0 cm, SpazioDopo: 8 pt

Estrazione con solvente organico → metodo tramite il quale si ottengono gli estratti sfruttando la loro solubilità: utilizza un solvente organico nel quale far macerare il materiale vegetale; in questo modo si va a creare un composto aromatico ceroso, chiamato "calcestruzzo". Si ottiene a questo punto l'olio con l'aggiunta di alcol (rimosso poi tramite distillazione sottovuoto) e infine con un condensatore il cosiddetto "assoluto"¹². Si riducono quindi le alterazioni e gli artefatti chimici che si hanno nel caso dell'idrodistillazione, dovuti al fatto che in alcuni casi le elevate temperature portano alla dissoluzione in acqua di composti che possono alterare il pH, rendendolo più acido. Questo tipo di lavorazione però comporta la presenza nell'EO finale di residui del solvente organico; per questo motivo ciò che si ottiene non viene usato nell'industria farmaceutica e in quella alimentare³.

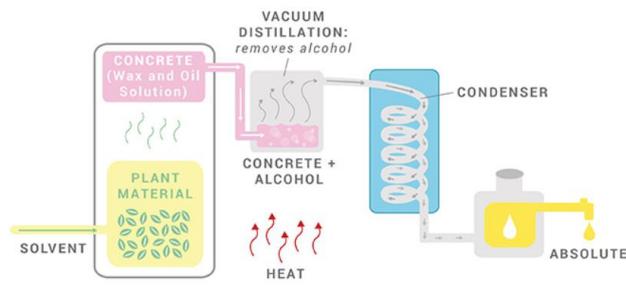


Figura 8: Estrazione con solvente organico¹²

Spremitura a freddo → l'estrazione avviene tramite basse temperature e pressioni in modo meccanico - e comporta lo schiacciamento dei semi, frutti o fiori, per forzare la fuoriuscita degli oli; poi tramite centrifugazione si va a prelevare l'olio. Metodo utilizzato soprattutto per gli agrumi, permette di ottenere degli oli completamente puri, preservandone le proprietà¹³.

- *Metodi innovativi*

Come già detto, un difetto dei metodi più classici è l'utilizzo di elevate temperature, che portano ad alterazioni chimiche come idrolisi, isomerizzazione o ossidazione degli oli essenziali; con le tecniche successive quindi si punta a ridurre i tempi di processo, le temperature usate, il consumo di energia, l'uso di solventi e l'emissione di CO₂. Spesso viene utilizzato un fluido supercritico, che corrisponde ad una pressione e temperature critici (P_c e T_c), condizione nella quale il fluido mostra bassa viscosità, alta diffusività e densità vicina a quella di un liquido.

Estrazione con fluido supercritico (SCFE) → Il fluido utilizzato è il diossido di carbonio, dato che ha punti di pressione e temperatura critici molto bassi (P_c = 73.8 atm e T_c = 31.1°C, Figura 9) non risulta tossico, naturalmente non infiammabile, a basso costo e con elevata purezza, si può rimuovere facilmente, non lasciando residui ed ha una polarità che lo rende adatto all'estrazione di composti lipofili³.

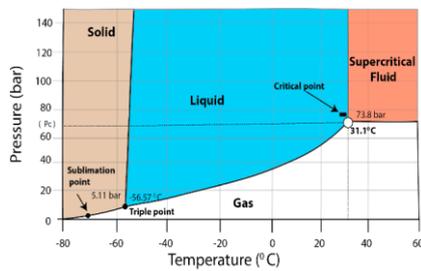


Figura 9: Diagramma di fase della CO₂¹⁴

ha formattato: Tipo di carattere: Corsivo, Italiano

Si tratta di step ciclici di compressione e depressione, nei quali il fluido viene riciclato: si parte quindi dal riscaldamento e compressione della CO₂, che raggiunge lo stato supercritico e passa attraverso la matrice vegetale, per generare gli estratti; segue uno step di

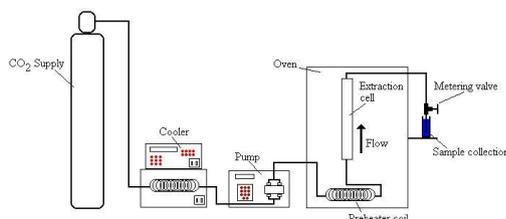


Figura 10: Schema di funzionamento della SFE¹⁵

depressione, nel quale questi ultimi vengono indirizzati verso dei separatori, la CO₂ è decompressa (quindi non è più un solvente) e si può separare l'estratto (Figura 10).

Un limite di questa tecnica è l'elevato costo della strumentazione, della sua installazione e del mantenimento; gli estratti però mostrano una qualità superiori, con migliori proprietà antibatteriche e antimicotiche³.

Fluidi (H₂ e CO₂) di estrazione subcritica (SFE) → spesso viene utilizzata l'acqua (in tal caso si parla di SWE) nella sua condizione subcritica, cioè quando la pressione è alta abbastanza da mantenere lo stato liquido e la temperatura più bassa della T_c (tra i 100°C e 374°C, Figura 11).

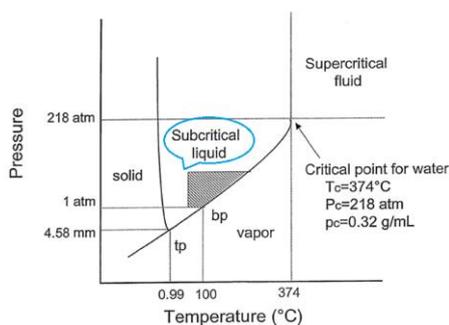


Figura 11: Diagramma de fase dell'acqua in funzione di temperatura e pressione¹⁶

Con l'aumento della temperatura le proprietà fisico-chimiche subiscono un cambiamento drastico, con una diminuzione della costante dielettrica, viscosità e tensione superficiale e un aumento del coefficiente di diffusione. Nella Figura 12 si può vedere come, impostando una pressione di 100MPa, posso far variare il valore della costante dielettrica dell'acqua

ha formattato: Tipo di carattere: 8 pt, Grassetto, Italiano (Italia)

Formattato: SpazioDopo: 8 pt

aumentando la temperatura, facendola diventare molto meno polare; in questo modo è possibile estrarre anche dei componenti poco polari.

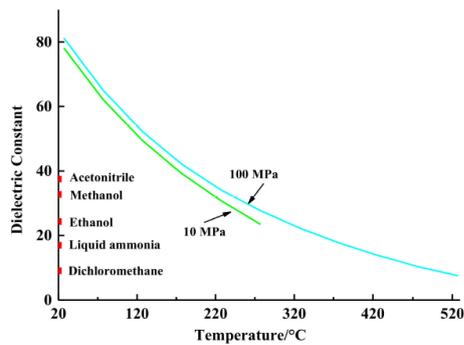


Figura 12: Costante dielettrica dell'acqua da 20°C a 527°C e da 10MPa a 100MPa¹⁷

Come si può notare inoltre, in alcuni range di temperatura, abbiamo un valore della costante dielettrica equivalente e quello dell'acetone, metanolo e etanolo; quindi è possibile sostituire questi solventi organici, durante il processo, con l'acqua per un'estrazione meno tossica e con minore impatto ambientale¹⁷.

L'estrazione tramite SBE può essere statica o dinamica: nella prima vengono aggiunti l'acqua subcritica e il materiale vegetale in un contenitore e poi riscaldati alla temperatura desiderata, mantenendo la pressione a valori controllati in modo che l'acqua sia allo stato liquido; successivamente si ha il raffreddamento con lo svuotamento della parte liquida, che contiene le molecole di interesse e l'estratto è raccolto per un'analisi cromatografica. Nel processo dinamico invece ho un'estrazione continua, ovvero l'acqua all'inizio è continuamente alimentata nell'estrattore tramite una pompa e il tutto avviene ad una temperatura fissa o in un gradiente di temperature^{18,19}.

Questo secondo metodo aumenta l'efficienza di trasferimento di massa e riduce i tempi di estrazione³.

Estrazione con CO₂ subcritica → in questo caso abbiamo una condizione subcritica quando la temperatura è attorno ai 31°C-55°C e la pressione tra 0.5MPa e 7.4MPa con la CO₂ che si comporta da solvente non polare. La qualità dell'estratto risulta migliore di quella dell'SWE e le temperature sono più basse³

Estrazione assistita con ultrasuoni (UAE) → l'utilizzo degli ultrasuoni permette un'intensificazione dell'estrazione, con un rilascio più veloce degli oli (soprattutto se usato in combinazione con altre tecniche come l'idrodistillazione). Il materiale vegetale è immerso in acqua o in un solvente e con l'attivazione degli ultrasuoni (20kHz-1MHz) è indotta una

ha formattato: Italiano (Italia), Pedice

ha formattato: Italiano (Italia), Pedice

vibrazione meccanica delle pareti e membrane delle cellule e ghiandole vegetali, stimolano un rapido rilascio di droplets di EO. I fenomeni che agiscono quindi sono una diffusione attraverso le membrane cellulari e una fuoriuscita del contenuto, una volta rotte le pareti; più il materiale vegetale viene macinato, più facilmente sono raggiunte dagli ultrasuoni anche le sacche e ghiandole interne (nella Tabella 2 è riportato un esempio).

Table 2: Influenza del grado di macinatura sull'estrazione dei fiori di chiodi di garofano

Extraction time (min)	Extraction technique	Milling degree	Eugenol extracted (g/100 g)
30	Silent	Not milled	4.10
30	Silent	0.1–0.5 mm	25.20
30	US	Not milled	4.22
30	US	0.1–0.5 mm	32.66

L'UAE, rispetto ai metodi classici, aumenta l'efficienza e la velocità di estrazione, richiede basse temperature e aumenta il range di selezione dei solventi; la strumentazione è relativamente poco costosa³.

Estrazione assistita con le microonde (MAE) → si tratta di onde elettromagnetiche con frequenza tra i 300MHz e 30GHz e lunghezza d'onda tra 1cm e 1m; in questo caso la frequenza utilizzata è di 2450MHz e lunghezza d'onda di 12.2cm. Questo metodo permette un'alta riproducibilità in tempi brevi, un utilizzo semplice, ridotti consumi di solventi e bassa energia; ha inoltre premesso lo sviluppo di numerose varianti, alcune delle quali spiegate qui di seguito³.

Estrazione a microonde senza solventi (SFME) → si tratta di una distillazione secca (senza aggiunta di acqua o solvente organico, data la crescente preoccupazione sull'impatto dei solventi a base di petrolio sull'ambiente e la salute) a microonde e a pressione

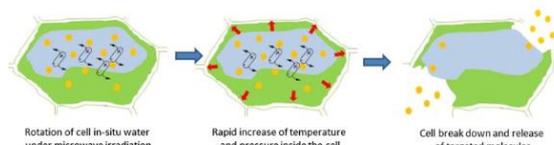


Figura 13: Funzionamento della SFME²⁰

atmosferica. Il suo funzionamento si basa sulla stimolazione tramite irradiazione delle cellule d'acqua interne al materiale vegetale, un aumento conseguente della pressione interna che porta alla rottura delle pareti cellulari e il rilascio del target di interesse (Figura 13); quindi gli EO vengono liberati ed evaporano spontaneamente tramite distillazione azeotropica, con l'acqua presente nelle cellule²⁰.

Idrodifusione e gravità a microonde (MHG) → viene introdotto principalmente per poter recuperare facilmente l'aroma dell'estratto, considerando sia la frazione volatile che quella non. È un processo basato sulla combinazione di riscaldamento, tramite le microonde, e la gravità terrestre, a

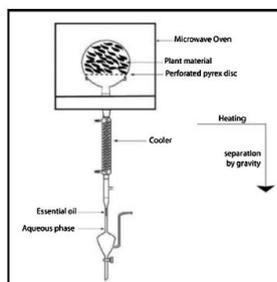


Figura 14: Schema MHG³

pressione atmosferica: abbiamo un sistema con un distillatore “rovesciato”, posto al di sotto del reattore a microonde, con funzionamento simile all'SFME, ma tramite gravità vi è il trasporto degli estratti dall'alto al basso, fuori dal reattore, fino ad un sistema di raffreddamento (Figura 14). I vantaggi del metodo sono legati ad una riduzione dei tempi di estrazione (20' in confronto ai 90' dell'idrodistillazione), un risparmio di potenza e riduzione dell'impatto ambientale³.

Distillazione a vapore con le microonde (MSD) e diffusione a vapore con le microonde (MSDf)
→ pensato per l'estrazione di EO dalla buccia d'arancia e dai fiori di lavanda secchi, è un metodo più efficiente rispetto al convenzionale, con tempi più brevi e condizioni più pulite, con ridotto impatto sulla composizione volatile dell'olio e sulle sue proprietà sensoriali. Nel caso della diffusione abbiamo un flusso di vapore che attraversa il materiale vegetale verso il basso, con maggior efficienza della precedente in termini di tempo, risparmio di energia, purezza, qualità e riduzione del consumo di acqua³.

Caduta di pressione istantanea controllata (DIC) → consiste nello stabilire un vuoto iniziale di 50mbar, prima dell'iniezione di un vapore saturo, seguito da un'improvvisa decompressione (tramite una tecnica di tipo HTST, cioè alta temperatura/alta pressione in breve tempo); il vuoto iniziale riduce la resistenza dell'aria e facilita la diffusione del vapore nel prodotto, riducendo i tempi in gioco³.

Il metodo di estrazione risulta quindi un passaggio molto importante, da scegliere in base all'uso che si farà e in base a quali proprietà si vuole sfruttare dell'olio essenziale, tra le quali nel campo medico e nel nostro caso specifico, risultano interessanti quella antiossidante e antibatterica.

1.4 Proprietà antiossidante

Come già accennato, l'interesse per questo aspetto, è giustificato da una preoccupazione crescente sui possibili effetti pericolosi da parte degli antiossidanti sintetici comunemente utilizzati (BHA e BHT).

Quando si parla di antiossidanti naturali, ci si riferisce a quei composti che, anche se presenti in quantità ridotte al di sopra di un materiale, sono capaci di rallentare o ritardare l'ossidazione, reagendo con i radicali che si creano o contrastando lo stress ossidativo che questi creano in particolare nei confronti di lipidi, proteine, carboidrati e altre molecole organiche, che porta alla morte cellulare e allo sviluppo di processi infiammatori.

Il processo (Figura 15) ha inizio quando alcune specie radicaliche reagiscono con il substrato di RH (lipidi) (estraendo in genere l'atomo H), producendo un radicale alchilico R*, il quale reagirà con l'ossigeno formando un radicale perossilico (ROO*). Poi in modo ciclico, il radicale ROO* attacca

un'altra molecola RH per produrre un idroperossido ROOH (substrato ossidato) e un altro radicale, fino a quando due specie radicaliche, nello step di terminazione, non si estinguono incidentalmente tra di loro. La "lunghezza della catena" è data dal numero di cicli che intercorrono tra l'iniziazione e la terminazione²¹.

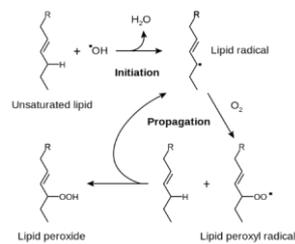


Figura 15: Perossidazione lipidica²²

I principali composti antiossidanti hanno due tipi di meccanismi di interferenza: si parla di "antiossidanti preventivi" (Figura 16) se agiscono nello step di iniziazione o di "antiossidanti interruttori di catena", che rallentano o bloccano l'autossidazione, reagendo velocemente con i radicali ROO•, prima che questi lo facciano con il substrato, formando delle specie non propaganti. Oltre a questi, altre molecole sono in grado di potenziare o indurre l'attivazione degli enzimi antiossidanti già presenti.

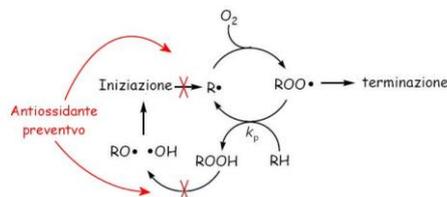


Figura 16: Meccanismo di azione degli antiossidanti preventivi²³

Nella Figura 17 è riportata l'azione antiossidante degli "idrogeno donatori" (caso particolare degli interruttori di catena), di cui fanno parte i composti a struttura fenolica che producono un radicale fenossilico molto stabile; la quantità di fenoli che però si ottiene dall'estrazione degli EO è a volte limitata, dato che molti di questi composti sono non volatili²³.

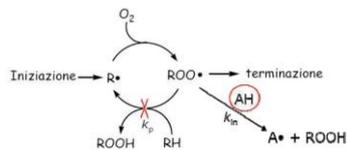


Figura 17: Idrogeno donazione²³

Scheme 4. Some Common Mono- and Sesquiterpenes Bearing the Cyclohexadiene Core

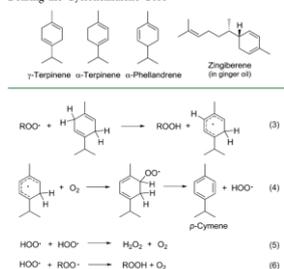


Figura 18: Alcuni mono e sesquiterpeni con struttura a cicloesadiene²¹

Molti componenti terpenoidi non fenolici (come l' α -pinene) invece possono reagire rapidamente con i radicali perossilici, producendo un radicale alcalino reattivo che, in presenza di ossigeno, forma nuovamente un radicale perossilico, propagando la catena ossidativa e quindi fungendo da auto-ossidanti. Non è il caso dei terpenoidi con struttura a cicloesadiene (Figura 18), i quali si ossidano con un processo di terminazione molto veloce, riducendo quindi la velocità di ossidazione^{21,24}.

Un olio essenziale con buone caratteristiche antiossidanti in genere ha un ampio contenuto di componenti fenoliche e uno più modesto di terpenoidi insaturi, oppure un buon quantitativo delle prime e di componenti a struttura a cicloesadiene.

Però ad oggi gli studi che sono stati fatti riguardo queste proprietà sono a volte contraddittori o poco chiari, dato che non sempre si parte dallo stesso setting sperimentale, compromettendo l'importanza dei risultati²¹.

1.5 Proprietà antibatterica

La crescente resistenza agli antibiotici comunemente utilizzati è uno dei motivi principali per il quale si stanno indagando nuove alternative naturali, come gli oli essenziali; particolare interesse è dovuto alla loro azione contro ceppi batterici gram-positivi in particolare, ma anche contro alcuni gram-negativi (Figura 19).

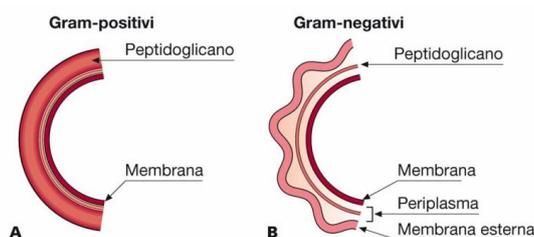


Figura 19: Batteri Gram positivi e Gram negativi²⁵

Quando si parla di gram-positivi ci si riferisce ai batteri che non possiedono una membrana esterna, ma uno strato spesso di peptidoglicani, molto porosa e quindi facilmente attraversabile dalle molecole idrofobiche; in alcuni casi possono essere caratterizzati dalla formazione di spore o dalla necessità di ossigeno per sopravvivere. Invece i batteri gram negativi hanno questo strato di peptidoglicani più

sottile, protetto da una membrana esterna più dura, rendendoli difficilmente debellabili. Inoltre, quando la loro parete cellulare viene intaccata, reagiscono rilasciando endotossine che peggiorano i sintomi della loro azione.

I meccanismi di resistenza messi in atto dai batteri sono riassunti nella Figura 20:

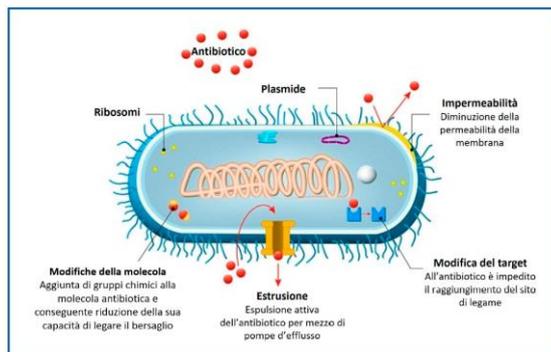


Figure 20: Meccanismi di resistenza agli antibiotici²⁶

tra i quali, i principali sono:

- Modifica o protezione dei target degli antibiotici;
- Modifica o distruzione degli antibiotici;
- Prevenzione tramite una riduzione della permeabilità della membrana;
- Espulsione attiva dell'antibiotico attraverso le pompe di efflusso.

Per quanto riguarda gli antibiotici e in particolare gli EOs, questi hanno un metodo di azione che coinvolge diverse componenti della cellula batterica (Figura 21), difatti possono degradare la parete cellulare, danneggiare la membrana citoplasmatica o le proteine di membrana, portare alla perdita del contenuto cellulare o all'esaurimento della forza motrice protonica (PMF) oppure far coagulare il citoplasma. L'idrofobicità degli oli essenziali permette loro di inserirsi tra i lipidi delle membrane cellulari e dei mitocondri, rendendoli permeabili: è il caso, ad esempio, della membrana citoplasmatica che circonda gli enzimi come l'ATPasi, sulla quale gli idrocarburi ciclici degli EO possono agire accumulandosi nel doppio strato lipidico per distorcere l'interazione tra i lipidi e le proteine, oppure interagendo direttamente con le parti idrofobiche delle proteine^{6,27,28}.

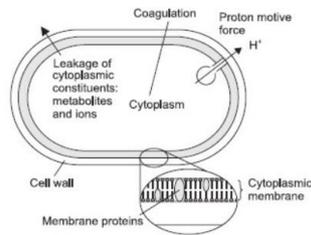


Figure 21: Possibili attività battericide svolte dagli oli essenziali²⁷

Le condizioni fisiche che aumentano l'azione degli oli essenziali possono essere bassi valori di pH, della temperatura e di ossigeno.

La misura delle performance antibatteriche molto spesso riguarda i valori di minima concentrazione inibitoria (MIC) o di minima concentrazione battericida (MBC), ma anche in questo caso ci sono diversi fattori che possono influenzare gli esami, come il metodo utilizzato per estrarre gli EO, il volume di inoculazione, la fase di crescita, il mezzo di cultura utilizzato, il pH, temperatura e tempo di incubazione, rendendo complicato un confronto tra i diversi dati.

Generalmente gli oli che risultano avere forti proprietà antibatteriche hanno anche un'alta percentuale di componenti fenoliche, come carvacrol, thymol (soprattutto l'importanza in questi della presenza del gruppo ossidrilico) e eugenol; è stato visto inoltre che il gruppo alchilico influenza l'attività più del gruppo alchenile (limonene più attivo del p-cymene)⁶; in altri casi risulta funzionante un'azione sinergica tra due o più componenti, come nel caso del carvacrol e il precursore p-cymene e tra cinnamaldehyde ed eugenol. Anche la presenza di fenilpropani conferisce qualche proprietà antibatterica, dovuta alla presenza di gruppi ossidrilici liberi.

I terpeni non risultano avere particolari proprietà antibatteriche, mentre i terpenoidi sì, legato ai loro gruppi funzionali, la presenza delle molecole di ossigeno o di gruppi metile.

Qualche esempio di piante più comuni dalle quali vengono estratti degli oli essenziali con proprietà antibatteriche, è presente nella Tabella 3:

Tabella 3: Effetti antibatterici di alcuni oli essenziali

Materiale Vegetale	Componenti principali	Effetti antibatterici
<i>Salvia officinalis</i>	Monoterpeni ossigenati: 10.9% di camphor, 24.8% di α -thujone, 14.8% di 1,8-cineole; in minor quantità α - e β -Pinene, camphene, δ -Gurjunene, borneol, β -Thujone e	Inibizione crescita di <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus megatherium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> ; piccoli

	β -Caryophyllene ²⁹	effetti contro Escherichia coli e Staphylococcus aureus ²⁹
<i>Cinnamon</i>	In base al sito di estrazione può avere una composizione diversa: se proveniente dalla corteccia, presenta maggiori quantità di cinnamyl aldehyde (65-80%) e più basse di eugenol (5-10%); se estratto dalle foglie abbiamo maggiori quantità di eugenol (10-95%) e minori di cinnamul aldehyde (1-5%) ¹	Forti effetti contro Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli e Staphylococcus cerevisiae, Paenibacillus larvae ³⁰
<i>Origano (Origanum vulgare)</i>	Soprattutto carvacrol (64.86%) e p-cymene (8.35%), tymol (4.22%), α - e γ -terpinene, linalool, caryophyllene, β - e α -pinene, myrcene e altri in minor quantità ³¹ .	Aumenta la permeabilità dello Staphylococcus aureus (particolari effetti contro lo S.aureus meticillino-resistente MRSA) e P. aeruginosa, controlla l'Alicyclobacillus ³¹
<i>Thyme</i>	Maggiori componenti: thymol (36-55%) e p-cymene (15-28%), in minor quantità Carvacrol (1-4%), γ -Terpinene (5-10%), Linalool (4-6.5%), β-myrcene(1-3%) , terpin-4-ol (0.2-4.0%) ¹ -	Effetti contro Shewanella putrefaciens, Lactobacillus plantarum e Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Salmonella typhimurium, Escherichia coli ³³ .
<i>Coriandol</i>	Soprattutto monoterpene ossigenati come linalool (70.11%), camphor (3-6.2%), linalyl acetate (2.4-3.3%), phellandrene (1.7-4.1%), α -pinene, p-cymene, geranyl acetate, γ -terpinene, α -cedrene, citronellal, cis-dihydrocarvone ³³	Azione sinergica con antibiotici come oxacillina, amoxicillina, gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina, contro gram-positivi (MRSA, S. epidermidis) e gram-negativi (Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli) ³³ .

<i>Melissa officinalis</i>	Costituita soprattutto da Citronellal (37.33%), Thymol (11.96%), Citral (10.1%) in minor parte da 1,3,8-p-Menthatriene, Linalool, β -Caryophyllene ³⁴	Forti effetti contro lo <i>Staphylococcus aureus</i> ³⁴
<i>Lavandula stoechas</i>	In particolare camphor (28.82%), fenchone (35.42%) e 1,8-cineole (13.3%); in minor quantità camphene, borneol, α -pinene, linalool, β -thujone, and linalyl acetate ³⁵	Sono stati confrontati 5 diversi tipi di Lavanda, alcuni dei quali hanno mostrato forti effetti contro la <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> ³⁵
<i>Mirto</i>	Maggiori costituenti sono: 1,8-cineole (36.1%), α -pinene (22.5%), linalool (8.4%); in minor quantità si trovano il α -terpineol, nonadecane, linalyl acetate, e β -phellandrene ³⁶	Inibisce la crescita dello <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. marcescens</i> e <i>Bacillus subtilis</i> ³⁶
<i>Finocchio</i>	<i>cis</i> - β -ocimene (dal 8.28% al 54.84%), sabinene (dal 1.47% al 18.75%), <i>trans</i> - β -ocimene (dal 1.32% to 18.52%), α -pinene (dal 6.66% al 15.51%), γ -terpinene (dal 0.34% al 13.58%), α -terpinolene (dal 1.03% al 10.28%), and β -pinene (dal 0.63% al 8.38%) ³⁷	Azioni importanti contro il <i>Proteus vulgaris</i> , minori effetti nei confronti del <i>Bacillus cereus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> ³⁷
<i>Peppermint</i>	I maggiori componenti sono: menthol (30-55%), menthone (14-32%), (+)-isomenthone (1.5-10%), cineol (3.5-14%), menthyl acetate (2.8-10%), menthofuran (1.0-9.0%), limonene (1.0-5.0%), pulegone (<4.0%), and carvone (<1.0%) ¹	Effetti sulla permeabilità della membrana dello <i>Staphylococcus aureus</i> , diminuisce la mobilità dei batteri, cambia la loro morfologia e inibisce la formazione di biofilm ¹ . Bassi valori di MIC contro lo

		Streptococcus sanguinis, Enterococcus faecalis, actinomyces viscosus, eikenella corrodens.
--	--	---

1.6 Proprietà antitumorali

Diversi studi hanno mostrato come alcune piante (e frutti) abbiano proprietà benefiche dal punto di vista dell'azione anticancerogena, con sistemi difensivi nei confronti delle cellule, detossificanti e antiossidanti; in particolare tale azione è svolta dalle parti fenoliche, dai carotenoidi, vitamine, alcaloidi, componenti che contengono azoto, composti organosolforici e oli essenziali. Gli EO nello specifico sembra abbiano soprattutto un'azione preventiva, come nel caso dei componenti del Lentisco, che in vitro hanno mostrato un potenziale inibitorio nel caso di cancro al colon, alla prostata o ai polmoni³⁸.

Le proprietà antiossidanti sono state già discusse, le quali, proprio in questo contesto, risultano fondamentali; oltre a ciò gli EO possono inibire l'ingresso di mutageni nelle cellule o inattivarli, catturare i radicali che questi producono o inibire la conversione da parte degli enzimi dei promutageni in mutageni³⁸. Componenti come α -terpinene, α -terpineol, 1,8-cineole, d-limonene, camphor, citronellal e citral (la cui struttura è presente in Figura 22) risultano essere efficaci in tal senso; in alcuni studi è stato dimostrato che gli EO aiutano a ridurre il danneggiamento e la morte mitocondriale da parte del lievito *Saccharomyces cerevisiae* e a proteggere le cellule da possibili mutazioni causate dai raggi UV³⁸.

Ciò che si è visto inoltre è come diversi terpenoidi e composti aromatici abbiano effetti nei confronti delle cellule tumorali, inducendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno, l'apoptosi e riducendo la vascolarizzazione tumorale. Gli effetti sono ancora più evidenti se associato all'EO è presente un agente chemioterapico o radioterapico.

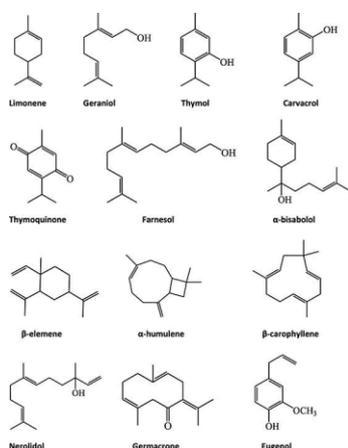


Figure 22: Struttura chimica di alcuni componenti attivi degli oli essenziali³⁸

1.7 Effetti tossici

In tale contesto, il problema principale degli oli essenziali è dato dalla loro complessità dal punto di vista costitutivo, che porta quindi a non avere dei target specifici cellulari durante la loro azione; nei confronti di una cellula eucariote questi possono portare alla depolarizzazione delle membrane mitocondriali, modificando il flusso di ioni Ca^{++} e altri canali ionici, riducendo il gradiente di pH, agendo anche sulle riserve di ATP o aumentando la permeabilità della loro membrana (come avviene sui batteri)⁶. Nel peggiore dei casi quindi l'azione degli EO può portare alla morte cellulare per apoptosi o necrosi.

In alcuni oli essenziali invece sono state riscontrate molecole fotoattive, che, se esposte a luce ultravioletta, portano alla produzione di addotti citotossici o altamente mutageni⁴.

La maggior parte degli studi in ogni caso sono rivolti al singolo componente che può avere effetti benefici, ma sull'intero EO, con il complesso sistema di numerosi costituenti, ognuno con la sua azione individuale o sinergica, si hanno pochi dati a disposizione. Inoltre i componenti definiti come rischiosi o potenzialmente cancerogeni sono stati testati prevalentemente su roditori, i quali li metabolizzano in modo differente rispetto agli umani e in alcuni casi vengono usate dosi molto elevate prima di vedere degli effetti³⁹.

La tossicità di un prodotto viene valutata in base agli effetti che si notano sull'organismo, tessuti o cellule tramite una misura a livello di popolazione, come la dose letale mediana LD_{50} , ovvero quella dose in grado di uccidere metà dei membri di una determinata popolazione animale⁴⁰.

Anche nel nostro caso è importante considerare la dose corretta da utilizzare, in modo da non causare problemi di tossicità, o, al contrario, non notare alcun effetto positivo. In alcune analisi fatte su dei topi ai quali sono stati somministrate diverse dosi dell'olio essenziale del *Thymus vulgaris* si è notato che se si somministrano 2000mg/kg per peso corporeo in alcuni casi si provoca la morte, preceduta dall'insorgenza di problematiche al sistema respiratorio, nervoso centrale e autonomo; sono state rilevate alterazioni delle cellule polmonari sia con questa dose che nel caso di dosi orali ripetute in 28 giorni (100-250-500mg/kg per peso corporeo), probabilmente dovute alla volatilità dei componenti dell'olio e come effetto della presenza del thymol⁴¹.

1.8 Stabilità

Come già accennato, la composizione di un olio essenziale può variare facilmente, in base a diversi fattori legati al periodo precedente alla loro estrazione, al metodo con il quale questa è avvenuta, ma anche poi alla sua conservazione e alla successiva manipolazione. Ottenuto l'olio e privato della sua protezione vegetale, i costituenti tendono ad essere facilmente inclini a reazioni ossidative, di polimerizzazione e a trasformazioni chimiche (come schematizzato in Figura 23), che possono portare semplicemente ad una perdita/diminuzione delle proprietà. Sono soprattutto i terpenoidi a subire delle modifiche, evidenti in alcuni casi dal cambio di colore nell'olio, ad un odore più pungente⁴².

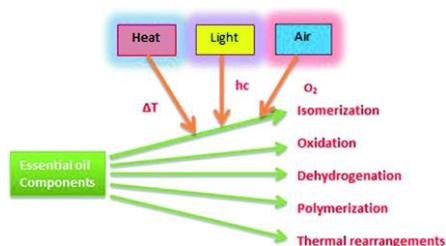


Figura 23: Possibili reazioni che possono avvenire negli oli essenziali⁴³

In altre situazioni invece questi possono rendere l'EO capace di sviluppare delle dermatiti o sensibilizzanti della pelle.

Nel caso dell'ossidazione, questa avviene a contatto con l'aria (in presenza di determinate condizioni, come una certa concentrazione di O₂, una particolare struttura molecolare, un input energetico), nel momento in cui le molecole insature reagiscono con l'ossigeno, tramite un meccanismo a catena di radicali liberi.

Ci sono poche analisi approfondite riguardo tale stabilità, ma si possono individuare alcuni fattori che hanno una certa incidenza, come il cambiamento di temperatura, l'esposizione all'ossigeno e alla luce, che sia quella visibile o quella ultravioletta (che accelera il processo di autoossidazione). Nel caso del calore, in genere un aumento di temperatura tende ad accelerare una reazione chimica ma anche

un abbassamento di questa, oltre un certo valore, può avere effetti negativi, favorendo la solubilità dell'ossigeno nei liquidi e, di conseguenza, una reazione ossidativa.

Come accennato inizialmente, anche il metodo conservativo ha una sua influenza, in particolare nel caso di contenitori metallici, che possono rilasciare delle impurità nell'olio promuovendo la degradazione.

Ogni olio essenziale, con le sue percentuali di componenti presenti, ha diversi criteri di conservazione, reagendo in modo differente ai fattori sopra descritti, ma le regole generali prevedono di porli al buio, lontano da fonti di calore e in contenitori sigillati o in atmosfera di azoto⁴².

1.9 Mentha x piperita

È stato preso in analisi l'olio essenziale di menta del tipo "*Mentha x piperita (Huds), variante Officinalis (Sole) forma Rubescens (Camus)*", incrocio tra la *Mentha aquatica* e la *Mentha viridis*, appartenente alla famiglia delle Lamiaceae, prodotta in Piemonte e precisamente a Pancalieri; viene molto spesso chiamata in modo più identificativo "*Mentha di Pancalieri*" o "*Mentha Mitcham da Pancalieri*" ed è un prodotto di Denominazione di Origine Protetta (DOP).

1.9.1 Proprietà

L'olio essenziale della menta è uno dei più prodotti ed utilizzati, nei vari ambiti, data l'ottima fragranza e il fatto che viene riconosciuto spesso come sicuro dal punto di vista alimentare, oltre ad avere componenti (presenti in maggior quantità), come menthol e menthone, con effetti antimicrobici. Alcune analisi fatte su campioni di Mentha di Pancalieri hanno evidenziato le proprietà antifuginee forti nei confronti del *Cryptococcus neoformans*, dermatofiti, *Saccharomyces cerevisiae*, e *Pichia carsonii*, un po' meno contro i lieviti *Candida krusei* e *C. glabrata*. Viene utilizzato inoltre in diversi medicinali, per il trattamento del mal di stomaco, dolori al petto e per problemi all'intestino⁴⁴.

1.9.2 Tossicità

Tra i componenti della Mentha, è stata analizzata la biocompatibilità di monoterpeni come R-pulegone (PUL) e R-menthofurano, rilevando alcuni casi di epatotossicità nei roditori e, soprattutto per il PUL, tossicità a livello polmonare con variazioni nell'espressione delle microRNA⁴⁵. Anche la stereochimica ha una sua importanza, in quanto l'S-enantiomero del pulegone è risultato meno tossico dell'R-enantiomero (Figura 24), che però si trova più spesso nell'olio⁴⁶.

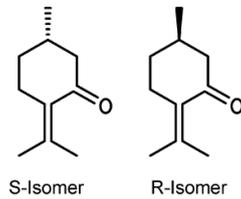


Figura 24: Isomeri del pulegone⁴⁶

L'Unione Europea ha stabilito dei valori massimi di pulegone da inserire negli alimenti, pari a 25mg/kg in generale, 100mg/kg nelle bevande, 250mg/kg in caso di bevande con aromatizzatore alla menta e fino a 250mg/kg nella confetteria alla menta⁴⁶.

In diversi studi si sostiene che la causa dell'epatotossicità del pulegone sia dovuta in parte alla formazione di un metabolita dopo l'ingestione dell'olio, il menthofuran⁴⁶; in altri invece si rileva come siano i metaboliti di quest'ultimo dovuti all'ossidazione da parte del citocromo P450 nel fegato, ovvero il p-cresol e altri prodotti, a causare questa tossicità⁴⁷.

Per quanto riguarda il menthol, secondo la Natural Standards, una dose di 1g/kg per peso corporeo è considerata fatale; è stata dimostrata la sua azione analgesica e rilassante dal punto di vista muscolare, ma ci sono state delle reazioni avverse dovute all'assunzione dell'olio di mentha tramite capsule come ipersensibilità, dolore addominale, reflusso acido, bradicardia, tremore muscolare e ulcerazioni orali. Alte dosi di EO di Mentha hanno causato problemi a livello cerebrale e renale negli animali⁴⁸.

2. Rivestimenti antibatterici

L'adesione microbica è una delle cause principali di fallimento di un impianto; i materiali protesici, estranei all'organismo, possono risultare il substrato ideale per i batteri per attaccarsi e moltiplicarsi⁴⁹. La topografia (ruvida, idrofobica, etc) e la composizione chimica di questa superficie inoltre hanno un ruolo importante in questo processo, favorendolo o meno. Si possono individuare due stadi durante l'adesione batterica e la sua progressione (rappresentato in Figura 25): nella fase I si ha una rapida e reversibile interazione tra i microrganismi in forma planctonica e il substrato, fino a quando non raggiungono una maggiore stabilità e cambiano conformazione, con la formazione di un sottile strato di biofilm (matrice prodotta dagli stessi, costituita da polisaccaridi, DNA extracellulare e proteine⁵⁰) si passa quindi alla fase II, irreversibile, in cui lo strato di biofilm si ispessisce, protegge i batteri da un attacco esterno ed è quindi più complicato da debellare, oltre ad esserci la tendenza, a questo punto, da parte dei microrganismi di distaccarsi e diffondersi, creando degli emboli infettivi⁵¹.

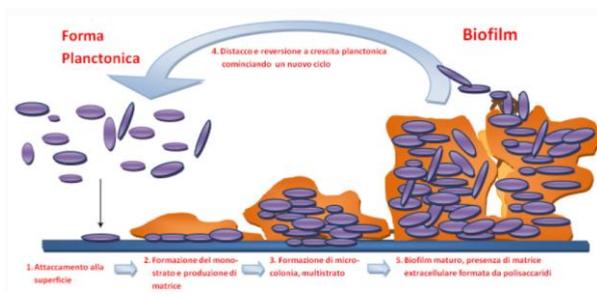


Figura 25: Fasi dell'adesione batterica e formazione di biofilm⁵²

Il trattamento principale che si adotta oggi è la somministrazione di una dose di antibiotico, in base al livello di infezione, fino alla chirurgia di revisione nei casi più gravi; non sempre si hanno però effetti, a causa della resistenza microbica o di un intervento tardivo; inoltre si è visto che la struttura interna del biofilm può essere diversa in base al tipo di batterio e alle condizioni ambientali, complicando l'azione antibatterica. È importante quindi che gli approcci seguiti per risolvere il problema sull'impianto puntino ad impedire la formazione del biofilm, evitando l'adesione primaria dei batteri (azione antiadesiva), uccidendoli allo stato planctonico (azione battericida) o bloccandone la riproduzione (azione batteriostatica), al contatto con la superficie o tramite rilascio di agenti antimicrobici.

Possiamo quindi distinguere due tipi di approcci⁵³:

- Uno passivo, come nel caso delle superfici antiadesive, ottenute modificando le caratteristiche esterne dell'impianto, rendendoli più rugosi, idrofilici o aumentando la loro energia libera;
- Uno attivo, con rivestimenti batteriostatici o battericidi.

Le strategie adottate ad oggi per combattere il problema tramite il secondo approccio hanno dato ottimi risultati e in alcuni casi risultano indispensabili. In base al tipo di antimicrobico usato, si possono distinguere due categorie:

- con agente inorganico, come argento, rame, ossido di zinco, solfuro di molibdeno e componenti di nitrato;
- Con agente organico, come antibiotico, peptide antimicrobico, polimero, oli essenziali ed altri.

Considerando i metodi che non sfruttano antibiotici per i rivestimenti, in modo da ridurre l'utilizzo, possiamo distinguere:

Tabella 4: Rivestimenti antibatterici

	Agente	Azione svolta	Tossicità
Strategie chimiche	<i>Argento</i>	Agente antibatterico molto utilizzato in ambito clinico, spesso sottoforma di nanoparticelle, mostrando delle proprietà fisico-chimiche più stabili e un'azione più diretta; agisce, attraverso il rilascio di ioni dalla superficie, sulle proteine ed enzimi della parete e membrana cellulare, causando dei cambiamenti, aumentando la permeabilità fino alla lisi della cellula batterica, oltre ad interferire con il suo DNA, impedendo ai microrganismi di replicarsi ⁵⁹ . Spesso si decide di incorporarlo nell'idrossiapatite in modo da avere un materiale bioattivo e antibatterico, o in prodotti medici come bende ⁵⁵ ; si hanno effetti contro l' <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>aureus</i> (questi ultimi due sono i principali organismi infettivi nei dispositivi medici) ^{53,56} .	In qualche caso le nanoparticelle penetrano nel citoplasma e nella membrana nucleare, interferendo con l'attività cellulare o creano uno stress ossidativo ^{57,58} .
	<i>Oro</i>	Fino ad oggi maggiormente usato come agente drug-delivery, di contrasto e terapeutico, sotto forma di nanoparticelle di dimensione al di sotto di 2nm; sono state notate delle proprietà contro batteri gram positivi e gram negativi, contrastando la formazione di biofilm in alcuni casi. Si pensa che il suo effetto sia dovuto all'attrazione cationica	È stata notati alcuni effetti tossici in caso di esposizione prolungata e ad elevate concentrazioni, sia che si tratti di nanoparticelle, che di ioni; soprattutto nel caso di questi ultimi, tramite somministrazione orale, si è visto un accumulo non solo a livello dei reni, ma anche nei polmoni, fegato e milza; anche per questo si preferisce sfruttare le nanoparticelle ^{56,61} .

		verso la membrana plasmatica carica negativamente dei microbi; la sua azione coinvolge il metabolismo batterico, la membrana cellulare e formazione di ROS ^{54,59,60} . Sono stati dimostrati effetti antibatterici nei confronti <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> e <i>S. aureus</i> ^{56,61} .	
	<i>Rame</i>	Mostra le sue capacità antibatteriche in forma di nanoparticelle, contro i gram negativi, penetrando e distruggendo la parete cellulare, danneggiando il DNA e producendo stress ossidativo. Interagendo spesso con i gruppi amminici e carbossilici presenti sulla membrana, causando la sua successiva rottura, ha maggior efficacia verso i batteri che presentano una più alta concentrazione di questi sulla superficie. Ha effetto contro batteri come <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>), e <i>Clostridium difficile</i> (<i>C. difficile</i>). L'utilizzo in vivo non è ancora completamente analizzato ⁵⁹ . La sua azione è più limitata rispetto all'argento, per questo motivo richiede una dose più elevata ⁵⁶ .	Si tratta di un elemento traccia; quando l'assunzione di nanoparticelle supera certi valori, mostra effetti tossici che possono portare alla morte cellulare, causate da un aumento della produzione di ROS e di specie reattive dell'azoto (RNS) a livello polmonare e del fegato ⁶² .
	<i>Fluoro</i>	L'idrossiapatite fluorurata mostra un'ottima attività antibatterica contro lo <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> ⁵⁹ .	Un'elevata assunzione di ioni fluoruro risulta essere pericolosa, causando problemi respiratori, gastrointestinali ed epatici, oltre ad incidere sul sistema nervoso ⁶³ .
	<i>Ossido di zinco</i>	Le nanoparticelle sono spesso utilizzate come drug carriers; invece quando attivate dalla luce visibile, svolgono la loro azione contro lo <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. mutans</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumonia</i> , stimolando la produzione di ROS e accumulandosi nel citoplasma e	Le nanoparticelle però possono avere effetti tossici a livello delle cellule, causare stress ossidativo o disfunzione mitocondriale, a causa della loro solubilità ⁶⁴ .

		nella membrana esterna ^{56,59} .	
	<i>Platino</i>	Ha dimostrato di avere proprietà batteriostatiche contro <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> , agendo sul DNA, stimolando l'iperproduzione di ATP e di ROS ⁵⁴ . Le nanoparticelle sono comunemente usate nell'industria alimentare ⁶⁵ .	Non risulta essere citotossico se in una dose di 10.1mg/L ⁶⁵ . In un altro studio si è notato che nanoparticelle con dimensione troppo piccola (2-3nm) e forma sferica, tende ad essere maggiormente citotossica (penetrando più facilmente attraverso la membrana) rispetto a quelle di maggiori dimensioni e forma cuboidale, ovale o a fiore ⁶⁶ .
	<i>Nanotubi di carbonio</i>	Agisce sulla membrana cellulare, sia in modo meccanico, con una parziale penetrazione e una più ampia superficie di contatto con il batterio, che con uno stress ossidativo, dovuto alle proprietà elettriche dei nanotubi; ci sono ancora poche applicazioni a tal scopo e non è stata valutata appieno la loro tossicità sul corpo umano ^{59,67} .	I materiali in carbonio hanno rivelato una certa tossicità, in dipendenza dalla forma delle nanoparticelle: in particolare si ha maggiore citotossicità in presenza di nanotubi a parete singola, un po' meno con quelli multi-parete e nel caso del fullerene ⁶⁸ .
	<i>Materiali a base di grafene</i>	L'ossido di grafene ha proprietà battericide limitate paragonandolo ad altri materiali; dato che la sua azione si esplica al contatto con i batteri (perforandone la membrana e causandone uno stress ossidativo), spesso viene utilizzato come base di supporto per altre nanoparticelle con azione antimicrobica, facilitando l'interazione ⁵⁶ .	In caso di materiali in GO troppo piccoli, si hanno effetti nei confronti delle cellule sanguigne ⁶⁹ . Una certa tossicità si è notata anche ad elevate concentrazioni, ma in modo meno significativo rispetto ai nanotubi in carbonio ⁷⁰ .
	<i>Chitosano</i>	Non è chiaro il meccanismo di azione, ma si è visto che crea un legame con la parete cellulare batterica carica negativamente, provocandone la rottura, con effetti sulla permeabilità della membrana; inoltre inibisce la riproduzione del DNA, la crescita e infine ne causa la morte ⁷¹ .	In forma di nanoparticelle ha mostrato minori effetti citotossici, rispetto allo stato libero; in generale si ha bassa tossicità ⁷² .
Strategie		La presenza di nanopillar conferisce alla struttura delle proprietà battericide contro lo	

Commentato [FS1]: Sono antibatteriche o antiadesive?

Commentato [FS2]: Le topografie credo siano più antiadesive che antibatteriche, specificare.

fisiche (metodi biomimetici)	<i>Topografia ad ali di cicala</i>	Pseudomonas aeruginosa, efficace contro i batteri gram negativi, ma non contro i gram positivi, avendo questi una parete di peotidoglicani più spessa; se rivestito d'oro, ha un effetto contro la Saccharomyces cerevisiae ^{59,73} .	
	<i>Topografia ad ali di libellula</i>	La presenza di nanoprotusioni conferisce un'azione contro batteri gram positivi e gram negativi ⁵⁹ , deformando e penetrando gli strati esterni, ma non rompendoli; possono però inibire la divisione delle cellule batteriche e stimolare la produzione di specie reattive ⁷⁴ .	
	<i>Topografia a pelle di geco</i>	La conformazione ha effetto contro alcuni batteri Gram negativi (come lo Porphyromonas gingivalis) ⁵⁹ . In particolare le spinule presenti svolgono un'azione battericina al primo contatto e batteriostatica ^{75,76} .	
	<i>Pattern a nido d'ape (azione antiadesiva)</i>	Simulata in silicio, riduce l'adesione batterica ⁵⁹ . In uno studio si è visto che un pattern di 1microm riduce l'adesione e crescita batterica di colonie di E.coli e S. aureus; in particolare i fattori che incidono nel processo sono la presenza di siti di adesione favorevoli dal punto di vista energetico e i confinamenti fisici ⁷⁷ .	

Sono state provate anche strategie sinergiche, come un array di nano rods in ossido di zinco/poli dopamina/angina-glicina-acido aspartico-cisteina, i quali riescono a distruggere i batteri, mantenendo la loro citocompatibilità⁵⁹.

Sul chitosano sono stati fatti diversi studi: si tratta di un polimero semi naturale, derivante dalla chitina, la quale ha un elevato contenuto di azoto e viene ricavata dalle pareti cellulari di funghi e esoscheletri di crostacei e insetti. Il chitosano è ottenuto andando a modificare chimicamente la chitina, migliorandone le proprietà; quindi alla fine si ottiene un polimero biodegradabile, non tossico, biocompatibile, non allergenico e antimicrobico in forma di nanoparticelle, fibre, gel, membrane o spugne. La sua azione riguarda batteri gram positivi e negativi, funghi filamentosi e lieviti, colpendo la loro parete cellulare (rendendola più permeabile) e il DNA, agendo sulla viabilità dei biofilm. Tramite

questi rivestimenti si è vista un'azione antimicrobica, che fosse un impedimento alla loro adesione o rallentamento del metabolismo, migliorata di circa il 60% rispetto all'assenza di un coating, grazie ad un aumento dell'idrofilità della superficie (quindi della polarità) e della sua rugosità⁷⁸.

Sono stati provati anche degli approcci che prevedessero una funzionalizzazione tramite il carbossimetil chitosano o l'utilizzo in associazione con agenti antimicrobici o peptidi, aumentando e prolungando nel tempo le capacità antimicrobiche e antiadesive⁷⁹.

Recentemente sono stati valutati coating di probiotici, microorganismi non patogenici, i quali, se utilizzati nella giusta quantità e in modo controllato, possono avere proprietà benefiche; in particolare questi possono agire distruggendo il biofilm o impedendo l'adesione tramite esclusione con un coating o competizione, cioè una coltura in cui siano presenti sia i probiotici (e/o i suoi metaboliti) e l'agente patogeno. L'azione antibatterica è dovuta al rilascio di sostanze come acidi organici (lattico, acetico, propionico e succinico), acido solfidrico e perossido, etanolo, diossido di carbonio, EPS, batteriocine e biosurfattanti; questi ultimi, oltre i vari effetti che possono avere sulla membrana cellulare e citoplasmatica, possono influenzare l'espressione genica del biofilm e il suo rilascio di molecole di segnale nel quorum sensing⁸⁰.

I materiali biomedicali sui quali in questa sperimentazione ci siamo focalizzati sono il titanio (in particolare parliamo di ASTM F136 (Ti-6Al-4V)) e l'ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE).

2.1 Rivestimenti sul titanio

Materiale di interesse nel caso dei biomateriali, avendo ottime proprietà meccaniche, modulo di Young non troppo elevato (100-110 GPa), simile a quello dell'osso, che permette di ridurre il fenomeno dello stress-shielding e facilita il rimodellamento osseo, ~~come~~ ottima resistenza alla corrosione dovuta alla formazione di un sottile strato di ossido, e buona biocompatibilità, ~~e modulo di Young non troppo elevato (100-110 GPa), simile a quello dell'osso, creando quindi minor stress all'interfaccia e facilitando il rimodellamento osseo.~~



Figura 26: Titanio in campo biomedico

Le maggiori applicazioni del titanio le troviamo in campo ortopedico e in applicazioni dentali (Figura 26), in contesti in cui è richiesto un trasferimento di forze e una resistenza a fatica adeguati; una limitazione di questo materiale però è data dalle proprietà tribologiche, avendo un alto coefficiente di attrito, bassa durezza e formando usura adesiva; oltre a ciò il titanio non crea un legame chimico con l'osso, per questo si ricorre spesso a coating che facilitino l'osteointegrazione, come i rivestimenti in idrossiapatite tramite plasma spray⁸¹.

Un altro aspetto che si punta a migliorare è l'antibattericità ricorrendo a soluzioni che non prevedano l'utilizzo di antibiotici: è stato provato sui roditori un peptide antimicrobico (contro batteri gram positivi e gram negativi, anche alcuni resistenti a più farmaci come lo *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) sintetico e cationico, la melimine, funzionalizzato sul titanio e impiantato, che ha mostrato la capacità di ridurre la colonizzazione batterica nel giro di qualche giorno⁸²; anche per il titanio sono ampiamente utilizzate le nanoparticelle in argento, singolarmente o caricate nei rivestimenti, come nel caso in analisi di un film ibrido in chitosano-silicio, con buoni effetti antimicrobici⁸³. In un altro studio si è posto un coating composito di nanofibre in policaprolattone (PCL)/ idrossiapatite (IA) sulla superficie del Ti modificata tramite una soluzione piranha (miscela di acido solforico e perossido di idrogeno, per eliminare i composti organici e renderla idrofila), notando come svolgesse un'azione batteriostatica, mantenendo una certa citocompatibilità⁸⁴. Si è pensato anche di utilizzare su questo materiale il rame, per migliorarne le proprietà meccaniche, oltre a conferirgli proprietà antibatteriche: i problemi principali descritti in questo studio riguardano la tecnica da utilizzare per poter legare gli ioni di Cu, oltre alla potenziale tossicità della sostanza se al di sopra di una certa dose⁸⁵.

Ci sono ad oggi poche ricerche riguardo l'applicazione di oli essenziali per questo scopo sui materiali impiantabili, nella maggior parte dei quali si cercano di analizzare gli effetti della *Mentha piperita* e dei suoi componenti⁸⁶, come è stato fatto per il titanio, in un lavoro descritto successivamente.

Queste tecniche sono però ancora da perfezionare, dato che, ad esempio, nel coating spesso non si ha una distribuzione uniforme e non sempre si crea un legame forte con la superficie in metallo dell'impianto, mentre nel grafting/funzionalizzazione c'è poco controllo sul rilascio del farmaco, a meno che non si utilizzi un layer sensibile ad uno stimolo, che può essere una determinata corrente, un pH o temperatura, ma non di semplice attuazione. Un esempio di approccio di questo tipo molto recente (2021) è uno studio effettuato su un grafting costituito da un peptide, che permette di legare covalentemente la vancomicina e poi rilasciarla in presenza di un enzima prodotto dal batterio stesso che si vuole eliminare, lo *Staphylococcus aureus*⁸⁷.

2.2 Rivestimenti sull'UHMWPE

Il polietilene ad alto peso molecolare è un polimero con più di 200.000 unità ripetitive di etilene, con buone proprietà meccaniche come bassa frizione, alta resistenza agli urti, resistenza corrosiva e all'abrasione e buona biocompatibilità, ma con una durata finita data dall'usura per sfregamento con un materiale metallico e dai deterioramenti dei componenti in esso, difatti tende molto ad ossidarsi, soprattutto dopo alcuni metodi di sterilizzazione (come i raggi gamma).

È usato in particolar modo nelle protesi articolari (Figura 27, coppa acetabolare, piatto tibiale), ma anche come sostitutivi di dischi intervertebrali



Figura 27: UHMWPE in campo biomedico⁸⁸

Nel tempo sono stati valutati diversi metodi per migliorarne le proprietà, come la stabilizzazione tramite Vitamina E, per una miglior resistenza all'ossidazione⁸⁹; si vuole anche renderlo antibatterico con dei rivestimenti con materiali simili, in alcuni casi, a quelli precedentemente riportati, come il rame, il quale viene legato tramite la tecnica della deposizione chimica a vapore e, oltre ad aumentarne la robustezza, apporta un'azione battericida nei confronti dell'*Escherichia coli* e *S. aureus*⁹⁰.

Analogamente è stato posto l'argento con questa funzione tramite irradiazione ionica, ma sul polietilene ricoperto da uno strato di carbonio simile al diamante in modo da ottenere una superficie più resistente all'usura⁹¹.

In alcuni lavori è stato utilizzato il biossido di titanio TiO₂ (tramite irraggiamento laser con il metodo Laser Ion Source), avendo questo mostrato effetti antimicrobici quando eccitato dalla luce ultravioletta UV; si è cercato di espandere la risposta spettrale per avere un'attivazione anche alla luce visibile, con la quale quindi questo rivestimento crea un film di ossido, che limita e ostacola l'adesione batterica⁹². Anche l'utilizzo del Nylon 6,6 (una poliammide con buone proprietà termiche e forza meccanica) ha migliorato l'antibattericità dell'UHMWPE⁹³.

Su questo materiale è stato testato inoltre un precursore liquido della guanidina (un composto con forte alcalinità, data dall'ossidazione della guanina, depositato tramite deposizione chimica da vapore potenziata dal plasma a pressione atmosferica (APPECVD)) che ha mostrato anch'esso di essere un buon agente antimicrobico⁹⁴.

2.3 Coating con Oli Essenziali

A proposito dell'utilizzo degli EO a questo scopo, si sta già facendo qualche tentativo: ad esempio in uno studio si è cercato di analizzare l'effetto della Listerina (un composto degli oli essenziali con proprietà antisettiche) sulla morfologia e proliferazione delle cellule staminali, per un'applicazione sugli impianti dentali, dato che i metodi precedentemente utilizzati sono risultati tossici nei confronti delle cellule gengivali e ossee. Dall'analisi si è notato che le cellule risentissero in modo negativo della presenza di questo componente, ma si potrebbe pensare di ridurre la dose di Listerina usata o diluirla⁹⁵.

Per una futura applicazione sugli impianti, è stata analizzata l'applicazione di diversi oli essenziali (di citronella, basilico, rosmarino, eucalipto, tea tree, lavanda, chiodi di garofano e cannella) su una matrice di silice ibrida, funzionalizzata con gruppi metilici e preparata tramite il metodo del sol-gel, per ottenere un rilascio controllato: i migliori risultati (in quanto ad antibattericità e quantità di dose rilasciata, condizionata dalla polarità del substrato e quindi dai gruppi metilici) si sono osservati con l'EO di cannella⁹⁶. L'azione di quest'ultimo, unito al chitosano, è stata valutata in diverse concentrazioni su campioni in acciaio inossidabile utilizzati in impianti ortopedici, quando posto come coating: sono stati notati effetti di contrasto alla formazione del biofilm di Staphylococcus Epidermidis nel caso di concentrazioni più elevate⁹⁷.

In un altro studio effettuato sul cemento osseo in polimetilmetacrilato (PMMA), è stato testato come additivo antibatterico l'olio essenziale di menta incorporato in idrossiapatite, aggiungendolo nella

polvere iniziale del materiale, ottenendo buoni risultati nei confronti dello *Staphylococcus aureus* e lo *Pseudomonas aeruginosa*⁹⁸.

Inoltre in un precedente lavoro svolto al Politecnico di Torino, è stata valutata la capacità antibatterica dell'olio essenziale della *Mentha x piperita Luds*, una varietà di menta prodotta a Pancalieri, Piemonte, selezionata dopo un confronto con altri oli come quelli del *Thymus Vulgaris* e la *Lavandula Hybrid*, mostrando questa delle proprietà più pronunciate. La superficie del titanio è stata trattata chimicamente (tramite un etching in acido fluoridrico diluito e una riossidazione nell'acqua ossigenata, ottenendo una topografia porosa alla nanoscala e l'attivazione di gruppi OH), poi irradiata con radiazione ultravioletta e quindi si è passati sia alla funzionalizzazione tramite incubazione all'interno di una soluzione di etanolo e 50% di olio essenziale, che al coating, distribuendo una goccia di EO sulla superficie e poi polimerizzando. Si è notata, tramite analisi in gascromatografia-spettrometria di massa, la comparsa di componenti nuovi (dimostrazione della loro delicata stabilità), derivanti da alcuni presenti nell'EO. I risultati hanno mostrato che, soprattutto nel caso del coating, si ha una riduzione importante dell'adesione batterica, con un'azione batteriostatica più che battericida nei confronti dei batteri Gram-positivi, da parte dei fenoli e terpenoidi presenti. La menta legata al titanio tramite coating però è risultata citotossica, essendo presente una dose un po' più importante e per il tipo di molecole presenti⁹⁹.

Partendo da questi risultati, il presente lavoro si è concentrato sulla ricerca di un olio essenziale che avesse le stesse qualità della menta testata, conferisse maggiori proprietà al titanio da impiantare, ma che fosse meno tossico nei confronti delle cellule, da porre sia sul titanio (tramite funzionalizzazione e coating) che sull'UHMWPE (soaking a diverse concentrazioni).

3. Lubrificazione nelle articolazioni

Nelle articolazioni sinoviali (o diartrosi) è presente un lubrificante naturale, il liquido sinoviale, che si trova tra la membrana sinoviale, che lo produce tramite filtrazione del plasma¹⁰⁰, e la cartilagine articolare, riempiendo tale cavità (immagine esplicativa presente in Figura 28). Si tratta di un mezzo dal colore giallo e traslucido quando in ottime condizioni, con comportamento non-Newtoniano durante l'assottigliamento al taglio e una viscosità che cambia con la velocità di taglio.

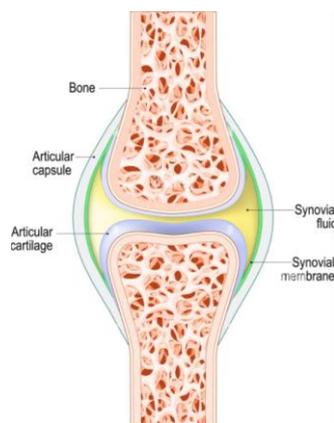


Figura 28: Liquido sinoviale nelle articolazioni¹⁰¹

Questo ha vari componenti, come l'acido ialuronico, proteine tensioattive (ad esempio i proteoglicani 4 o lubrificina), fosfolipidi tensioattivi, insieme ad altre proteine quali le sieralbumine e γ -globuline; ognuno di questi è fondamentale per la lubrificazione delle articolazioni e per il nutrimento dei tessuti non vascolarizzati. Soprattutto in base alla quantità di acido ialuronico presente (il più abbondante tra i componenti), il liquido sinoviale ha una viscosità diversa, che in condizioni normali risulta molto elevata, mentre si è notato che, in caso di patologie, questa tende a diminuire; per questo vengono effettuate iniezioni del glicosaminoglicano in questione per il trattamento del dolore al ginocchio dovuto all'osteoartrite. La lubrificina invece ha un ruolo fondamentale nella lubrificazione limite (insieme all'albumina e globulina) tra i giunti, riducendo il coefficiente di attrito (COF) di circa il 70%¹⁰².

Di norma la quantità di fluido e le cellule in esso sono ridotti, ma in condizioni patologiche si ha un aumento di entrambi.

In presenza di un impianto però il liquido sinoviale risulta in parte corrosivo, aumentando il rischio di adesione tra le superfici¹⁰³.

3.1 Meccanismi di lubrificazione

Le prove di lubrificazione e frizione tra superfici si basano sulla curva di Stribeck (Figura 30), nella quale vengono messi in relazione il coefficiente di attrito (COF), la viscosità del lubrificante (η), la forza applicata (FN) e la velocità di trascinamento (v), presentando tre zone corrispondenti a regimi diversi: la lubrificazione limite, la lubrificazione elastoidrodinamica/mista e la lubrificazione idrodinamica. Le tre regioni sono caratterizzate da un diverso valore del coefficiente λ , il quale è legato allo spessore h_{min} del fluido tra le due superfici e alle rugosità Ra delle stesse¹⁰⁴:

$$\lambda = \frac{h_{min}}{\sqrt{Ra_1^2 + Ra_2^2}}$$

in particolare, quando ho lo stesso materiale interfacciato e stessa rugosità, se h_{min} è molto sottile (quasi tendente a 0), siamo nella zona della lubrificazione limite; se invece è circa pari ad R, siamo nella lubrificazione elastoidrodinamica/mista e infine se h è molto più elevata di R, siamo in quella idrodinamica (figura 29), regione di lubrificazione completa, nella quale sarebbe preferibile lavorare per essere sicuri che non ci sia contatto tra le superfici¹⁰⁴.

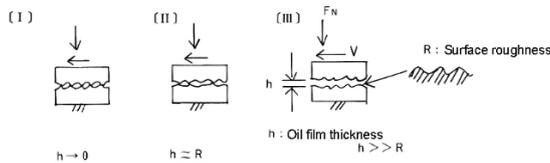


Figura 29: Condizioni di lubrificazione¹⁰⁴

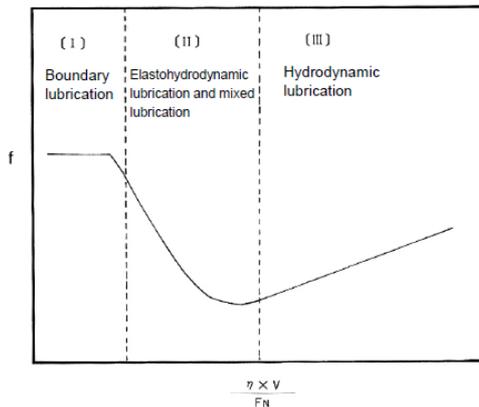


Figure 30: Curva di Stribeck, Regioni di lubrificazione¹⁰⁴

Il valore di h_{\min} a sua volta dipende dalla viscosità del lubrificante, la forza applicata, velocità di trascinamento, raggio e modulo di Young¹⁰³.

In genere i valori più elevati di COF si trovano nella prima regione, con bassa velocità di trascinamento, bassa viscosità e elevate forze e, come detto, in questa situazione contribuiscono a ridurre la frizione le albumine, globuline e lubricina¹⁰⁵ nella maggior parte dei casi, ma non sempre questo si verifica, dato che in uno studio è stato visto come ci fosse un aumento del COF aggiungendo l'albumina del siero bovino (BSA) al tampone fosfato salino¹⁰⁶.

Qui possiamo avere 4 tipi di usura, che spesso compaiono insieme: adesiva, abrasiva, da fatica superficiale o chimica. I fattori che influenzano ed intervengono in questo caso sono diversi, dal materiale delle superfici a contatto, al tipo di lubrificante o alla sua temperatura.

Lo strato più spesso che si va a creare nella terza zona idrodinamica si pensa che sia dovuto al fatto che, in presenza di elevate pressioni, la viscosità del lubrificante aumenti.

3.2 Proprietà e additivi

Un buon lubrificante deve avere un grado di viscosità adeguato, in quanto se troppo elevata può aumentare la temperatura e la resistenza, se troppo bassa favorisce l'attrito tra le parti a contatto. L'indice di viscosità va ad indicare come cambia questa in base alla temperatura: si vorrebbe fosse alto, ad indicare una ridotta variazione, per essere certi di poterli usare in un ampio range di temperature. Il punto di infiammabilità deve essere alto, ad indicare una bassa volatilità del lubrificante e una certa sicurezza durante l'uso; deve avere delle buone proprietà a basse temperature, come un basso punto di scorrimento (temperatura alla quale diventa semi-solido e perde le caratteristiche di flusso), dato che, in caso contrario, si hanno situazioni di attrito e usura. La stabilità all'ossidazione è un criterio importante, in modo da non avere casi di addensamento e polimerizzazione del lubrificante.

3.3 Lubrificanti a base vegetale in campo industriale

La ricerca di lubrificanti biologici suscita sempre più interesse, soprattutto in contesti nei quali si ha a che fare con materiali dannosi e non rinnovabili, considerando che una gran parte di questi ogni anno viene dispersa nell'ambiente. Si parla quindi di "lubrificanti a base biologica" o "bio-lubrificanti", riferendosi a prodotti come oli vegetali, grassi animali o qualsiasi idrocarburo rispettoso dell'ambiente, rinnovabile, biodegradabile e, allo stesso tempo, con buone proprietà quali lubricità, alto punto di infiammabilità (avendo una bassa pressione di vapore e volatilità, quindi è ridotto il rischio di incendio durante l'uso), alto potere isolante, alto indice di viscosità e buona resistenza al taglio. Questi prodotti detti oleochimici, vengono poi scomposti in acqua e diossido di carbonio in un ciclo chiuso (Figura

31), in quanto la quantità di quest'ultimo rilasciata è pari a quella prelevata da parte delle piante dall'atmosfera¹⁰⁷.

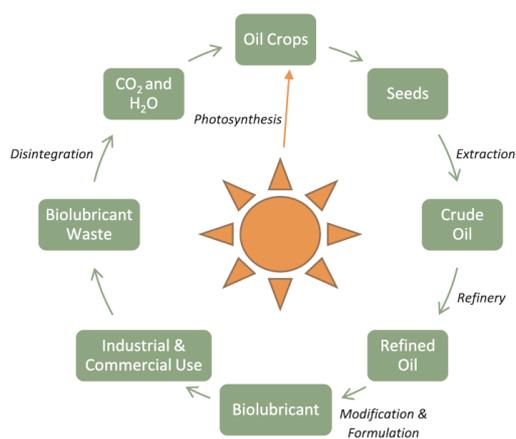


Figura 31: Ciclo di vita di un lubrificante vegetale¹⁰⁹

I lubrificanti biodegradabili a base oleosa sono di 5 tipi: oli vegetali con molti doppi legami o altamente oleici (HOVOs); polialfaolefine a bassa viscosità; glicoli polialchilenici; esteri dibasici; oli poliesteri.

Gli oli vegetali sono costituiti da trigliceridi, le cui lunghe catene di acidi grassi si legano bene con le superfici metalliche, tramite i gruppi polari (glicerolo), favorendo la formazione di forti monolayer durante la lubrificazione limite e riducendo sia la frizione che l'usura. Si è notato inoltre in diversi studi l'esistenza di una forte correlazione tra la forza di **-attrito** presente tra due superfici e la quantità di acidi grassi insaturi presenti nell'olio, quindi la percentuale di acido oleico o linoleico (in rapporto inversamente proporzionale); è importante perciò il numero di doppi legami presenti, in quanto all'aumentare di questi, aumenta la forza di **frizione-attrito** e diminuisce la viscosità¹⁰⁹, ostacolando le catene dei trigliceridi nel formare uno strato protettivo sulla superficie e favorendo inoltre comportamenti ossidativi dell'olio. La struttura di questi trigliceridi, le interazioni intermolecolari casuali e la lunghezza delle catene di acidi grassi, influenza perciò sia il grado di viscosità che la stabilità in un range di temperature (uno schema riassuntivo è presente in Tabella 5)¹⁰⁷.

Tabella 5: Correlazione tra lo stato della catena e le proprietà¹⁰⁸

	Viscosity index	Kinematic viscosity	Low temperature properties	Oxidation stability
Increase of chain length	Positive	Positive	-	-
Increase of chain branching	Negative	Negative	Positive	Positive
Higher degree of unsaturation	Positive	Negative	Positive	Negative

Alcuni oli vegetali più comuni, con la loro composizione di acidi grassi, sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6: Oli vegetali¹¹⁰

	Saturated fatty acids (%)								Unsaturated fatty acids (%)											
	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C20:0	C22:0	C24:0	C16:1	C17:1	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	C20:2	C22:1	C22:2	C24:1	
Safflower	-	-	-	0.10	6.70	2.40	-	-	-	0.08	-	11.50	79.00	0.15	-	-	-	-	-	-
Grapeseed	0.01	-	0.01	0.05	6.60	2.40	-	-	-	0.08	-	14.30	74.70	0.15	0.40	-	-	-	-	-
Silybum marianum	-	-	0.01	0.09	7.90	4.50	2.60	-	-	0.05	0.03	20.4	63.3	0.88	0.15	-	-	-	-	-
Hemp	-	-	-	0.07	6.40	2.60	-	-	-	0.11	-	11.50	59.4	3.36	16.5	-	-	-	-	-
Sunflower	-	-	0.02	0.09	6.20	2.80	0.21	-	0.31	0.12	-	28.0	62.2	0.16	0.18	0.09	-	-	-	0.39
Wheat germ	-	-	0.07	-	17.40	0.70	-	-	-	0.21	-	12.70	59.7	1.20	7.91	-	-	-	-	-
Pumpkin seed	-	-	-	0.17	13.10	5.70	0.47	-	-	0.12	-	24.90	54.2	0.12	1.08	-	-	-	-	-
Sesame	-	-	-	-	9.70	6.50	0.63	0.14	-	0.11	-	41.5	40.9	0.21	0.32	-	-	-	-	-
Rice bran	-	-	-	0.39	20.0	2.10	-	-	-	0.19	-	42.70	33.1	0.45	1.11	0.11	-	-	-	0.38
Almond	-	-	0.09	0.07	6.80	2.30	0.09	-	-	0.53	-	67.2	22.8	-	0.16	-	-	-	-	-
Rapeseed	-	0.01	-	-	4.60	1.70	-	-	-	0.21	-	64.7	19.60	1.20	9.10	-	-	-	-	-
Peanut	-	-	-	0.04	7.50	2.10	1.01	-	1.66	0.07	-	71.1	18.20	-	-	-	0.12	-	-	-
Olive	-	-	-	-	16.50	2.30	0.43	0.15	0.06	1.80	-	66.4	16.40	1.60	0.30	-	-	-	-	0.05
Extra virgin olive	-	-	-	-	8.70	3.47	0.46	0.13	0.05	0.51	0.25	76.34	8.64	0.75	0.34	-	-	-	-	0.19
Coconut	7.60	5.50	47.70	19.90	-	2.70	-	-	-	-	-	6.20	1.60	-	-	-	-	-	-	-
Borage seed	-	-	-	0.06	8.75	3.46	0.22	0.30	0.11	0.29	0.07	16.52	38.47	22.97	4.05	0.35	2.23	-	-	2.09
Canola	-	-	-	0.06	3.75	1.87	0.64	0.35	0.27	0.21	-	62.41	20.12	8.37	1.54	0.11	-	-	-	0.26
Corn	-	-	-	-	10.34	2.04	0.44	0.31	0.26	-	0.05	24.23	60.38	0.99	0.28	-	-	-	-	0.20
Cottonseed	-	-	-	0.77	21.87	2.27	0.26	0.36	0.12	0.47	0.11	16.61	56.35	0.33	0.14	0.10	-	-	-	0.16
Evening-primrose	-	-	-	0.04	5.47	1.83	0.30	0.31	0.09	-	0.06	7.50	74.00	9.76	0.24	0.14	-	-	-	0.19
Linseed	-	-	-	0.05	4.81	3.03	0.20	-	0.01	-	0.12	21.42	15.18	54.24	0.40	0.39	-	-	-	0.10
Soybean	-	-	-	0.06	9.90	3.94	0.41	0.48	0.21	0.08	0.08	21.35	56.02	7.15	0.22	-	-	-	-	-
Palm	-	-	-	1.12	42.70	4.55	0.39	0.58	0.06	-	0.06	39.37	10.62	0.21	0.17	-	-	-	-	0.06
Palm kernel	3.43	3.23	46.14	16.17	8.65	2.27	0.15	-	0.30	-	-	16.46	2.76	-	0.17	-	-	-	-	0.27
Castor bean	-	-	-	-	1.30	1.20	-	-	-	-	-	89.70	7.30	0.50	-	-	-	-	-	-

Nel settore industriale e dei trasporti è molto utilizzato come biodiesel l'olio di girasole, essendo meno costoso dell'olio di oliva; ha un elevato contenuto di acidi grassi monoinsaturi (detto in tal caso "alto oleico"), che gli conferisce buona stabilità ossidativa e lubrificità. L'olio di colza ha invece elevati livelli di acido erucico, usato inizialmente come lubrificante per i motori a vapore; tra i costituenti che aiutano nella lubrificazione abbiamo acidi grassi liberi, fosfatidi, enzimi e glucosinolati. Nel caso dell'olio dei semi di soia, questo è stato usato soprattutto per scopi isolanti, in quanto, se aggiunto nei liquidi dielettrici per i trasformatori, aumenta il punto di infiammabilità e la durata di questi, oltre che come fluido idraulico. L'olio di palma è usato molto come additivo o come lubrificante nell'estrusione a freddo o nella lubrificazione minimale; l'olio di cocco è ricco di acidi grassi saturi, motivo per cui non si ossida facilmente, migliora il funzionamento del motore e produce meno fumo quando bruciato; l'olio di Jatropha, usato anch'esso come biodiesel, con un elevato contenuto di acidi grassi, così come l'olio vegetale di Tamanu (Calophyllum inophyllum L.). L'olio di ricino o castor oil, ricco in acido ricinoleico, ha una buona viscosità a basse temperature e proprietà lubrificanti ad elevate temperature, oltre ad essere solubile in alcol, ma limitata in solventi petroliferi alifatici; l'olio di Karanja è ricco in acido oleico ed è molto usato come carburante in India e nelle regioni limitrofe¹⁰⁸.

Malgrado tutto questo il loro utilizzo non è ancora così diffuso dato che, in alcuni casi, la qualità del prodotto non è la stessa di quello a base minerale, avendo minore stabilità ossidativa, idrolitica (tendendo a creare più schiume), denaturandosi con temperature elevate mentre con quelle troppo basse si ha un alto punto di scorrimento (temperatura alla quale il prodotto smette di fluire) e punto di intorbidimento (temperatura alla quale inizia a diventare più torbido per processi di cristallizzazione), non si riesce a produrne in scala industriale e non viene dato loro il giusto valore da parte delle autorità¹⁰⁸. Alcuni di questi difetti possono però essere ridotti, tramite modifiche chimiche, l'aggiunta di additivi (antiossidanti o depressori del punto di scorrimento, che costituiscono circa il 5% del peso dell'olio) o l'emulsificazione, in modo da ridurre o eliminare gli atomi di β -idrogeno nel glicerolo. E' proprio la presenza di doppi legami a causare l'ossidazione dell'olio, essendo suscettibili e reattivi all'ossigeno atmosferico. Quindi i principali fattori che influenzano le proprietà tribologiche degli oli vegetali sono la lunghezza della catena di carbonio, il tipo di acidi grassi e la polarità. Nell'aggiunta del giusto additivo, è importante considerare la presenza di molecole di ossigeno o azoto, che potrebbero competere con la polarità del lubrificante ed andare ad interferire con l'abilità dei componenti dell'olio di legarsi alla superficie metallica¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

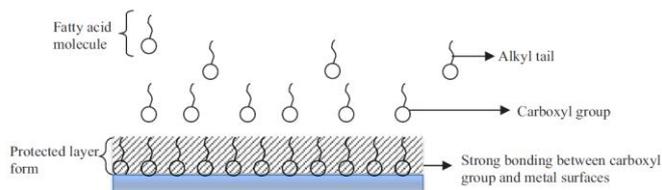


Figura 32: Strato protettivo sulle superfici metalliche¹⁰⁸

In Tabella 7 vengono riassunti i vantaggi e svantaggi nell'utilizzo degli oli vegetali come biodiesel:

Commentato [FS8]: Specificare in quale applicazione

Tabella 7: Vantaggi e svantaggi degli oli vegetali

<i>Vantaggi</i>	<i>Svantaggi</i>
Indice di viscosità molto alto	Bassa stabilità ossidativa
Buona stabilità termica	Bassa stabilità idrolitica
Alto punto d'infiammabilità	Bassa stabilità ad elevate temperature
Buona miscibilità con altri lubrificanti a base fluida e solventi	Scarse proprietà di scorrimento a freddo
Buona biodegradabilità e bassa tossicità	Scarso punto di intorbidimento
Ottimi solventi	
Capacità di carico	

Proprietà anti usura	
Rinnovabilità	

3.4 Modifiche chimiche

Con le diverse tecniche che andremo a vedere, si cerca di ridurre il numero di doppi legami presenti (anche se un certo livello di legami insaturi è necessario, per mantenere le proprietà dell'olio alle basse temperature) e di gruppi β -CH, che favoriscono l'instabilità del lubrificante.

Transesterificazione/Esterificazione

Reazione con la quale in genere si ottengono i biodisel: si utilizza un reagente alcolico e un catalizzatore, per ottenere la rottura delle molecole dei trigliceridi, quindi glicerolo e acidi grassi esteri metilici. Nel caso della transesterificazione il glicerolo poi è sostituito dal poliolo, che non contiene atomi di idrogeno in posizione β , migliorando la stabilità termica ad elevate temperature e riducendo la volatilità. Lo svantaggio del procedimento è dato dal limite di applicazione su un olio ad alto contenuto di acido oleico e dalla necessità di temperature elevate¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁻¹¹¹.

Idrogenazione

Processo tramite il quale si aggiunge un atomo di idrogeno ai legami doppi C=C nei trigliceridi, utilizzando un catalizzatore che vada a ridurre la quantità di acido linolenico, prima di quello linoleico e oleico e che non conduca alla completa saturazione dell'olio. Sono richieste pressioni e temperature molto alte¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁻¹¹¹.

Eossidazione

Reazione che converte il doppio legame C=C in epossidi tramite acidi perossidici. Si è visto che alcuni oli come l'olio di colza epossidato, mostra migliori capacità di riduzione della frizione e di pressioni estreme; richiede pressioni e temperature più basse, ma può portare ad un innalzamento del punto di scorrimento e diminuzione della viscosità¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁻¹¹¹.

3.5 Lubrificanti nelle protesi

I materiali principalmente usati in caso di protesi articolari sono: ultra-high molecular weight (UHMWPE) o highly cross-linked polyethylene (HXLPE), titanio, leghe metalliche (CoCrMo) o acciaio inossidabile; nel caso della testa del femore si usa spesso la ceramica, quindi zirconia o allumina¹¹².

Tra questi i materiali **polimerici** sono solitamente utilizzati per la buona flessibilità, stabilità e basso attrito; il **titanio** è impiegato nella sostituzione di ossa sottoposte ad elevati carichi¹¹³ e presenta ha

Commentato [FS9]: Per quali applicazioni vengono utilizzate, specificare

una buona resistenza specifica ($\frac{\text{resistenza}}{\text{densità}}$) e alla corrosione, rari problemi allergici e una buona biocompatibilità se confrontato con altri biomateriali metallici¹¹⁴ e la ceramica è in genere usata per l'elevata durezza, resistenza alla corrosione, stabilità chimica e biocompatibilità¹¹⁵. Malgrado ciò, non sono pochi i casi di fallimento della protesi dovuto alla formazione di usura, quindi con conseguente infiammazione e riassorbimento osseo e legato ad una condizione di eccessivo attrito e scarsa lubrificazione; questo avviene soprattutto nel caso di impianti che devono avere una resistenza per un tempo più lungo, come in pazienti giovani e attivi, per i quali sarebbero necessari materiali e condizioni più performanti.

Un modo per simulare il liquido sinoviale durante le prove è tramite l'utilizzo del siero bovino/vitello, soluzione di Ringer, acqua distillata, lecitina fosfolipidica o usando la Mucina III; risulta molto complicato ottenere una completa mimica del fluido, essendo presenti vari componenti con funzioni fondamentali dal punto di vista tribologico, ma soprattutto riuscire a comprendere i diversi meccanismi che intervengono durante una variazione costante di forze e velocità; oltre a ciò c'è una carenza di parametri standard per i test tramite simulatori e ogni combinazione di materiali che si interfacciano ha un modo differente di reagire in presenza di un lubrificante¹¹⁶.

In Figura 33 è rappresentato l'uso dei diversi lubrificanti nei test tribologici nell'ultimo decennio:

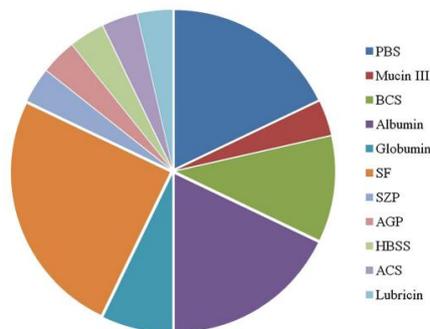


Figure 33: Uso dei differenti lubrificanti nei test tribologici¹¹⁷

Nel caso del UHMWPE, il più utilizzato è in genere il siero, avendo dato risultati molto simili ad evidenze cliniche; il liquido sinoviale in sé non va bene per lubrificare questo materiale, dato che si è visto come la concentrazione di proteine al suo interno porti ad aumentare lo stato di usura e il coefficiente di attrito, dovuto all'adsorbimento (ad esempio dell'albumina, che si lega bene con le superfici idrofobiche) alla denaturazione e precipitazione di queste, i fosfolipidi presenti hanno lo stesso effetto per la diffusione che avviene nel polimero e l'azione plasticizzante su questo, riducendone il modulo elastico e la resistenza¹¹⁸; inoltre la natura idrofobica del materiale neutralizza in parte l'efficienza del fluido¹¹⁶. In alcuni studi sono stati confrontati diversi fluidi pseudo-sinoviali

(PSF) nei test di usura, come l'acqua deionizzata, olio minerale, soluzioni di gelatina, soluzione salina fisiologica, liquido sinoviale bovino, siero bovino, plasma e lubrificanti artificiali, riportando questi risultati¹¹⁶:

- Nel caso dell'acqua distillata e della soluzione salina (come quella di Ringer) si è osservato come in sua presenza ci fosse un trasferimento di polietilene dai campioni alla sferetta metallica del tribometro, creando un'usura importante, millimetrica, con forma differente da ciò che si è notato nel caso di protesi revisionate;
- Il liquido sinoviale bovino richiede troppo tempo per ottenerlo, dopo diversi processi di filtrazione e decellularizzazione;
- usando il siero bovino si è notata la formazione di particelle di usura simili a quelle viste in vivo (dimensioni submicrometriche e di forma allungata o arrotondata), ma risulta costoso, si degrada facilmente, se non con l'aggiunta di antibatterici come l'azoturo di sodio o penicillina, viene facilmente contaminato da batteri ed ha un comportamento Newtoniano, con viscosità bassa. Non è chiaro quale sia la giusta concentrazione proteica da usare: generalmente è pari a 20-35mg/mL, essendo la stessa ritrovata nel liquido sinoviale, ma sembra che non sia ottimale per l'UHMWPE e dovrebbe essere aumentata, anche se una concentrazione troppo elevata potrebbe denaturarle e causare una precipitazione di queste, la quale produce un effetto di lubrificazione limite che protegge in modo non fisiologico dall'usura. Oltre a questa concentrazione, ci sono diversi parametri durante i test tribologici che causano questo evento: temperatura al di sopra dei 60°C, diminuzione del volume del lubrificante presente, aumento di frequenza di rotazione, dimensione dell'albumina e gamma-globuline da 0.8 a 4, rugosità della superficie metallica;
- La soluzione proteica a base di gelatina, chiamata Gelofusine, ha mostrato una buona resistenza all'attacco batterico e l'usura che si crea è simile a quella riscontrata nel siero bovino, ma con particelle più grandi; un altro fluido sintetico del genere è chiamato Plasmion, ma il tipo di usura riscontrata è simile a quella vista nel caso dell'acqua¹¹⁶.

In un altro studio si è andato a valutare l'effetto della composizione del liquido usato, sul coefficiente di attrito statico e dinamico tra l'UHMWPE e il CoCrMo, notando che il liquido sinoviale umano agisce in modo diverso tra soggetto e soggetto, contribuendo al fallimento delle protesi¹¹⁹. La presenza dell'albumina contribuisce a ridurre il trasferimento di materiale polimerico durante la lubrificazione limite, mentre la globulina blocca la rimozione di ioni metallici dalle superfici dei materiali presenti in un'articolazione protesica¹¹⁷.

3.5.1 Lubrificanti vegetali in campo medicale

In questo campo troviamo, negli ultimi anni, alcune prime applicazioni dei super lubrificanti o biolubrificanti (utilizzati nei test tribologici, ma non come rivestimenti), come nel caso del polisaccaride estratto da una *microalga rossa*, il quale ha suscitato interesse per le ottime proprietà reologiche (una viscosità stabile a diverse temperature, valori di pH e salinità) e nei test di confronto con l'acido ialuronico ha dimostrato di ridurre maggiormente il coefficiente di attrito e l'usura e di creare una traccia meno profonda sull'UHMWPE¹²⁰. È stato svolto anche un lavoro sulla mucillagine *Brasenia schreberi*, analizzando le sue proprietà lubrificanti quando posto tra due substrati in vetro e ricavando un COF molto basso¹²¹, ed uno su un gel ricavato dai *semi di basilico*, costituito prevalentemente da acqua e polisaccaridi, il quale ha mostrato valori molto bassi di coefficiente di attrito nelle misure statiche, così come nel caso di superfici scorrevoli, ma con l'aggiunta di etanolo¹²².

In un altro caso invece sono state valutate le caratteristiche tribologiche della mucillagine di Aloe, osservando una riduzione del COF in caso di aumento di velocità e pochi cambiamenti nel caso di aumento del carico applicato¹²³.

In confronto alla soluzione PBS, di Ringer e acqua distillata, l'*olio di sesamo* risulta avere migliori coefficienti di attrito e di usura, così come l'*olio di oliva*; l'utilizzo dell'*olio di Nigella sativa* (o cumino nero) nei test tribologici tra l'HDPE (polietilene ad alto peso molecolare) e M30NW (acciaio inossidabile) ha ridotto del 70% il COF rispetto alla soluzione salina¹²⁴.

3.6 Oli essenziali come lubrificanti

Ci sono pochi studi riguardo l'utilizzo di oli essenziali a questo scopo, soprattutto perché si tratta di composti volatili, il cui costo dal punto di vista economico è ancora considerevole, se comparato a quello degli oli vegetali visti nel paragrafo precedente; questo però non esclude il fatto di poterli utilizzare come additivi, sfruttando le loro proprietà.

Un esempio riguarda la valutazione tribologica di 9 oli essenziali (olio di nocciolo di pesca, di semi d'uva, di pino, di semi di carota, di camomilla, di alloro, di eucalipto, di lavanda e olio di rosmarino) in confronto a quella del diesel a basso contenuto di zolfo; questo combustibile infatti, oltre ad avere un forte impatto ambientale, ha basse proprietà lubrificanti, soprattutto se costituito da una percentuale non bassa di zolfo, il quale ostacola la formazione di un layer protettivo da parte dei componenti polari, come l'ossigeno contenuto negli oli, in composti fenolici o carbossilici. Usando quindi questi EO come additivi nel diesel (con una certa concentrazione) si è visto in che 5 casi su 9 la quantità di usura prodotta si va ridurre e nel complesso tutti migliorano le prestazioni lubrificanti¹²⁵.

In un secondo studio è stato valutato l'effetto su una superficie in ferro della presenza di una certa concentrazione di olio essenziale di *Thymus zygis* in un ambiente tribocorrosivo, in cui cioè è presente l'acido solforico; si è visto come la sua aggiunta conferisca maggiore lubrificazione, riducendo il valore del coefficiente di attrito e dell'energia dissipata¹²⁶.

Nel campo biomedicale non sono stati fatti invece alcuni studi riguardo questa ulteriore proprietà che potrebbero conferire gli EO alle superfici scorrevoli, come nel caso delle protesi articolari.

4. Materiali e metodi

4.1 Preparazione dei campioni

Tramite una troncattrice automatica sono stati ricavati dei campioni in lega di Titanio (Ti6Al4V) della dimensione di 10 mm di diametro e circa 2 mm di spessore e diversi pezzi di polietilene ad alto peso molecolare (UHMWPE), alcuni di dimensioni più piccole per le analisi da effettuare, altri a forma di dischi spessi 5mm e con diametro di 29-33mm per le prove tribologiche. Questi sono stati lucidati su di un lato con della carta abrasiva al carburo di silicio SiC di diversa grana (da 120 a 4000); la lucidatrice utilizzata è di tipo Struers "LaboPol-2" (Figura 34).



Figura 34: Lucidatrice Struers "LaboPol-2"

Nel caso della lucidatura del Ti, i dischetti sono stati posti in un porta-campioni e bloccati tramite colla, che poi, una volta terminato, è stata rimossa attraverso l'immersione in acetone e il bagno ad ultrasuoni (SONICA, Soltec S.r.l) per 5 minuti, a temperatura ambiente; dopodiché sono stati sciacquati in un beaker con acqua ultrapura e nuovamente ultrasuoni per 5 minuti. Infine lavati, per rimuovere ogni residuo e contaminazione, con etanolo e acqua distillata due volte, sempre tramite gli ultrasuoni; questi infatti permettono una pulizia più approfondita, attraverso agitazione dei liquidi che crea delle forze elevate e delle bolle a bassa pressione, raggiungendo ogni punto sulla superficie. Quindi i campioni vengono posti sotto cappa a flusso laminare per l'asciugatura e in seguito in una piastra di Petri per i trattamenti successivi.

Simile procedimento è stato seguito nel caso dei campioni in UHMWPE (Figura 35), con un lavaggio finale in etanolo e acqua ultrapura e bagno i ultrasuoni; la superficie di questo materiale però non risulta perfettamente liscia e specchiata, date le sue proprietà (termoplastico, molto duttile).



Figura 35: Campioni in Titanio e UHMWPE lucidati e lavati

4.1.1 Olio essenziale di *Mentha* e metodo di estrazione

L'olio essenziale di *Mentha di Pancalieri* è stato fornito dall'Azienda Agricola Chialva, che ha sede a Pancalieri (To).

L'EO greggio è ottenuto tramite il processo di distillazione in corrente di vapore: in alambicchi di metallo viene posto il materiale vegetale (nel periodo tra luglio e agosto) e, con il passaggio del vapore ottenuto con l'ebollizione dell'acqua, si ha la fuoriuscita dell'essenza. Quindi il vapore acqueo e questi componenti volatili della pianta passano in una serpentina raffreddata, tramite la quale tornano allo stato liquido e si separano nel vaso fiorentino per differenza di peso specifico. Raccolto l'olio essenziale, questo viene poi conservato in fusti ben sigillati, in modo da ridurre la possibile degradazione per ossidazione. In questo caso, dato l'impiego di questo EO nell'industria dolciaria, liquoristica e farmaceutica, subisce un ulteriore trattamento di ridistillazione sottovuoto a bassa temperatura, nel quale vengono ridotti alcuni componenti quali terpeni di testa tipo α - e β -pinene, camphene, myrcene, limonene, terpeni di coda come germacrene-D, bourbonene, oltre a viridiflorol e alcune cere (idrocarburi ad alto peso molecolare). L'EO finale, secondo quanto descritto dai produttori, si presenta come "un liquido mobile, incolore, dal profumo mentolato intenso, fine e delicato".

4.2 Trattamento superficiale

4.2.1 Plasma atmosferico

Per una maggiore decontaminazione e attivazione superficiale, sono stati trattati al plasma atmosferico (Figura 36, sistema Tucano, GAMBETTI KENOLOGIA SRL) sia i campioni in UHMWPE che quelli in titanio.



Figura 36: Tucano plasma a bassa pressione

Con plasma si intende lo stato (quarto stato della materia) che raggiungono le molecole di un gas ad una determinata energia, in cui risultano ionizzate (quindi un insieme di elettroni e ioni) e influenzano le caratteristiche elettriche complessive, risultando globalmente nullo. I componenti presenti all'interno del gas possono essere di diverso tipo e, avendo elevata energia, interagiscono con la superficie che si sta trattando: risulta quindi importante scegliere il tipo di gas da utilizzare nel trattamento, oltre a temperatura e pressione¹²⁷⁻¹²⁸⁻¹²⁹,

Nel nostro caso il gas che si è deciso di utilizzare è l'aria, ad una pressione minima di $4.1 \cdot 10^{-2}$, per 10 minuti e con una potenza di 100 W. Il funzionamento del dispositivo consiste in un primo istante in cui viene creato il vuoto nella camera e successivamente è fatto fluire il gas. La formazione del plasma risulta evidente dalla colorazione rosa che assume la camera (come si vede in Figura 37), dovuta all'emissione caratteristica del gas di atomi, ioni o molecole eccitati energeticamente. In questo caso il colore è dovuto alla presenza di idrogeno e azoto.



Figura 37: Attivazione del plasma in camera

4.2.2 Funzionalizzazione, coating e soaking

È stato eseguito il trattamento di soaking per l'UHMWPE, di funzionalizzazione e coating nel caso del titanio; quindi sono state preparate nelle prime verifiche, tramite pipetta (100 -1000 μ l), alcune fiale con diverse concentrazioni dell'olio essenziale di Mentha di Pancalieri:

- Una con 1ml di olio, per il soaking dell'UHMWPE al 100%;
- Due con 500 μ l di olio e 500 μ l di etanolo, per il soaking dell'UHMWPE e funzionalizzazione del titanio al 50%;
- Una con 200 μ l di olio e 800 μ l di etanolo, per il soaking dell'UHMWPE a 20%;

oltre ad una piastra di Petri per il coating del titanio; i campioni in UHMWPE considerati, sono quelli di dimensione più piccola. Subito dopo il trattamento al plasma i rispettivi campioni sono stati posti nelle fiale e un disco di titanio dentro la piastra, andando poi a distribuire bene sulla superficie, con una pipetta (da 5-50 μ l), 20 μ l di olio.

In un secondo momento, successivamente ai primi risultati ottenuti, si è deciso di procedere unicamente con il trattamento di soaking dell'UHMWPE al 100%, sia nel caso dei pezzi di dimensione minore che dei dischi.

Tutti i contenitori sono stati ricoperti da un foglio di alluminio, essendo l'EO soggetto a degradazione se esposto per lungo tempo alla luce, e posti in incubatore per 48h a 37°C.

Trascorso il tempo necessario, i campioni in UHMWPE e il titanio nella piastra sono stati lavati con immersione veloce in acqua ultrapura, mentre nel caso del titanio funzionalizzato al 50%, questo è stato prima sciacquato con dell'etanolo, per la rimozione dell'eccesso di EO non legato, e poi anch'esso in acqua ultrapura. L'asciugatura è avvenuta sotto cappa a flusso laminare, a temperatura ambiente.

4.3 Misure dell'angolo di contatto

La bagnabilità dei campioni e la sua variazione tra quelli trattati e non è stata valutata tramite la misura dell'angolo di contatto con il "metodo della goccia sessile" di acqua ultrapura (5 μ l) posta sulla superficie con una micropipetta. Il sistema (Figura 38, Kruss, Drop Shape Analyzer 100 E) è costituito da un supporto per il campione, una sorgente luminosa e un sistema di acquisizione dell'immagine, che viene poi elaborata tramite software (Drop Shape Analysis), il quale restituisce la misura dell'angolo.

Per ogni campione si è cercato di ottenere almeno due misurazioni.



Figura 38: Drop Shape Analyzer 100 E, Krüss

4.4 Analisi al SEM

Per valutare a questo punto la presenza o meno dell'olio e la sua distribuzione al di sopra dei campioni in titanio, è stata effettuata un'analisi con il Microscopio elettronico a scansione (Figura 39, Jeol JCM-6000Plus).



Figura 39: Scanning Electron Microscope Jeol JCM-6000Plus

Il funzionamento del dispositivo si basa su un fascio di elettroni primari generato da una sorgente (Gun) tramite estrazione di elettroni, che, tramite una colonna di lenti che lo gestisce, arriva sul campione e interagisce con gli atomi presenti sulla superficie; si genera in questo modo un segnale che viene ricevuto da un detector, il quale crea immagini in 2-D dettagliate e con risoluzioni in alcuni casi a livello atomico, oltre ad effettuare un'analisi composizionale (Figura 40). All'interno della camera viene generato inizialmente il vuoto, per ridurre l'interferenza di altri atomi con il fascio di elettroni o con i segnali emessi; questi ultimi possono essere di diverso tipo, in base alla profondità di

interazione: elettroni secondari (che producono l'immagine) con energia minore, di pochi eV, elettroni retrodiffusi a maggiore energia, nel range tra 1keV e 50keV (che danno informazioni anche sulla composizione chimica) e Raggi X¹³⁰⁻¹³¹⁻¹³².

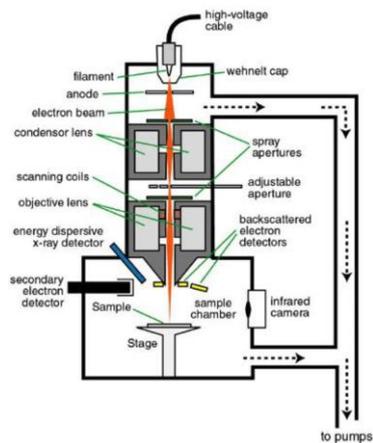


Figura 40: Scema del SEM¹³³

Le analisi in microscopia sono state effettuate sul campione di titanio lavato, su quello funzionalizzato e quello rivestito; di ognuno sono state prese tre misure, ottenendo un'immagine e un'analisi elementare.

4.5 Analisi FTIR-ATR

Un'altra analisi per valutare la presenza dell'olio è stata effettuata tramite la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)(Figura 41, Spettrometro Nicolet™ iS50 FTIR), che permette inoltre di identificare il tipo di legame formatosi.



Figure 41: Spettrometro Nicolet™ iS50 FTIR

Si basa sull'assorbimento a frequenze specifiche da parte delle molecole sulla superficie del campione, nel momento in cui sono esposte alla radiazione IR; queste frequenze dipendono dal livello energetico vibrazionale dei legami tra gli atomi presenti in tali molecole. Quindi le diverse molecole hanno picchi di assorbimento a differenti lunghezze d'onda¹³⁴. Un esempio di spettro FTIR in trasmittanza è presente in Figura 42, in cui sono indicati i legami ai quali corrispondono i picchi:

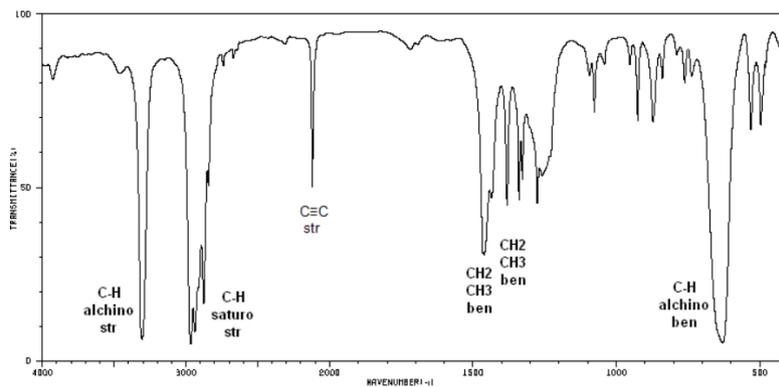


Figura 42: Esempio di spettro FTIR (1-pentino)¹³⁵

Sono stati sottoposti ad analisi i campioni in UHMWPE trattati, confrontandoli con alcuni lavati e altri plasmati, i campioni in titanio trattati e uno lavato e l'olio essenziale di Mentha di Pancalieri. In alcuni casi, come per il titanio con il coating, sono stati acquisiti due spettri, dato che, osservando la superficie, non sembrava esserci una distribuzione uniforme dell'olio. Poi i dati sono stati elaborati e mediati con un software e gli spettri ricavati sono stati impostati in un range di lunghezze d'onda da 400 a 4000 cm⁻¹.

4.6 Osservazione al microscopio confocale

Un altro dispositivo utilizzato per valutare la presenza dell'olio sulla superficie dei campioni è il microscopio a fluorescenza (Figura 43, Zeiss LSM900 microscopio confocale, fornito di sorgente di luce fluorescente); l'analisi è stata effettuata basandosi sull'autofluorescenza dell'olio essenziale di menta precedentemente osservata.



Figura 43: Microscopio a fluorescenza (Zeiss LSM900)

Per questo tipo di analisi ci si è basati sulle osservazioni fatte in lavori precedenti, nei quali si è andato a creare un coating sul titanio e sull'acciaio e l'individuazione della presenza dell'olio è stata evidente (Figura 44):

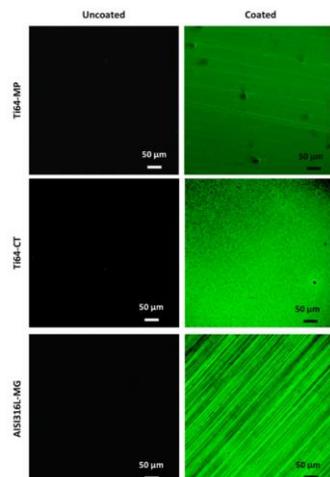


Figura 44: Immagini in microscopia a fluorescenza del titanio e acciaio non rivestito (a sinistra) e degli stessi rivestiti con l'olio di menta¹³⁶

Nel nostro caso sono stati analizzati alcuni campioni in UHMWPE.

4.7 Misura elettrocinetica del potenziale zeta

È stato analizzato il potenziale zeta dei campioni in funzione del pH e il suo cambiamento in presenza dell'olio.

Per definire il potenziale ζ è utilizzato il modello del doppio layer elettrico (EDL) (Figura 45) e corrisponde al “piano di taglio” (shear plane) tra il layer stazionario e quello diffuso. Il primo strato, è quello determinato dalle cariche esposte sulla superficie a fronte del contatto con un elettrolita acquoso; il secondo è dovuto all’attrazione di ioni opposti nell’elettrolita, che però non sono stabili e possono muoversi (per questo strato diffuso).

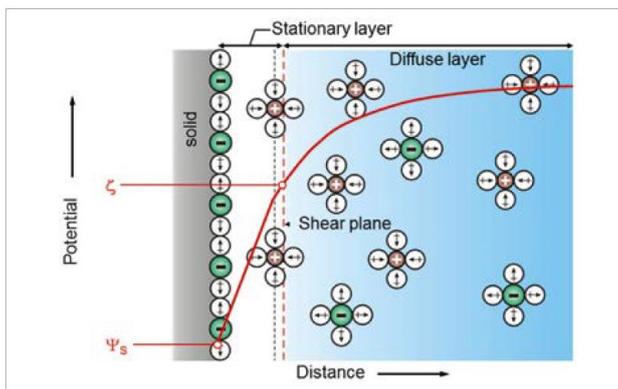


Figura 45: Modello del doppio layer elettrico all'interfaccia solido-liquido¹³⁷

La misura è stata effettuata con il metodo elettrocinetico. Il funzionamento dell’analizzatore elettrocinetico è rappresentato in Figura 46. Per i campioni solidi analizzati nella presente tesi è stata utilizzata una cella a gap regolabile che prevede l’inserimento di due campioni, uno affacciato all’altro, tra i quali si forma un gap regolato attorno ai 100 μm . L’elettrolita (KCl 0.001M) viene fatto fluire all’interno del gap e la differenza di potenziale, generata dal movimento di cariche, misurata ai capi della cella. La misura parte dal pH dell’elettrolita (circa 5.6) e viene condotta variando il pH nel range acido (fino a circa 3 con aggiunta di HCl 0.05M) o basico (fino a pH circa 9 mediante aggiunta di NaOH 0.05M) mediante l’unità di titolazione automatica dello strumento.

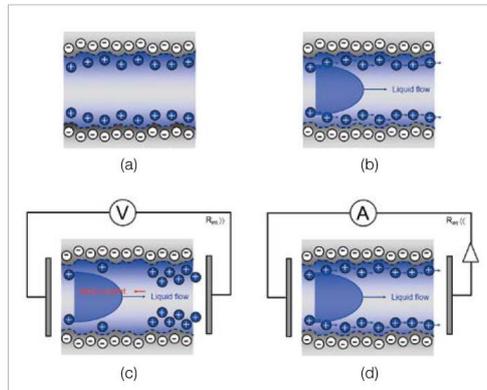


Figure 46: Funzionamento del potenziale di streaming o corrente di streaming¹³⁷

Il test è stato condotto sulla stessa coppia di campioni per il UHMWPE lavato e trattato con olio al 100% (procedendo prima con il range acido e poi con quello basico), mentre per i campioni plasmati sono state utilizzate due differenti coppie di campioni per il range acido e basico, plasmate appena prima della misura.

4.8 Reometro

L'olio essenziale è stato sottoposto ad una caratterizzazione tramite reometro (Figura 47, Anton Paar MCR 102), per misurare le proprietà reologiche. L'EO è stato posto tra due piatti, il rotore e lo statore del dispositivo, e messo in rotazione; poi si ottengono i valori della velocità di deformazione e sforzo di taglio con la misura del momento torcente e della velocità di rotazione del rotore e quindi la viscosità.



Figure 47: Reometro Anton Paar MCR 102

Può essere modificata la dimensione dei piatti, lo spessore del film di liquido tra i due e la temperatura di lavoro. Nel nostro caso sono state usate circa 6 gocce di olio per prova, la dimensione dei piatti è di 25mm, il gap tra i due è stato posto a 300 μm e 200 μm , con uno shear rate da 0.01 a 1000 s^{-1} e la temperatura di 25°C. Sono stati confrontati l'olio di grado alimentare utilizzato nel presente lavoro e l'olio non alimentare, impiegato in studi precedenti.

4.9 Tribometro

Per valutare gli effetti dell'olio essenziale sul coefficiente d'attrito e sull'usura del materiale sono stati effettuati dei test con un tribometro pin-on-disk (Figura 48, CSEM, High Temperature Tribometer, con una temperatura massima di utilizzo di 600°C), sia in condizioni secche, che in presenza del siero bovino come lubrificante. La prova è stata svolta presso l'Istituto di Scienze e Tecnologie per l'Energia e la Mobilità Sostenibili (STEMS), al Consiglio Nazionale delle Ricerche, Strada delle Cacce 73, 10135, Torino (Italia).



Figura 48: High Temperature Tribometer

Durante la prova è applicato un peso sul braccio, il quale ha all'estremità un pin o una sfera (può essere di differente materiale) che entra in contatto con il campione, che è posto in rotazione. I parametri che vengono impostati inizialmente sono la temperatura, la velocità di rotazione, la frequenza di acquisizione dati, il raggio della circonferenza ad un valore fisso e il numero di giri. Attraverso diversi sensori sono gestiti i valori preimpostati e si ottiene la misura del coefficiente d'attrito, calcolando la forza di deflessione sul braccio. Si cerca di simulare in questo modo la condizione reale di utilizzo del materiale, per prevederne il comportamento.

Sono stati sottoposti alla prova dei dischi di 30mm in UHMWPE (Figura 49), sia trattati che non, in condizioni secche e in presenza di un lubrificante ottenuto diluendo 25% in volume di siero bovino e 75% in volume di acqua distillata; la ball utilizzata è in 100 Cr6, la temperatura di 37°C, carico di 7 N, velocità lineare di 10 cm/s, raggio di 7 mm e numero di giri di 25000.



Figura 49: UHMWPE posto nel porta campioni per la prova tribologica

4.10 Profilometro

La misura della profondità e dell'area della traccia lasciata dopo la prova con il tribometro avviene tramite un profilometro a contatto Form Talysurf 120 (Figura 50 a) e b)). Il dispositivo è costituito da uno stilo in diamante a forma conica e con raggio della punta di $2\ \mu\text{m}$, tramite la quale viene analizzata la superficie del campione: impostando i mm di corsa orizzontale del braccio dello stilo sul campione, si acquisiscono profili 3D e 2D e, attraverso un software, si possono ricavare i valori dell'area e della profondità, oltre alle deformazioni presenti e rugosità.

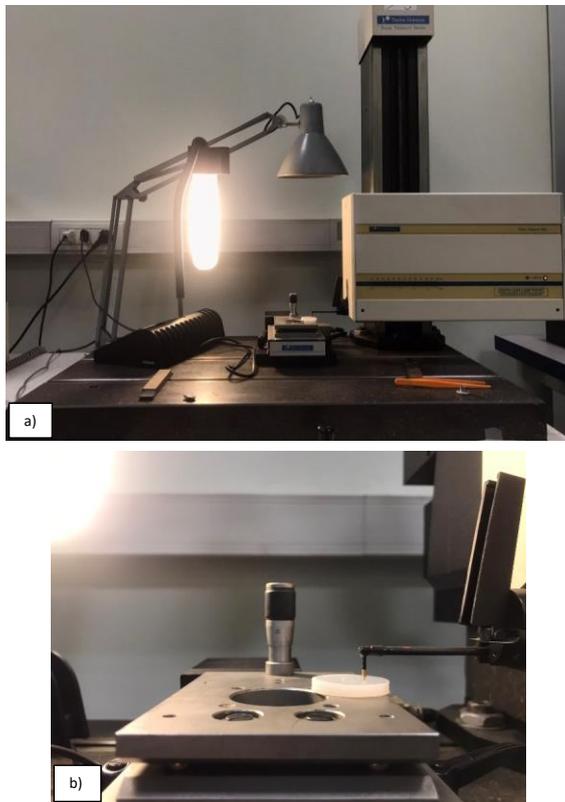


Figura 50: a) Profilometro Form Talysurf 120 e b) ingrandimento sullo stilo a contatto

Per ogni campione in UHMWPE sono stati presi due profili tridimensionali e 7 bidimensionali; la temperatura dell'ambiente è mantenuta a 25°C circa.

4.11 Microscopio ottico

È stata eseguita un'ultima analisi della superficie dell'UHMWPE sottoposto al tribometro attraverso il microscopio ottico Zeiss Axio.Lab A1 presente in Figura 51, per valutare la sua morfologia successivamente alla prova.



Figura 51: Microscopio ottico Zeiss Axio.Lab A1

4.12 Profilometro per la rugosità

L'analisi della rugosità invece è stata effettuata con il profilometro (AMETEK Taylor Hobson, Intra Touch) del Dipartimento Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT), presso il Politecnico di Torino.

Esistono diversi parametri di rugosità per descrivere la topografia di una superficie, tra i quali quelli di ampiezza sono i più utilizzati: R_a , R_q (R_{ms}), R_t e R_z , le cui formule sono presenti in Figura 52, tranne che per R_t che corrisponde alla somma della massima altezza di picco e della misura della valle più profonda.

$$R_a [\mu\text{m}] \quad R_a = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m |z(x_i)|$$

$$R_q [\mu\text{m}] \quad R_q = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m z^2(x_i)}$$

$$R_t [\mu\text{m}]$$

$$R_{zDIN} [\mu\text{m}] \quad R_{zDIN} = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^m z(x_i)$$

Figura 52: Parametri di rugosità e definizione¹³⁸

R_a è il parametro maggiormente usato, calcolato come la deviazione media (in valore assoluto) delle irregolarità dalla linea media, su una certa lunghezza di campionamento (m); R_q invece rappresenta la deviazione standard della distribuzione di certe altezze sulla superficie. Il parametro R_z si ricava come la somma media di 5 picchi più alti e di 5 valli più profonde su un profilo lungo m ¹³⁹⁻¹⁴⁰.

0004.13 Test biologici

Questa prova è stata condotta al Dipartimento di Scienze della Salute presso l'Università del Piemonte Orientale UPO, in Via Solaroli 17, 28100 a Novara (Italia).

4.13.1 Antibattericità

Per valutare le proprietà antibatteriche dell'olio essenziale di menta sull'UHMWPE è stato testato un ceppo di *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ottenuto dall'American Type Culture Collection. Il batterio è stato isolato e selezionato usando piastre selettive di Agar sale mannitolo (Sigma), fino ad ottenere colonie gialle di forma sferica; il brodo di coltura è stato inizialmente preparato mettendo 2-3 colonie in 30 ml di brodo Luria-Bertani (LB, da Sigma) a 37°C, posti durante la notte in movimento a 200 rpm per indurre la fase di crescita esponenziale dei batteri (Figura 53).

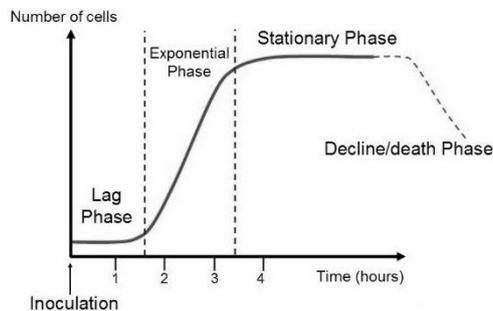


Figura 53: Curva di crescita batterica¹⁴¹

Poi il brodo è stato diluito usando un altro brodo LB fresco, fino a raggiungere la densità finale di 1×10^5 cellule/ml e una densità ottica di 600 nm, corrispondenti a 0.0001.

Dopodiché, i campioni in UHMWPE e quelli non trattati sono stati infettati, seguendo il protocollo standard ISO22196: una goccia di 50 μ l di brodo di coltura, contenente 1×10^3 batteri, è stata posta sulla superficie dei materiali. Dopo 24 ore è stata testata l'attività metabolica batterica, usando il test alamar blue, ovvero un test basato sulla conversione del sale di sodio resazurina in un metabolita secondario fluorescente in caso di corretta attività, mentre la loro vitalità è stata valutata analizzando i batteri planctonici e il biofilm aderente. In particolare, tramite l'utilizzo di una colorazione fluorescente Live/Dead (Thermo Fisher), è stata analizzata con il microscopio digitale a fluorescenza (EVos Fluid, ThermoFisher) una goccia presa dopo 24 ore di infezione e posta in una piastra multi-well sterile da 96. Poi la valutazione dei batteri aderenti è avvenuta con il conteggio delle Unità Formanti Colonie (CFU): prima sono stati lavati i campioni con un tampone fosfato salino (PBS), trasferiti in una provetta con PBS sterile, poi sottoposti a 3 fasi di sonicazione e vortex (per 5'; 30''); successivamente sono stati raccolti 100 μ l e diluiti in PBS a 1:10 per 6 volte. Da ognuna di queste diluizioni sono stati presi 20 μ l e posti su piastre agar LB, per poi incubarle per 24h a 37°C; formatesi le colonie, si fa il conto delle CFU come:

$$\text{CFU number} = [(n. \text{ colonies} \times \text{dilution factor}) \times 10^{\wedge} (\text{serial dilution})]$$

4.13.2 Citotossicità

La valutazione degli effetti dell'olio sulle cellule invece è stata realizzata in vitro, utilizzando le cellule staminali umane mesenchimali (hMSCs), preparate in DMEM a basso contenuto di glucosio, integrato con il 15% di siero bovino fetale (FBS, Merck) e l'1% di antibiotici (penicillina, streptomina).

Raggiunto l'80-90% di confluenza (ovvero la percentuale di area nella coltura coperta con le cellule), queste vengono staccate con della tripsina-EDTA e possono essere utilizzate.

4.13.2.1 Citotossicità diretta

Il test consiste nel porre sui campioni sterili (sia con olio che senza), messi in una piastra multiwell da 24 pozzetti, una goccia con $1,5 \times 10^4$ cellule e poi lasciarli in incubatore per 24h a 37°C per favorire l'adesione e la diffusione. Si aggiunge quindi 1ml di mezzo e si osserva il distacco delle cellule con lo stesso microscopio digitale usato nel caso dell'antibattericità. Per valutare l'attività metabolica si considerano due tempi, 24h e 72h, usando sempre l'Alamar blue in concentrazione di 0.015% e mantenendo la piastra a 37°C al buio per 3h. Sono stati raccolti quindi 100 μ l da ogni campione e trasferiti su un'altra piastra da 96 pozzetti, per poi fare un'analisi in fluorescenza (a 590nm) con il lettore di micropiastre multimodale Tecan Spark.

4.13.2.2 Citotossicità indiretta

I campioni sono stati trasferiti ciascuno in una provetta da 15ml contenente 10 ml di DMEM a basso contenuto di glucosio senza siero e posti in incubatore per 1 settimana a 37°C. Gli eluiti sono poi stati raccolti, è stato aggiunto un 15% di FBS e posti in pozzetti in cui sono state messe in precedenza 2×10^4 cellule per pozzetto. Si valuta quindi la vitalità delle cellule, visivamente e al microscopio, poi con il test metabolico Alamar blue. Questo test è stato effettuato per valutare l'impatto biologico del materiale non a diretto contatto con le cellule, come potrebbe verificarsi nel caso di materiali impiegati per la realizzazione di superfici articolari.

5. Risultati e discussione

5.1 Caratterizzazione dell'olio essenziale di *Mentha* di Pancalieri

5.1.1 Analisi gascromatografica e confronto

Per una caratterizzazione iniziale dell'olio essenziale di *Mentha di Pancalieri* preso in esame è stata osservata la sua analisi gas cromatografica fornitaci dall'azienda ed è stata confrontata con quella ottenuta per l'EO della stessa tipologia e provenienza, ma di un diverso produttore e di tipo non alimentare, che è stato utilizzato in uno studio precedente (Tabella 8).

Tabella 8: Gas-cromatografia dell'olio essenziale di *Mentha* di Pancalieri proveniente dall'Azienda Chialva e di un prodotto non alimentare, evidenziando quelli in comune

Nome del componente	<i>Mentha</i> di Pancalieri (Chialva) %area ¹⁴²	<i>Mentha</i> di Pancalieri (non alimentare) % area ¹⁴³
α -Pinene	0.61	0.16
Sabinene	0.44	0.53
Oct-1-en-3-ol	0.09	
Cis-Ocimene		0.27
δ -3-carene		0.68
dl-Limonene		1.00
β -Pinene	1.17	
β -Myrcene	0.18	
(-)-CIS-2-Carene		0.39
Camphene		0.50
Octan-3-ol	0.26	
α -Terpinene	0.27	
ISO-Menthylacetate		0.70
p-Cymene	0.31	
Limonene	2.40	
1,8-Cineol	5.04	5.90

γ -Terpinene	0.52	0.48
(Z)-Sabinene hydrate	0.73	
α -Terpinolene	0.13	
Camphane		6.78
α -Copaene		0.15
α -Bourbonene		0.80
Linalool	0.37	
Isopulegol	0.13	
Menthone	17.71	15.12
Menthofuran	4.84	15.26
Isomenthone	3.26	
Neomenthol	3.89	0.39
Menthol	39.88	35.03
α -Terpineol	0.18	
Pulegone	3.32	6.58
Piperitone	0.41	
Trans-caryophyllene	3.43	3.53
3,7-Guaiadiene		0.18
δ -Cadinene		0.13
Menthyl acetate	4.33	
α -Humulene		0.16
Bicyclo-sesqui-phellandrene		1.46
Butyl-methoxy-benzene		0.74
Germacrene D	1.67	
β -Caryophyllene oxide	0.08	
Viridiflorol	0.37	
1- Menthofuranone		1.59
2- Menthofuranone		0.21
(-)-Mintlactone		0.27

(+)-Aromadendrene		1.01
-------------------	--	------

In Tabella 8 non sono riportati, nel caso dell'olio essenziale da noi utilizzato, alcuni componenti presenti in minor quantità come α -Thujene, Camphene, Isomenthol, Carvacrol, Isomenthyl acetate e (-)- β -Bourbonene.

5.2 Trattamento dei materiali

Da un punto di vista macroscopico, osservando la superficie dei campioni, si possono notare alcuni cambiamenti per entrambi i materiali successivamente ai trattamenti, in alcuni casi maggiormente visibili (Figure 54 e 55).

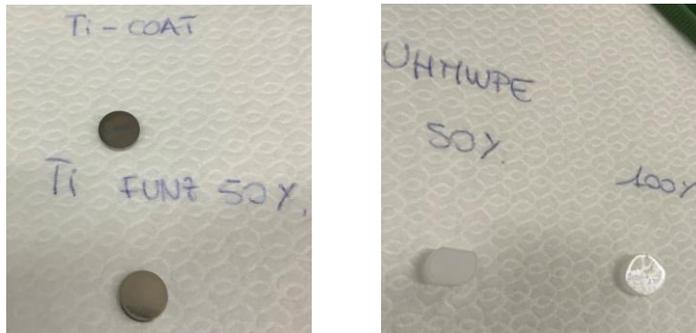


Figura 54: Campioni in titanio e in UHMWPE trattati



Figura 55: Disco in UHMWPE immerso nell'EO al 100%

Infatti soprattutto nel caso del coating per il titanio e del soaking al 100% per l'UHMWPE, l'olio ha conferito un aspetto più lucente sul polimero e un diverso colore sul metallo. La distribuzione però sembra non essere uniforme in entrambi i casi, con concentrazioni in alcune aree e nel caso

dell'UHMWPE più sul bordo, forse dovuto ad una lucidatura non perfetta e ad un assorbimento nella zona centrale. Si è visto inoltre che il polimero, quando immerso nell'EO puro, tende a rimanere a galla, se non spinto ed immerso bene; per questo motivo successivamente si è deciso di porre la faccia da trattare verso il basso all'interno delle fialette, avvalorato da alcuni risultati riscontrati nelle analisi FTIR (descritte in seguito).

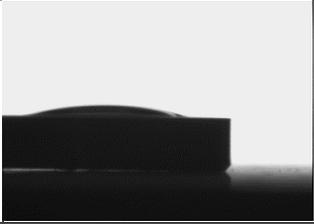
5.3 Misura dell'angolo di contatto

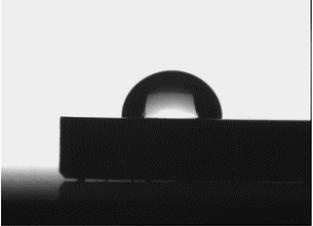
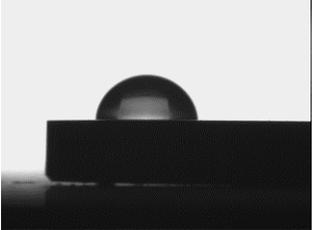
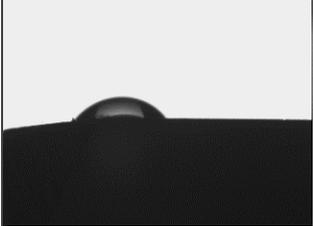
Sono stati confrontati i valori dell'angolo di contatto in diversi casi, cercando di avere per ognuno almeno due misure e considerando in qualche caso più di un campione per tipologia:

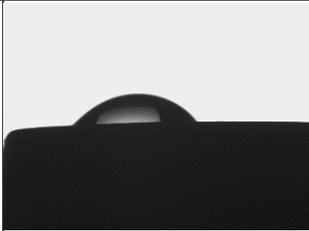
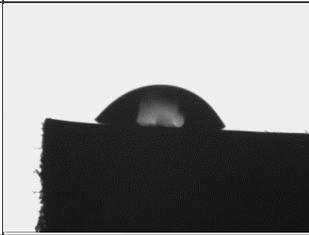
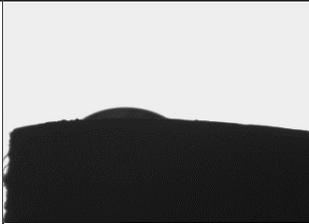
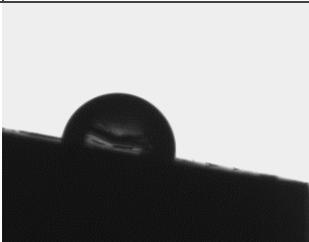
- Titanio tal quale plasmato;
- Titanio tal quale non plasmato;
- Titanio con coating;
- Titanio Funzionalizzato al 50%;
- UHMWPE tal quale;
- UHMWPE tal quale plasmato;
- UHMWPE nel caso di soaking al 20%;
- UHMWPE nel caso di soaking al 50%;
- UHMWPE nel caso di soaking al 100%.

In Tabella 9 si riportano i valori degli angoli misurati sui diversi campioni e un'immagine rappresentativa per ciascuno di essi:

Tabella 9: Angoli di contatto di alcuni campioni

<p><u><i>Titanio di controllo plasmato N.1</i></u></p> <p>- 13.1°</p>	
<p><u><i>Titanio di controllo plasmato N.2</i></u></p> <p>- 19.2°</p>	
<p><u><i>Titanio di controllo non plasmato N.1</i></u></p> <p>- 48,7°</p> <p>- 39.2°</p>	

<p>Media → 43.95 ° ± 6.717514 °</p>	
<p><u>Titanio di controllo non plasmato N.2</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 66 ° - 70 ° <p>Media → 68 ° ± 2.828427 °</p>	
<p><u>Titanio di controllo non plasmato N.3</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 56.9 ° 	
<p><u>Titanio plasmato e coated</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 90,9 ° - 84.1 ° <p>Media → 87.5 ° ± 4.808326 °</p>	
<p><u>Titanio plasmato e funzionalizzato 50%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 85.8 ° - 88.2 ° <p>Media → 87 ° ± 1.697056 °</p>	
<p><u>UHMWPE plasmato</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 0° 	
<p><u>UHMWPE tal quale</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 48.7 ° - 51.4 ° <p>Media → 50.05 ° ± 1.909188 °</p>	

<p><u>UHMWPE plasmato e soaked 20%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 48.1 ° - 35 ° <p>Media → 41.55 ° ± 9.263099 °</p>	
<p><u>UHMWPE plasmato e soaked 50%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 60.6 ° - 54.5 ° <p>Media → 57.55 ° ± 4.313351 °</p>	
<p><u>UHMWPE plasmato e soaked 100%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 28.3 ° 	
<p><u>UHMWPE plasmato e soaked 100% (passati 13 giorni)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 90.4 ° - 84 ° <p>Media → 87.2 ° ± 4.525483 °</p>	

Nelle Figure 56 e 57 sono confrontati i valori ottenuti per le diverse classi di materiali:

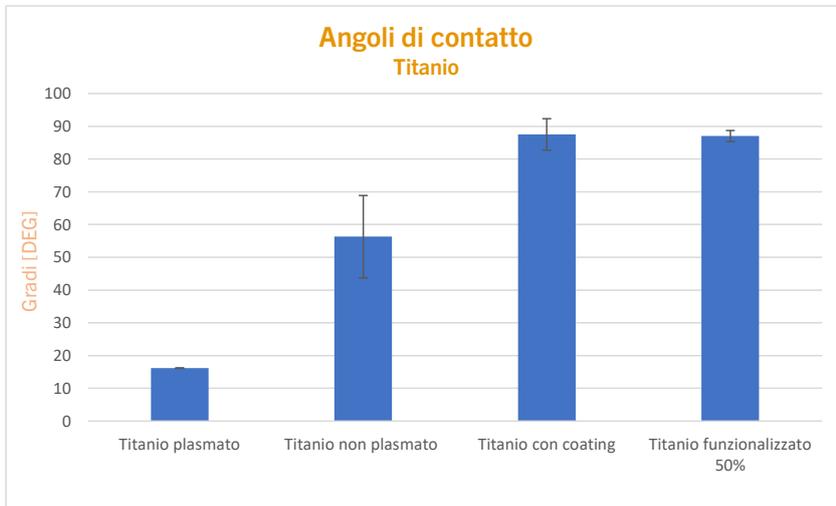


Figura 56: Angoli di contatto sui campioni in titanio

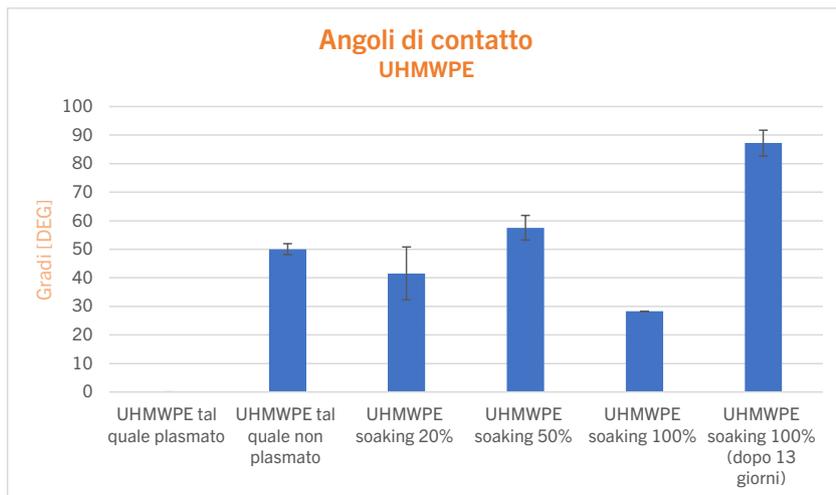


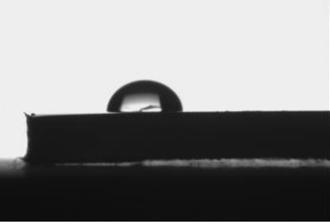
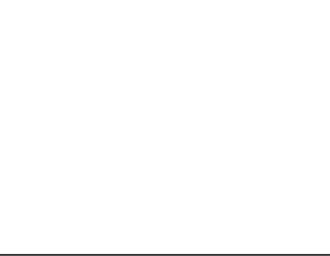
Figura 57: Angoli di contatto sui campioni in UHMWPE

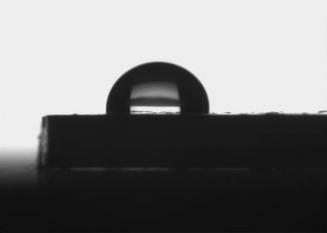
Nel caso del titanio i valori ottenuti sul tal quale non plasmato risultano più bassi di ciò che ci si aspetterebbe, forse indice della presenza di contaminanti al di sopra, mentre rispecchia le aspettative la riduzione che si nota con il trattamento al plasma e l'aumento in presenza dell'olio.

Nel caso dell'UHMWPE vediamo come il trattamento al plasma aumenti significativamente la bagnabilità e come la presenza dell'olio la riduca; i risultati però in questo caso sono poco chiari e indicativi, soprattutto sul comportamento dopo 13 giorni dal trattamento, dato che i campioni non erano perfettamente piani e la distribuzione non uniforme ha avuto un ruolo sul valore ottenuto.

In una fase successiva si è deciso di approfondire lo studio dell'UHMWPE, cercando di migliorare la lucidatura, ottenere campioni piani e considerando come trattamento di soaking quello al 100%. Nella Tabella 10 si va a valutare la differenza di bagnabilità nel caso di UHMWPE sottoposto al plasma o meno, con l'olio al 100% o tal quale, lato rugoso o liscio, e ponendolo nella fialetta con la faccia lucidata e da trattare verso il basso (indicato con "g").

Tabella 10: Angoli di contatto UHMWPE ('g' indica i campioni che sono stati posti con la faccia verso il basso)

<p><u>UHMWPE non plasmato N.1:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 91.7° - 92.9° <p>Media → 92.3 ° ± 0.8485°</p>	
<p><u>UHMWPE non plasmato N.2:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 83.9° - 83.2° - 74.1° <p>Media → 80.4° ± 5.4672°</p>	
<p><u>UHMWPE plasmato N.1:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 0° 	
<p><u>UHMWPE plasmato N.2:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 0° 	
<p><u>UHMWPE plasmato e soaked 100%:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 29.2° - 14.5° <p>Media → 21.85° ± 10.3945°</p>	
<p><u>UHMWPE plasmato e soaked 100%:</u></p>	

<ul style="list-style-type: none"> - 50.4° - 52.1° <p>Media → 51.25° ± 1.2021°</p>	
<p><u>UHMWPE non plasmato e soaked</u> <u>100% 'g' N.1:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 95.1° - 96.4° <p>Media → 95.75 ° ± 0.9192°</p>	
<p><u>UHMWPE non plasmato e soaked 'g'</u> <u>100% N.2:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 74.3° - 73.1° <p>Media → 73.7° ± 0.8485°</p>	
<p><u>UHMWPE plasmato e soaked 100%</u> <u>'g' N.1:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 68.8° - 53.2° <p>Media → 61° ± 11.0309°</p>	
<p><u>UHMWPE plasmato e soaked 'g'</u> <u>100% N.2:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 38.2° 	
<p><u>UHMWPE rugoso soaked 'g' 100%</u> <u>N.1:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 77.1° - 85.2° <p>Media → 81.15° ± 5.7276°</p>	
<p><u>UHMWPE rugoso soaked 'g' 100%</u> <u>N.2:</u></p>	

- 72.8°	
- 77.4°	
Media → 75.1° ± 3.2527°	

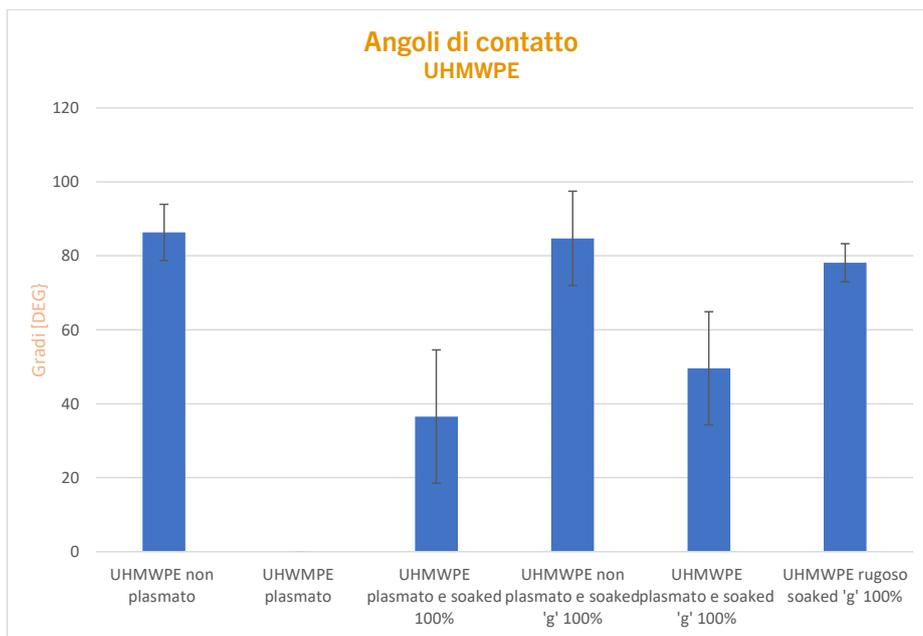


Figura 58: Confronto angoli di contatto UHMWPE trattato in modo differente ('g' indica i campioni che sono stati posti con la faccia verso il basso)

Ciò che si evince dall'istogramma in Figura 58 è come il trattamento al plasma incida sulla bagnabilità del polimero, rendendolo più idrofilico e forse più permeabile anche all'olio, facendo in modo che questo non rimanga in superficie ma venga in parte assorbito.

Il valore elevato dell'ADC nel caso del materiale soaked ma valutato sul retro (ultimi due valori medi) è giustificata probabilmente dal fatto che il lato fosse rugoso e non sottoposto al plasma.

5.4 Osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Per una caratterizzazione superficiale dei campioni in titanio è stata utilizzata la misura al SEM, osservando sia quello non trattato, che il metallo funzionalizzato e quello rivestito; per ogni tipo sono state fatte tre analisi. In parallelo è stata fatta un'analisi in EDS (spettroscopia in dispersione di energia) per valutare la composizione chimica.

I risultati sono presenti nelle Tabelle 11, 12 e 13:

Tabella 11: Immagini SEM e analisi EDS del titanio tal quale

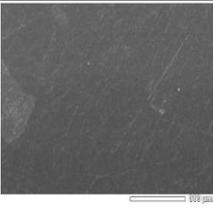
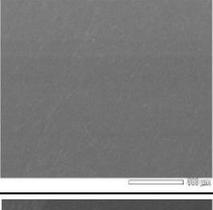
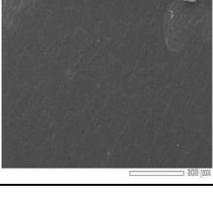
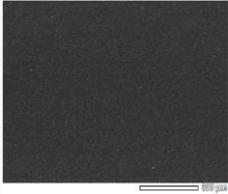
Campione	Carbonio (Atom %)	Ossigeno (Atom %)	Titanio (Atom %)	Immagine
1° Titanio tal quale	ND	40.84	59.16	
2° Titanio tal quale	2.32	38.00	59.68	
3° Titanio tal quale	ND	37.86	62.14	
Media ± Dev.st	2.32	38.9 ± 1.68154	60.327 ± 1.5918	

Tabella 12: Immagini SEM e analisi EDS del titanio funzionalizzato al 50%

Campione	Carbonio (Atom %)	Ossigeno (Atom %)	Titanio (Atom %)	Immagine
1° Titanio funz 50%	ND	41.69	58.31	

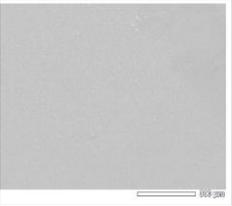
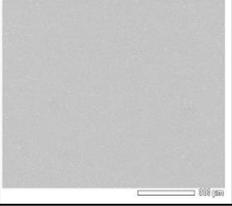
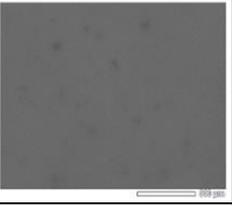
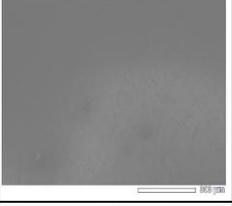
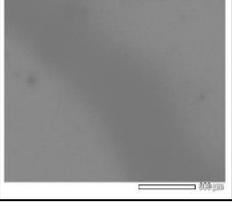
2° Titanio funz 50%	3.96	40.63	55.41	
3° Titanio funz 50%	ND	34.97	65.03	
Media ± Dev.st	3.96	39.1 ± 3.61288	59.58 ± 4.93479	

Tabella 13: Immagini SEM e analisi EDS del titanio rivestito

Campione	Carbonio (Atom %)	Ossigeno (Atom %)	Titanio (Atom %)	Immagine
1° Titanio coated	12.97	41.94	45.08	
2° Titanio coated	56.07	32.57	11.36	
3° Titanio coated	36.55	35.81	27.64	

Media ± Dev.st	35.2 ± 21.5818	36.8 ± 4.758701	28.027 ± 16.863	
-----------------------	---------------------------	----------------------------	----------------------------	--

Dai risultati riportati si deduce che nel caso della funzionalizzazione al 50% non si hanno importanti cambiamenti dal punto di vista composizionale, questo è in accordo con la formazione di uno strato molecolare più sottile della profondità di analisi dell'EDS (dell'ordine dei micron). Al contrario, con il coating si forma uno strato di olio più spesso e si osserva la sua presenza con l'aumento della percentuale di carbonio (in modo significativo, dal 12 al 56% rispetto al 3% del campione tal quale) e una diminuzione del titanio. Come già notato, lo strato non è uniforme, come dimostra la deviazione standard ricavata.

Da un punto di vista morfologico si nota come le righe di lucidatura, presenti sul titanio tal quale, non siano più visibili successivamente ad entrambi i trattamenti, indice della presenza di EO legato.

5.5 Analisi al microscopio confocale

Nell'analisi effettuata con il microscopio confocale sono state prodotte le seguenti immagini (Figura 59):

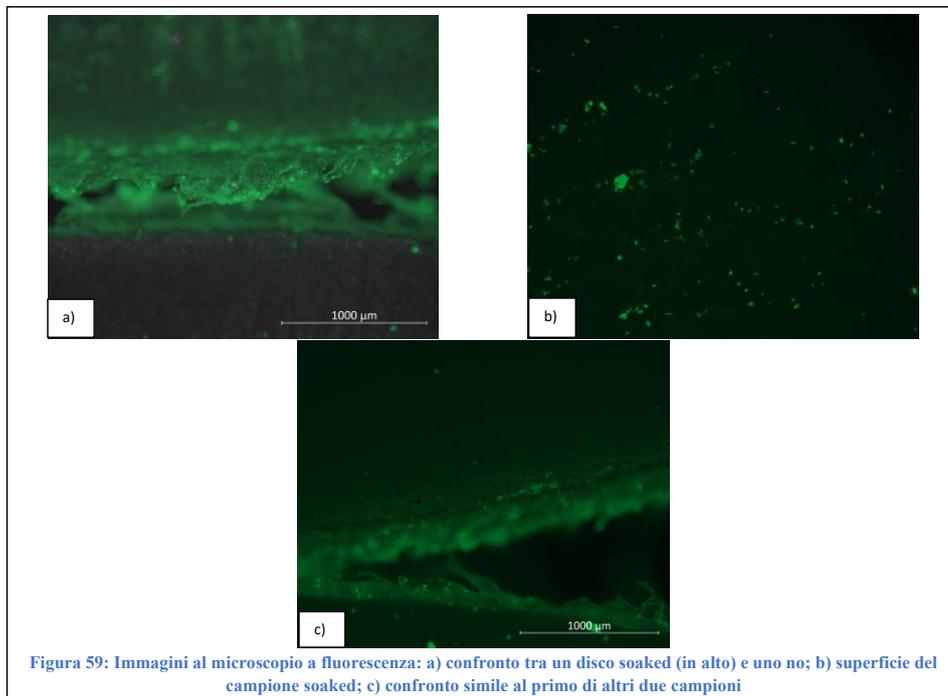


Figura 59: Immagini al microscopio a fluorescenza: a) confronto tra un disco soaked (in alto) e uno no; b) superficie del campione soaked; c) confronto simile al primo di altri due campioni

In alcuni casi sembra esserci una differenza tra i due campioni, con la presenza dell'olio segnalata dalla colorazione verde e da alcuni spot, ma molto spesso, come si vede nell'immagine c), è lo stesso UHMWPE ad emettere nel verde, rendendo difficile l'identificazione e una distinzione più decisa dei due campioni.

5.6 Analisi FTIR

Per avere un confronto sullo spettro dell'olio essenziale considerato, è stata osservata l'analisi svolta durante il precedente studio sull'EO di *Mentha piperita* di Pancalieri (Figura 60):

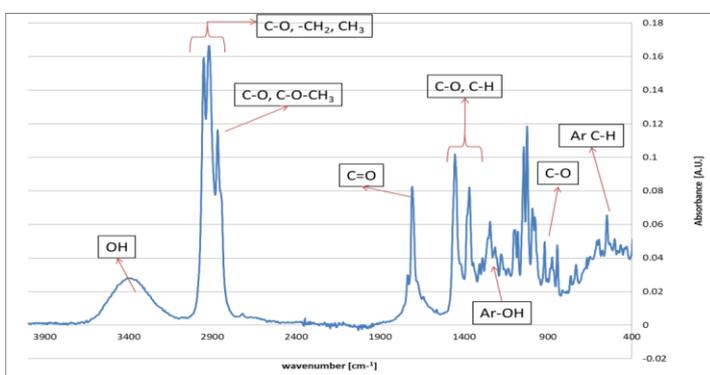


Figura 60: Spettro FTIR dell'olio essenziale di *Mentha piperita* di Pancalieri (non alimentare)⁹⁹⁻¹⁴²

Nell'immagine sono stati individuati i picchi caratteristici dei legami chimici presenti; nello specifico si trovano in corrispondenza delle lunghezze d'onda indicate nella Tabella 14 ("v" indica le vibrazioni di stretching, "δ" le vibrazioni di deformazione, "s" se simmetrica e "as" se asimmetrica):

Tabella 14: Assegnazione di bande spettrali dello FTIR nel caso dell'olio essenziale di *Mentha x piperita*¹⁴²⁻¹⁴⁴

Lunghezza d'onda [cm ⁻¹]	Vibrazione
3470-3407	v(-OH)
2923, 2875	v _{as} (-C-H, -CH ₂) e v _s (-C-H, -CH)
2950	v _{as} (-C-H, -CH ₃ , -CH ₂)
2869	Gruppo C-O-CH ₃ , stretching C-O
2721	Stretching C-H
1706	v(-C=O) in acido
1450	Deformazione CH ₂ e asimmetrica deformazione di CH ₃
1372/1337	(-C-H, -CH ₃), banding
1281/1244	v(-C-O) o δ(-CH ₂ -), gruppo estere carbonile, fenolo

1025	C-O stretching
974	Vibrazione dello scheletro C-O
549	Legame C-H aromatico

Lo spettro ottenuto invece per l'EO dell'azienda Chialva è riportato in Figura 61:

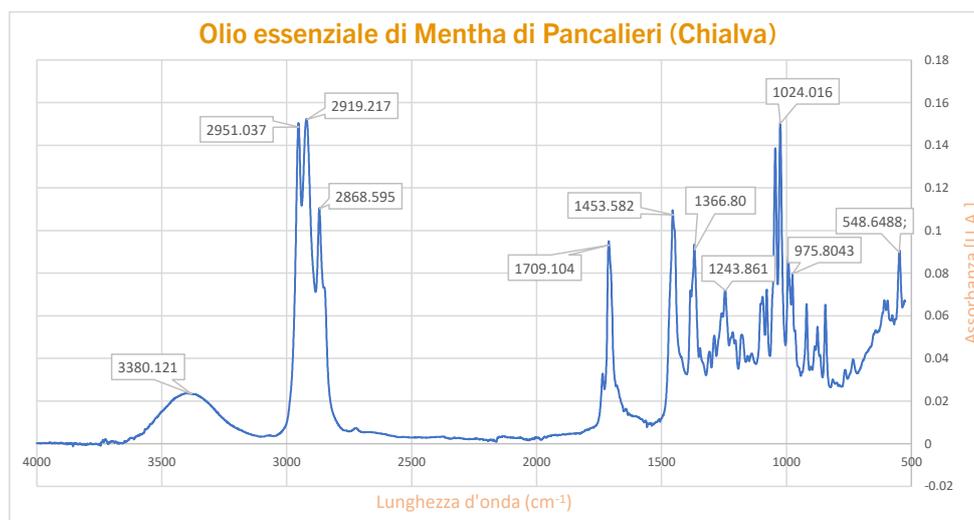


Figura 61: Spettro FTIR dell'olio essenziale di Mentha piperita di Pancalieri (azienda Chialva)

Ritroviamo quindi gli stessi picchi caratteristici elencati in Tabella 14.

I risultati per quanto riguarda gli spettri ricavati sul titanio sono riportati nella Figura 62.

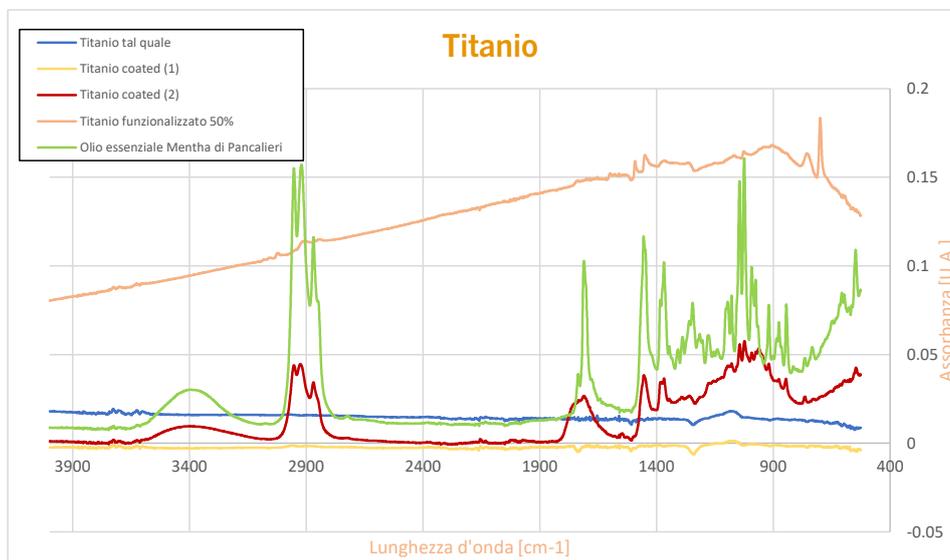


Figura 62: Spettri FTIR del titanio

Nella Figura sovrastante è riportato anche il grafico dell'olio essenziale e nel caso del coating sono state effettuate due misure, data la distribuzione non omogenea: l'unico caso in cui compaiono i picchi dell'olio, quindi viene rilevata la sua presenza, è sul titanio rivestito, dove però risultano avere minor intensità.

Lo spettro dell'UHMWPE presenta alcuni picchi caratteristici, riportati in Figura 63:

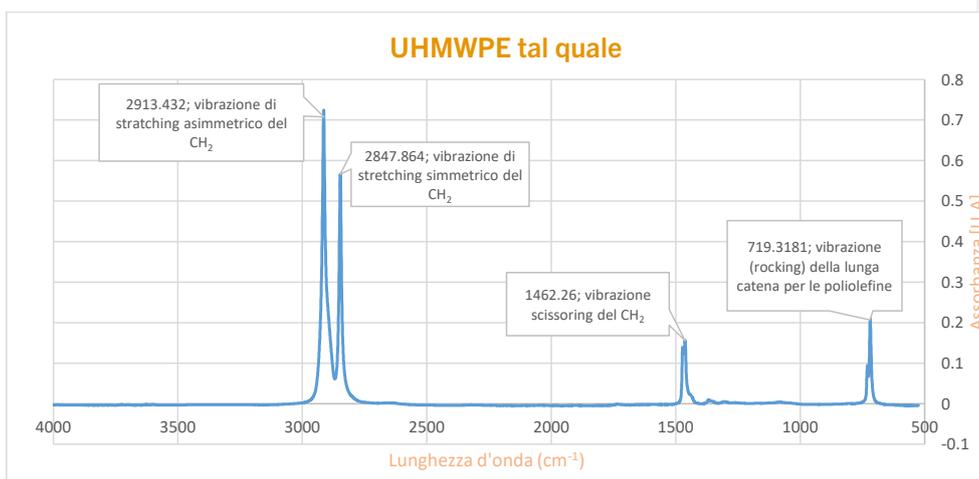


Figura 63: Spettro FTIR dell'UHMWPE e descrizione dei picchi¹⁴⁵

Quindi si passa ad analizzare l'effetto del plasma atmosferico sull'UHMWPE (Figura 64):

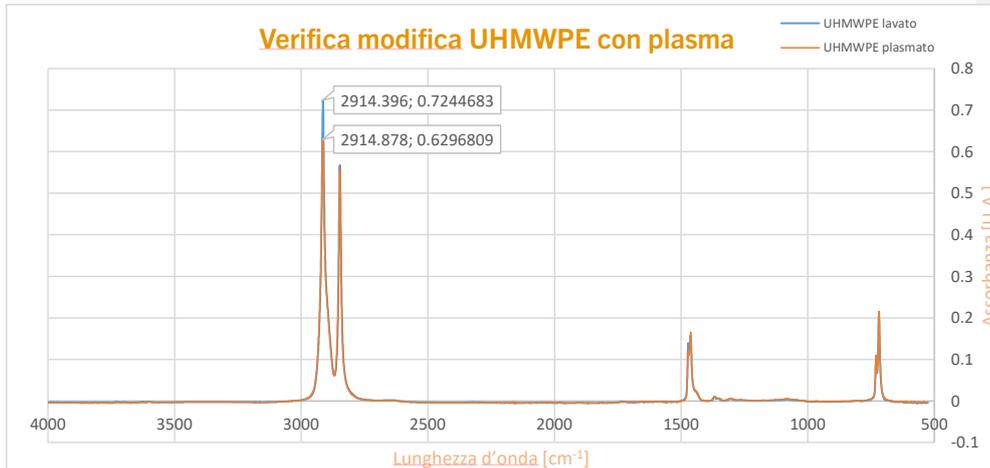


Figura 64: Spettro FTIR UHMWPE sottoposto al plasma e non

Ciò che si vede è una minima riduzione dell'intensità del picco a 2914 cm⁻¹ e il piccolo spostamento di quello a 1462 cm⁻¹, ma nel complesso non si hanno variazioni importanti.

Nella Figura 65 invece riportiamo gli spettri dell'UHMWPE trattato e non, confrontato allo stesso modo del titanio con l'olio:

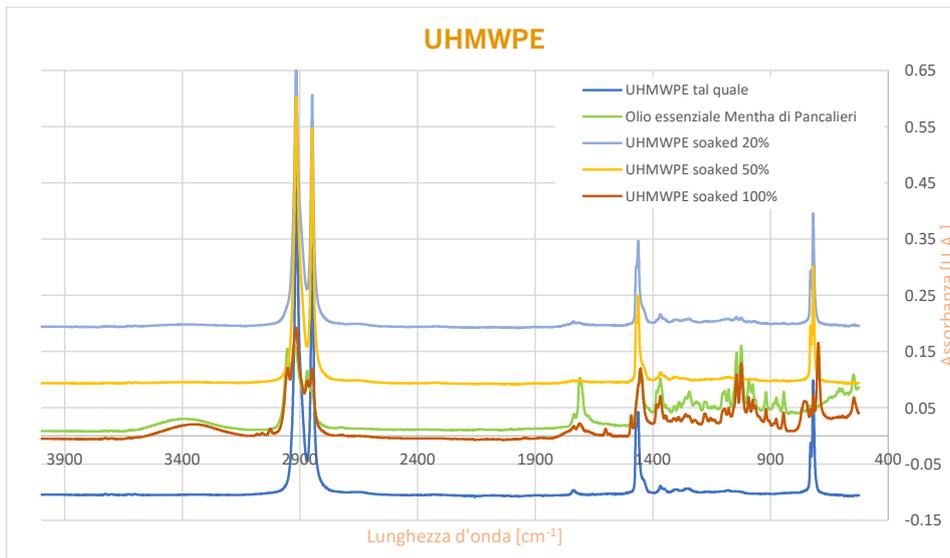


Figure 65: Spettri FTIR dell'UHMWPE

Per maggior chiarezza i grafici del tal quale e del trattamento di soaking al 20% e 50% sono stati shiftati, in modo che fosse visibile la posizione dei picchi.

Si nota come solo nel caso dell'UHMWPE immerso nell'olio puro ci sia la comparsa di diversi picchi della Mentha, l'analisi FTIR sul trattamento al 20% e 50% non mostra variazioni.

È stata fatta inoltre una valutazione sul possibile degrado o cambiamento dell'olio sia con il passare del tempo (per contatto con la luce e con l'aria), che quando sottoposto ad incubazione, osservando gli spettri FTIR riportati in Figura 66:

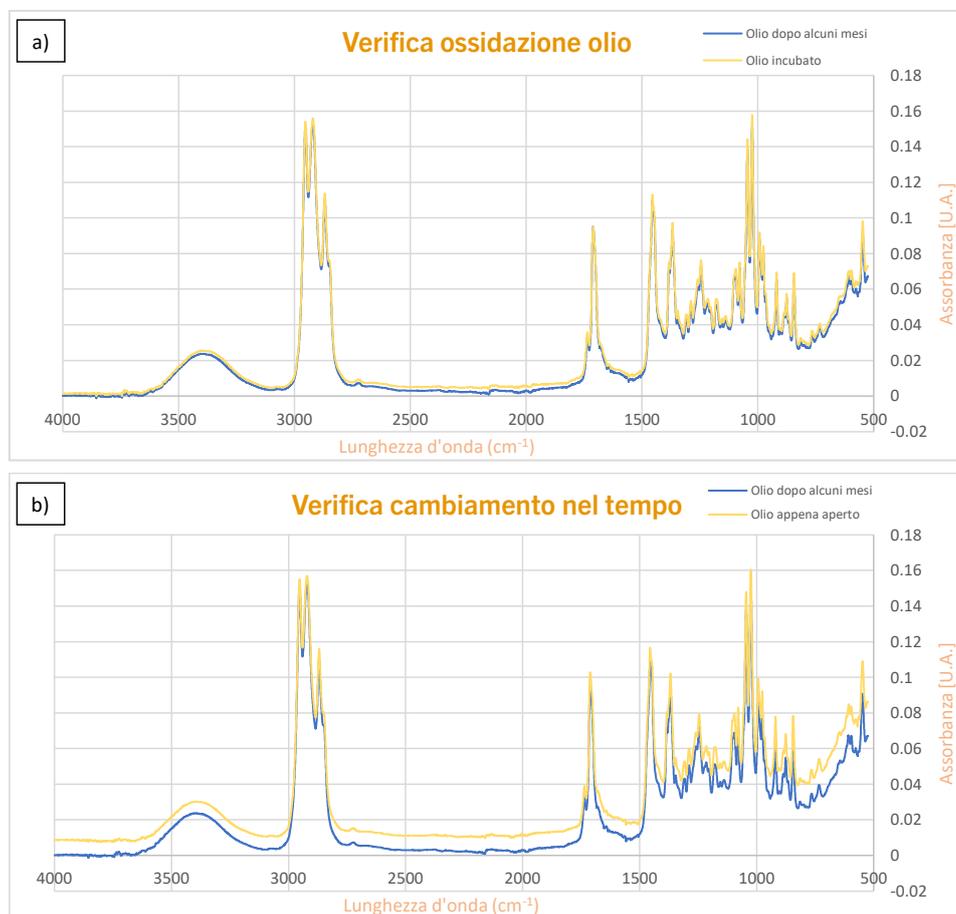


Figura 66: Spettri FTIR per verificare a) gli effetti dell'incubazione e b) le modifiche una volta aperto

Non si osservano variazioni significative dello spettro dell'olio a seguito di apertura o immersione dei campioni.

Inoltre si è voluto vedere l'effetto dell'immersione dell'UHMWPE sullo stesso olio, successivamente all'incubazione dato che, dopo ogni trattamento, apparisse visivamente più denso e opaco (Figura 67).

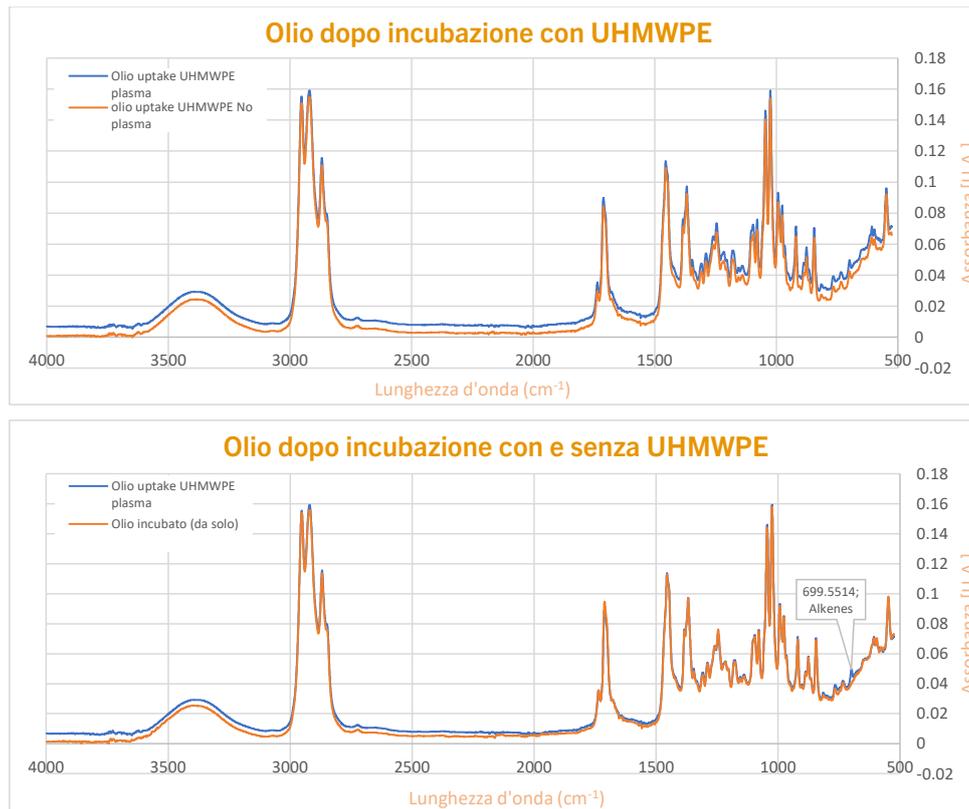


Figura 67: Spettri FTIR dell'olio essenziale dopo l'incubazione in differenti casi

Dal primo confronto non si individuano cambiamenti negli spettri dei due casi in analisi, per questo si è preso in modo indiscriminato uno dei due per il successivo grafico, dove si nota la comparsa di un singolo picco a 699 cm⁻¹.

Di conseguenza ad alcuni spettri ottenuti su successivi campioni in UHMWPE soaked al 100%, nei quali non è stata riscontrata la presenza di olio, è sorto il dubbio che la superficie di questi a contatto con l'olio per maggior tempo durante l'incubazione fosse quella sottostante. In Figura 68 è presente sia un confronto tra le due facce, che con lo spettro dell'olio:

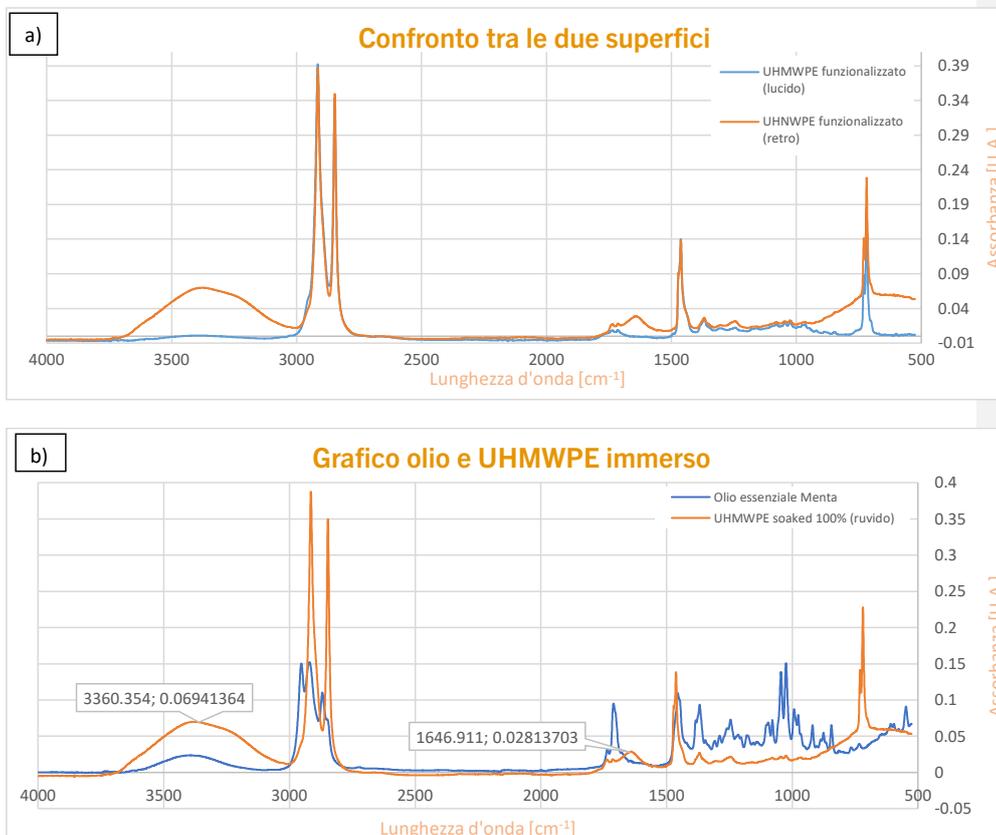


Figura 68: Spettri FTIR per a) confrontare la presenza di olio tra le due facce e b) individuare i picchi caratteristici dell'EO

Si riscontra quindi una certa differenza tra i due lati dell'UHMWPE, con maggior presenza dell'EO di Mentha su quello sottostante in base alla comparsa di nuovi picchi, tra i quali si nota un'intensità maggiore in corrispondenza della banda a 3350cm⁻¹ dovuta allo stretching di -OH di un acido carbossilico legato con legame H¹⁴⁶ e a 1631 cm⁻¹ per lo stretching di C=O.

Il risultato però può essere dovuto al fatto che la faccia considerata fosse rugosa, quindi assorbendo meno olio ne sia rimasto più in superficie.

Si è voluto quindi verificare l'efficacia del trattamento al plasma atmosferico considerando un altro campione plasmato e immerso nell'olio e uno unicamente immerso, per poi osservare i loro spettri riportati in Figura 69:

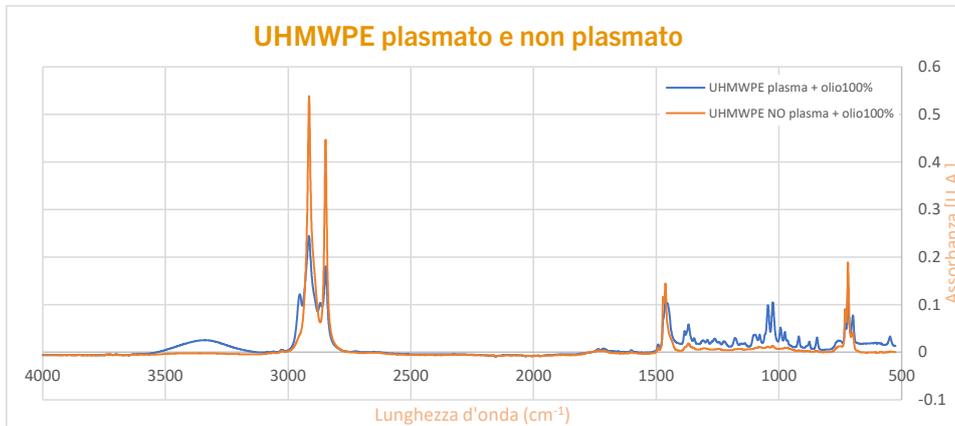


Figure 69: Confronto tra il campione di UHMWPE plasmato e quello non plasmato (entrambi poi immersi)

Sull'UHMWPE plasmato e soaked al 100% si nota un'evidente traccia della presenza dell'olio, cosa che non avviene sul campione non plasmato. Si dimostra quindi la necessità di pre-trattamento al plasma per l'ottenimento di un efficace caricamento di olio.

5.7 Potenziale z e punto isoelettrico

La misura del potenziale z (Figura 70) è stata eseguita su campioni di UHMWPE unicamente lavati, campioni plasmati e sul materiale plasmato e immerso nell'olio (1 ml di EO).

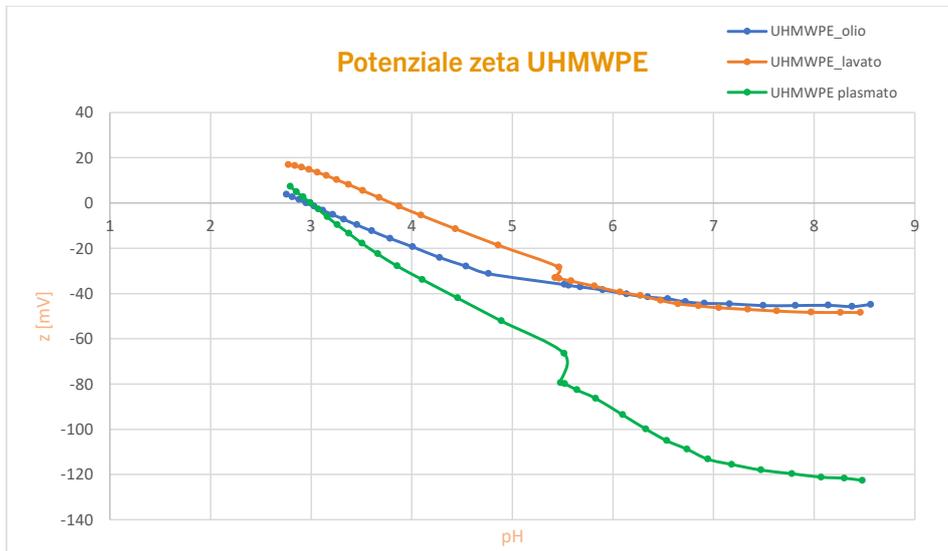


Figura 70: Potenziale zeta sull'UHMWPE lavato, plasmato e immerso nell'olio essenziale di Mentha

I valori del punto isoelettrico sono riportati nella Tabella 15:

Tabella 15: Punti isoelettrici dei campioni in UHMWPE

Campioni	Punto isoelettrico (IEP)
UHMWPE lavato	3.8
UHMWPE plasmato	2.99
UHMWPE plasmato + soaked 100%	2.95

Si osserva una variazione del punto isoelettrico nel momento in cui il materiale viene trattato; in letteratura per i polimeri si considera uno IEP di circa 4 per i polimeri privi di gruppi funzionali specifici¹⁴⁷.

Lo strumento, quindi, registra il cambiamento chimico che avviene sulla superficie rispetto al campione tal quale, evidenziando come questo in parte sia dovuto al trattamento al plasma, dato che sembra introdurre dei gruppi a carattere acido¹⁴⁸, partendo dalle stesse condizioni di pulizia.

Analizzando però l'andamento della curva nel caso di UHMWPE soaked in olio, si nota la presenza di un plateau in campo basico, simile a ciò che avviene per il campione unicamente lavato; questo può essere indice del fatto che il lavaggio in acqua abbia portato via parte dell'olio presente, o che effettivamente, come visto in precedenza, lo strato non uniforme del rivestimento lasci intravedere il substrato.

5.8 Reometro e misura della viscosità

Per valutare le proprietà lubrificanti di quest'olio essenziale abbiamo deciso di analizzare tramite reometro la sua viscosità dinamica; le curve ottenute sono presenti in Figura 71:

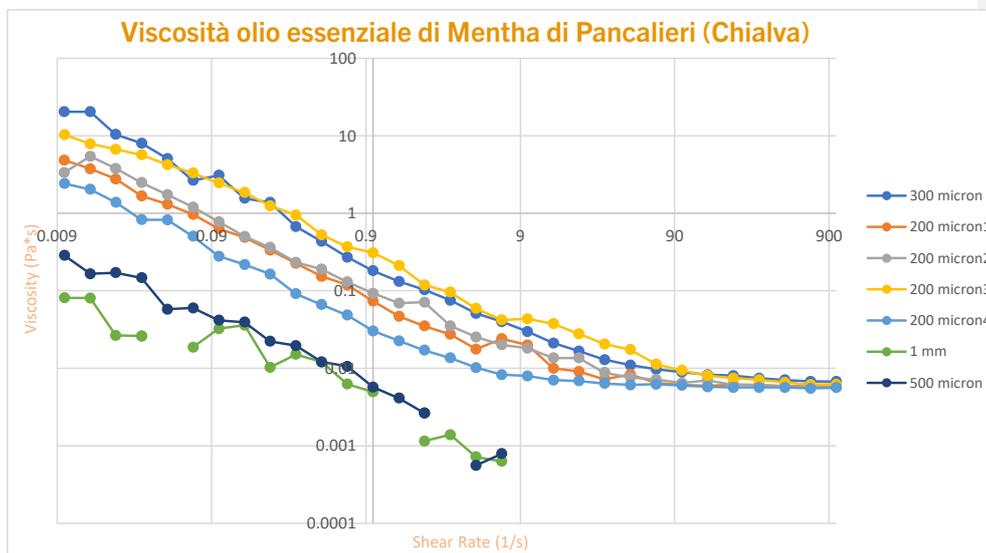


Figura 71: Viscosità dinamica dell'olio essenziale di Mentha di Pancalieri (Chialva)

Sono stati provati diversi valori del gap tra i dischi del dispositivo, per valutare come si comportasse l'EO: il disco a 500 μm e 1000 μm ad un certo punto perde il contatto con il fluido, essendo molto liquido; sui 200 μm il grafico si è in parte stabilizzato e il piatto è rimasto in contatto per tutto il range di shear rate.

Come descritto in letteratura per alcuni tipi di oli essenziali¹⁴⁹ la viscosità trovata è molto bassa, simile a quella dell'acqua (anche visibilmente sembra avere la stessa consistenza).

Abbiamo voluto eseguire la prova anche per l'olio essenziale di menta non alimentare, valutato negli studi precedenti, ottenendo queste curve (Figura 72):

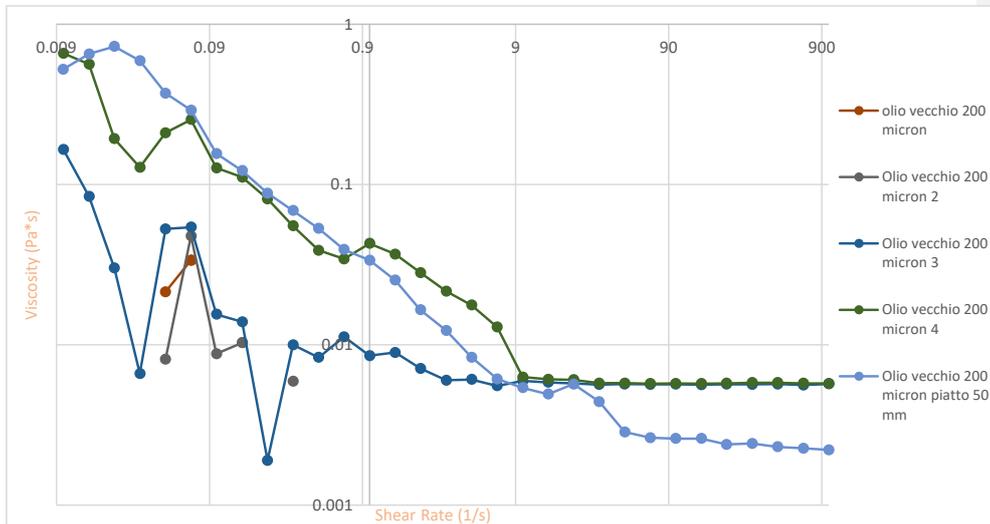


Figure 72: Viscosità dinamica olio essenziale di Mentha di Pancalieri (non alimentare)

In questo caso non si è riusciti ad ottenere un grafico più stabile, l'olio ha un comportamento diverso, perdendo il contatto con il piatto anche a 200 μm nelle prime due prove, nella terza probabilmente la presenza di una bolla d'aria ha provocato dei picchi verso il basso, poi recuperati opponendo maggior resistenza (da ciò l'innalzamento repentino); cambiando la dimensione dei piatti utilizzati non c'è stato un miglioramento. Questo può essere dovuto ad una composizione diversa dei due EO considerati o ad una degradazione ed evaporazione degli elementi più volatili nel tempo, che ha portato l'olio ad essere ancora meno viscoso.

Nel caso degli oli essenziali di questo tipo la misura della viscosità tramite reometro non risulta essere il metodo appropriato, essendo simile all'acqua; per liquidi simili si utilizzano i viscosimetri.

5.9 Test tribologici

Le prove di attrito ed usura sono state condotte sui dischi di UHMWPE in queste condizioni:

- Secche/dry: testato un campione in UHMWPE tal quale plasmato e due immersi nell'olio;
- Lubrificate/wet: testato un campione in UHMWPE tal quale plasmato e due immersi nell'olio.

I grafici nella Figura 73 mettono a confronto i campioni nelle due condizioni:

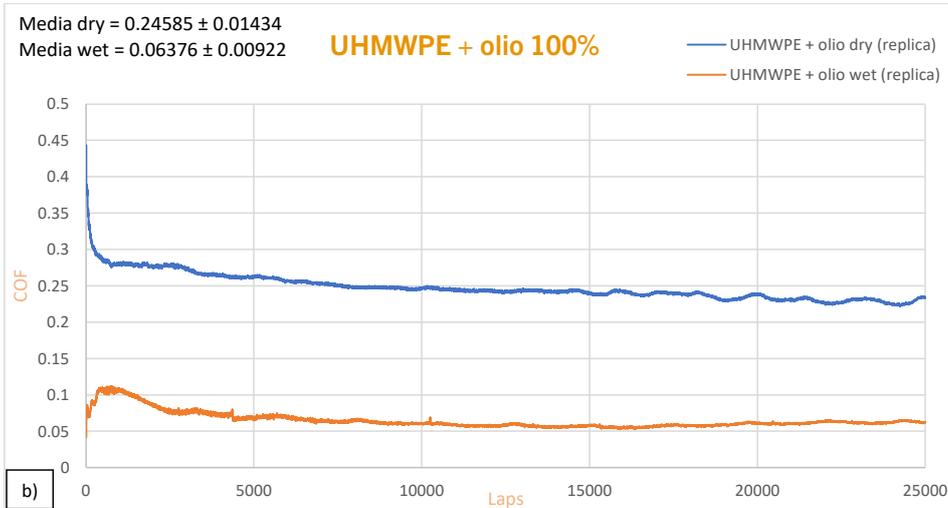
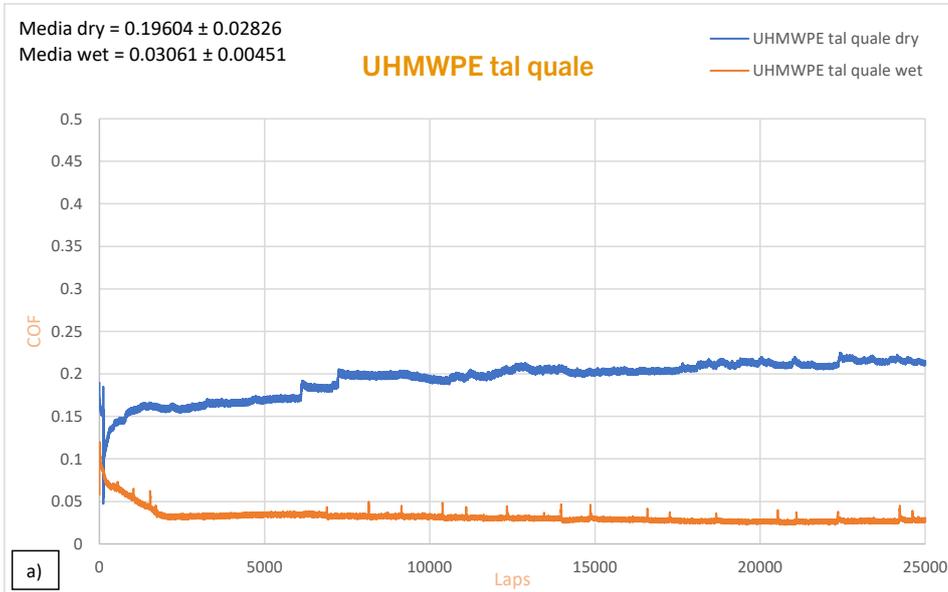


Figure 73: Grafici dei coefficienti di attrito e media del suo valore per a) l'UHMWPE tal quale, b) UHMWPE soaked in olio essenziale al 100%.

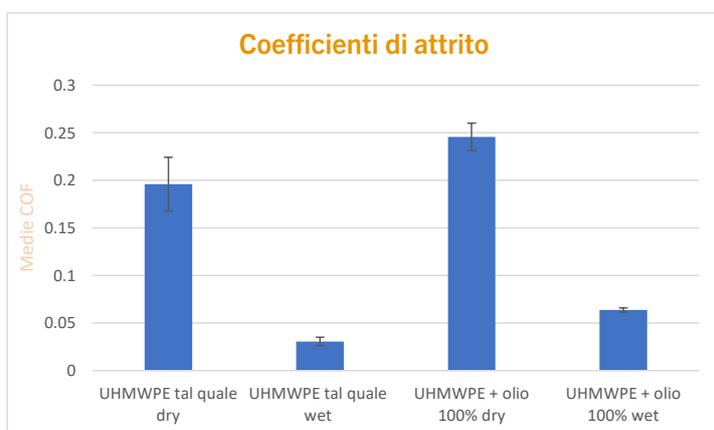


Figure 74: Medie dei COF

I campioni nella prima fase di rodaggio del test subiscono un'iniziale lucidatura, per poi diventare più rugosi a causa delle particelle di usura che si creano (usura abrasiva). L'aumento del COF che si nota in alcuni grafici verso la fine, con leggere oscillazioni, è dovuta alla deformazione plastica che si ha per questo materiale e proprio all'usura e creazione di terzo corpo.

I valori ottenuti nel caso di condizioni dry e UHMWPE tal quale rispecchiano ciò che si trova in letteratura (COF \approx 0.2-0.25), anche se sono stati utilizzati diversi parametri come una forza maggiore e una ball di CrCoMo o Titanio¹⁵⁰.

In condizioni wet per il tal quale si ha sempre una situazione simile a ciò che si trova in letteratura, con un valore di COF che va da 0.03 a 0.05¹⁵⁰⁻¹⁵¹.

Osservando quello che succede per l'UHMWPE soaked con l'EO al 100% si vede, contrariamente a quanto ci si aspettava, un aumento dell'attrito, forse perché questo ha un certo effetto sul materiale, favorendo in parte l'usura, impastandosi e formando del terzo corpo più consistente.

5.10 Profili e rugosità

Quindi si è passati al calcolo della rugosità superficiale del campione tal quale e di quello con l'olio essenziale, usati nelle prove precedenti in condizioni dry, per poter spiegare meglio i risultati; sono stati ricavati 4 valori, dei quali è stata fatta la media riportata in Tabella 16:

Tabella 16: Parametri di rugosità

	UHMWPE tal quale (μm)	UHMWPE + olio 100% (μm)
R_a	0.175 \pm 0.01290994	0.14075 \pm 0.020790623
R_z	1.4875 \pm 0.1223	1.3825 \pm 0.40737

R_{ku}	4.08 ± 0.451	6.315 ± 3.2867
R_{sk}	-0.2704 ± 0.4775	0.23075 ± 0.7711
R_t	2.08 ± 0.4586	2.8175 ± 1.9

Mentre le mappe in 3D e i profili bidimensionali della traccia, dai quali sono stati ricavati l'area e la profondità, sono mostrati di seguito nelle Figure 75, 76 e nella Tabella 17, mettendo insieme la tipologia di immagine per un paragone più diretto:

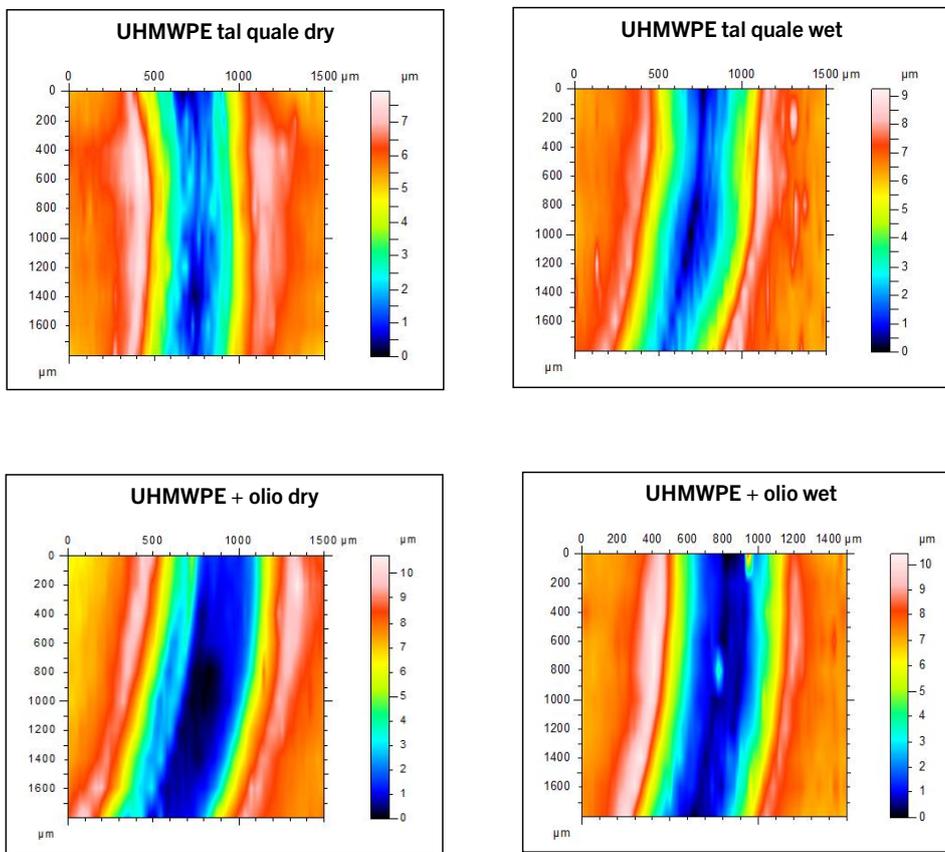
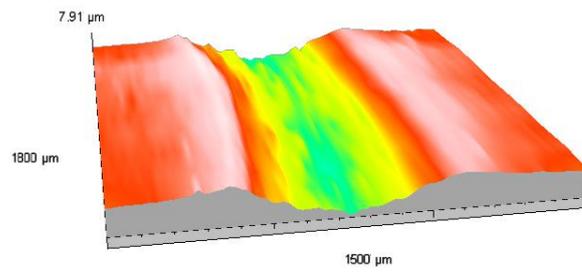
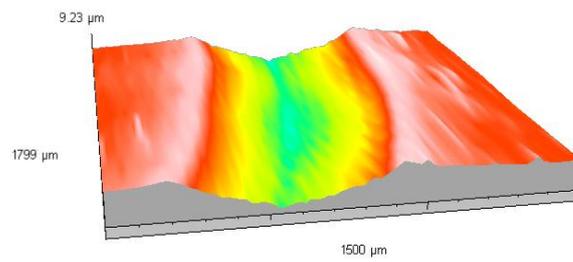


Figura 75: Mappatura tramite profilometro da cui ricaviamo i profili e la mappa 3D

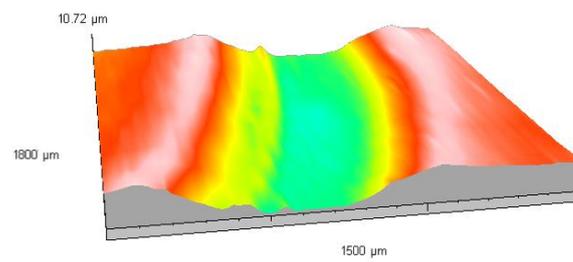
UHMWPE tal quale dry →



UHMWPE tal quale wet →



UHMWPE + olio dry →



UHMWPE + olio wet →

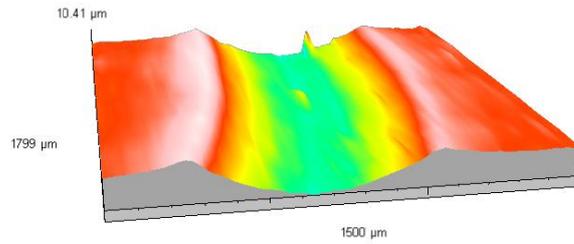
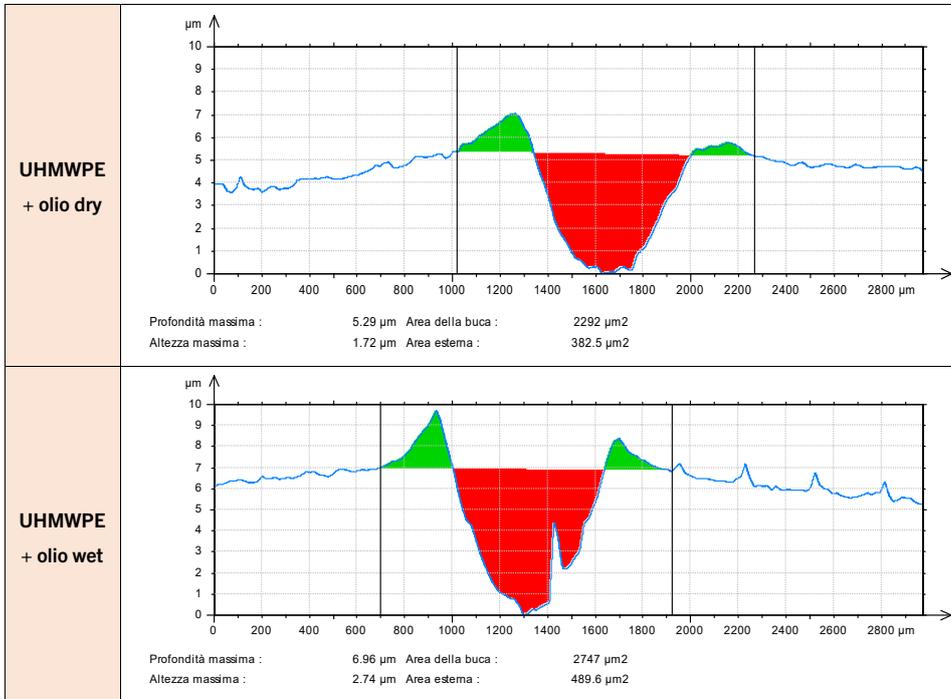


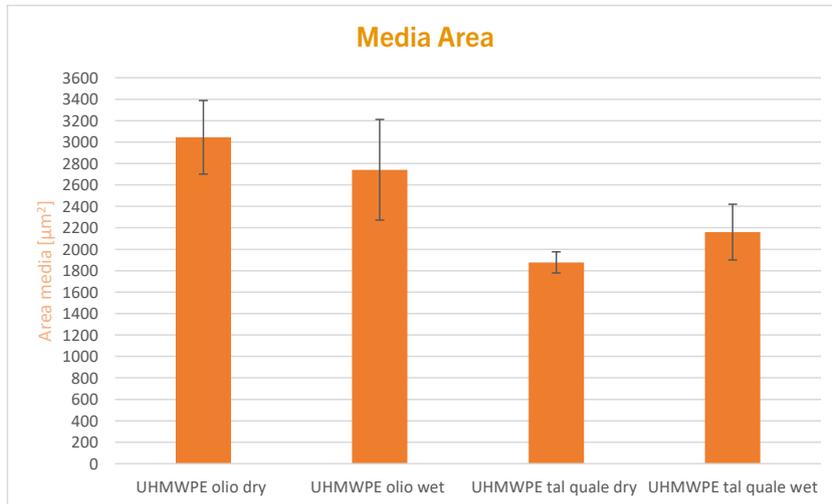
Figura 76: Mappe 3D della traccia

Tabella 17: Profili 2D della traccia

<p>UHMWPE tal quale dry</p>	<p>Profondità massima : 5.15 μm Area della buca : 1820 μm² Altezza massima : 1.47 μm Area esterna : 287.5 μm²</p>
<p>UHMWPE tal quale wet</p>	<p>Profondità massima : 6.03 μm Area della buca : 2114 μm² Altezza massima : 2.23 μm Area esterna : 421 μm²</p>



Considerando i valori di Area e Profondità sono stati ricavati gli istogrammi delle medie (Figura 77):



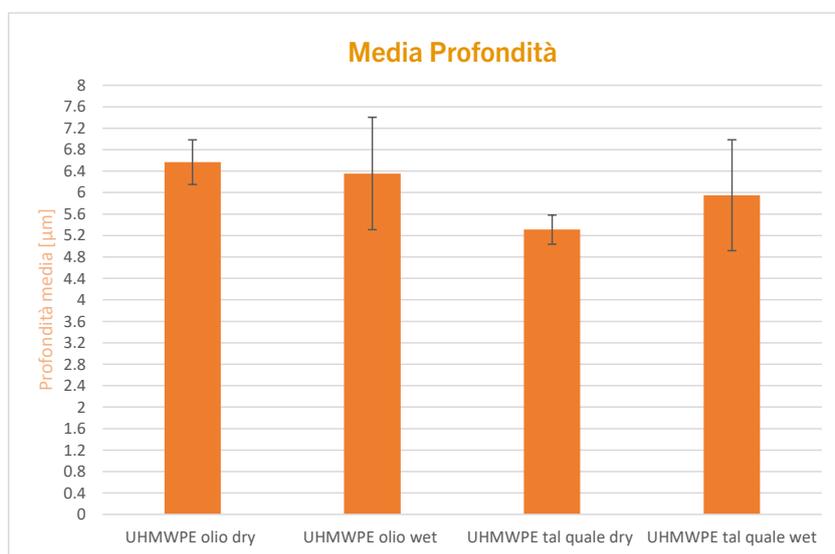


Figura 77: Confronto tra le medie dei valori di profondità e area della traccia

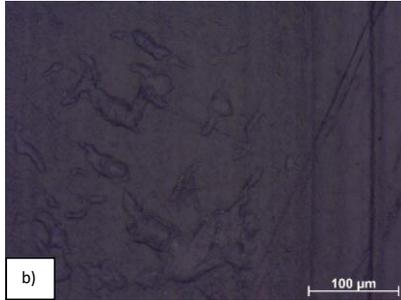
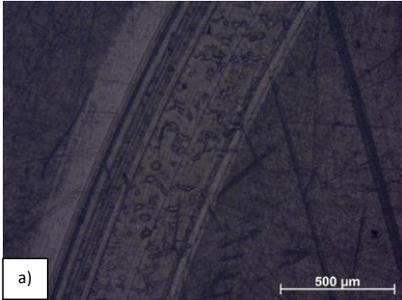
Da ciò che si può vedere nei profili, il materiale tende a creare una deformazione plastica visibile ai bordi della traccia (che però in questo contesto non è stata calcolata), in alcuni casi più netta da un lato rispetto all'altro; inoltre talvolta sono presenti rugosità anche all'interno, dovute all'usura da terzo corpo.

Guardando i valori complessivi di profondità e area si nota come ci sia un riscontro di ciò che è stato visto nel caso del coefficiente di attrito, con valori un po' più alti in presenza dell'olio.

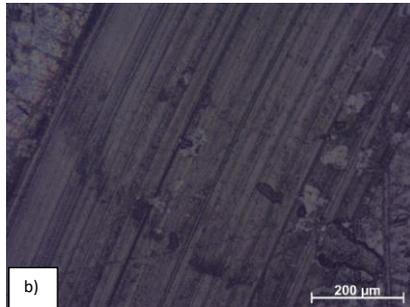
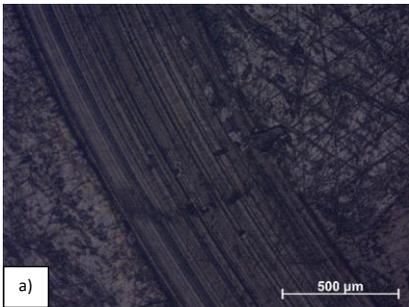
Non si ha quindi un miglioramento delle caratteristiche tribologiche, dimostrando l'assenza di uno strato di rivestimento uniforme.

5.11 Microscopia

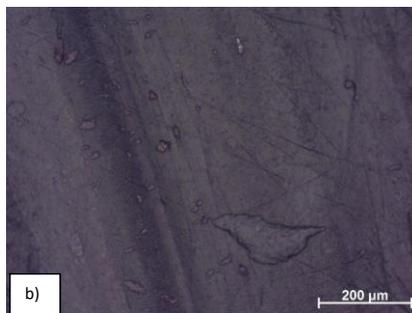
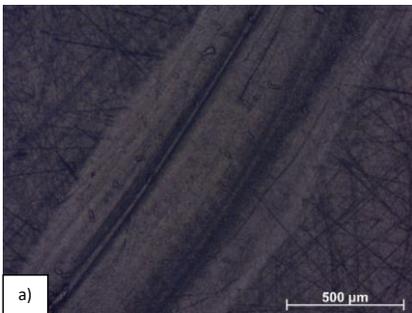
In tale contesto si è deciso di osservare con il microscopio ottico se ci fossero evidenti cambiamenti al di sopra dell'UHMWPE (Figura 78).



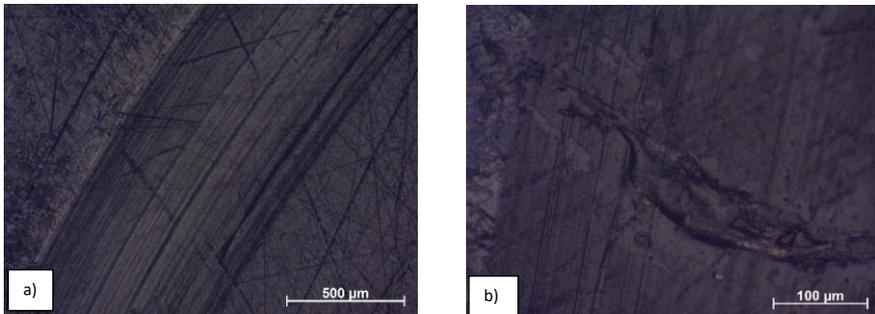
UHMWPE tal quale dry: a) ingrandimento 5x, b) ingrandimento 20x



UHMWPE tal quale wet: a) ingrandimento 5x, b) ingrandimento 10x



UHMWPE + olio dry: a) ingrandimento 5x, b) ingrandimento 10x



UHMWPE + olio wet: a) ingrandimento 5x, b) ingrandimento 20x

Figura 78: Immagini in microscopia dei diversi campioni sottoposti alle prove tribologiche

Si notano, dagli ingrandimenti in 5x, delle immagini della traccia tra loro diverse, in alcuni casi con dei graffi (in direzione più obliqua rispetto allo scorrimento) dovuti a una non completa lucidatura iniziale; in condizioni secche si osserva la formazione di pori, causati dalla rimozione di pezzettini di UHMWPE, e sul materiale immerso nell'olio si vede una traccia non uniforme. La presenza di numerose righe, soprattutto in condizioni secche, è data da una deformazione plastica, successiva al riscaldamento dell'area con l'attrito, unita all'usura da abrasione. Le ulteriori irregolarità presenti nelle diverse condizioni ma soprattutto nel caso del materiale tal quale e non lubrificato, sono probabilmente date dal fenomeno di delaminazione che si verifica sull'UHMWPE sottoposto a queste prove¹⁵²⁻¹⁵³. Nell'ultimo ingrandimento a 20x dell'UHMWPE + olio in condizioni lubrificate si rileva la mancanza di un pezzo più importante di materiale, forse dovuto ad un difetto del campione.

5.12 Test biologici

5.12.1 Citocompatibilità

In Figura 79 si riportano i risultati della citocompatibilità diretta e indiretta: nel primo caso, con un contatto diretto con la superficie del polimero immerso nell'olio, abbiamo una riduzione significativa ($p < 0.01$) nell'attività metabolica cellulare. La conferma di ciò è data dalla visualizzazione ottica del distacco delle cellule dopo l'aggiunta del mezzo. Invece nel caso del contatto indiretto, non è riportato alcun effetto tossico, sia sull'attività metabolica delle cellule, che sulla loro morfologia che rimane simile a quella di cellule coltivate con un mezzo di controllo nuovo e con eluati di 7 giorni.

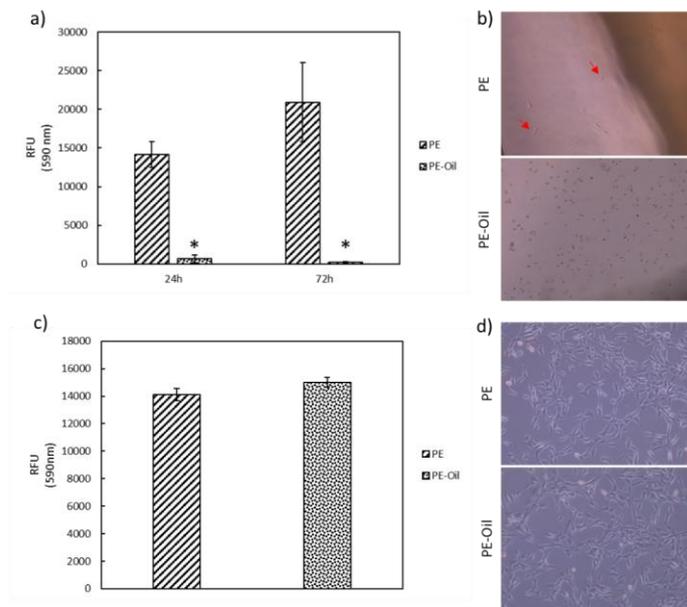


Figura 79: Valutazione della citocompatibilità. a) attività metabolica delle cellule nella valutazione diretta dopo 24h e 72h; b) immagini rappresentative del distacco delle cellule dopo 6 h dalla semina; c) valutazione dell'attività metabolica indiretta dopo 24h; d) morfologia delle cellule in contatto con gli eluati raccolti dal campione (*p<0.01).

5.12.2 Attività antibatterica

Nella Figura 80 si riportano i risultati dei test di antibattericità: l'olio presente sulla superficie non è efficace nel ridurre l'attività metabolica dei batteri, paragonato al controllo (UHMWPE tal quale). Inoltre il trattamento non è efficace contro i batteri aderenti e quelli planctonici, come dimostrato rispettivamente dai test di CFU e live/dead.

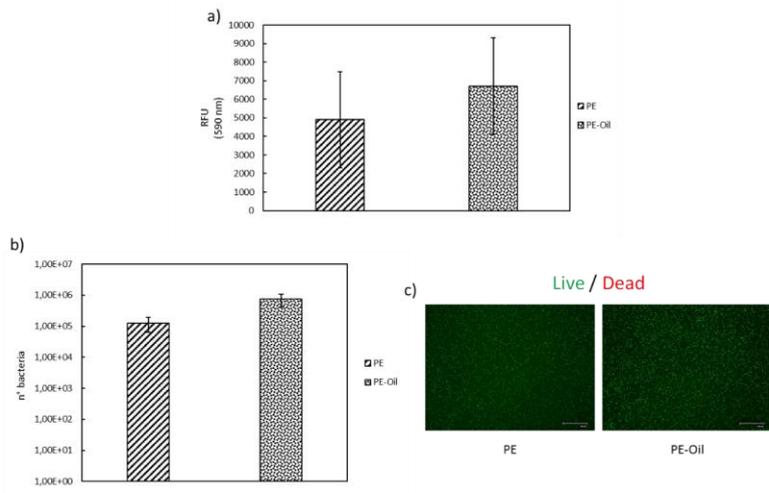


Figura 75: Valutazione antibatterica. A) attività metabolica batterica sulla superficie del materiale; b) numero di batteri vitali aderenti sulla superficie del materiale; c) batteri vitali presenti nella forma planctonica

6. Conclusioni

La crescente diffusione di batteri resistenti agli antibiotici attualmente esistenti ha reso necessaria la ricerca di metodi innovativi per la prevenzione e il trattamento delle infezioni; è esaminato tra questi l'impiego gli oli essenziali, avendo mostrato, in diversi studi, delle potenzialità antibatteriche, antiparassitarie, antiossidative e antivirali e rappresentando un'alternativa non inquinante. Alcuni studi correnti sono indirizzati ad un uso combinato durante la terapia di antibiotici convenzionali e oli essenziali, in modo da ridurre l'impiego dei primi e sfruttare le potenzialità dei secondi, ma è importante comprendere quali componenti (o loro combinazione) tra questi abbia effetti specifici, individuare le dosi sicure e valutare la loro potenzialità applicativa in combinazione con i materiali da impianto.

Nello specifico in questo studio si è andato a valutare l'effetto dell'aggiunta di olio essenziale di *Mentha piperita* di Pancalieri sulla superficie di materiali molto utilizzati negli impianti protesici quali il titanio e il polietilene ad elevatissimo peso molecolare (UHMWPE). Nel caso del titanio l'obiettivo è ottenere una superficie antibatterica per il contatto con i tessuti molli (es. colletto impianti dentali) mentre per il polietilene l'idea è quella di migliorare le proprietà tribologiche (sfruttando un possibile effetto lubrificante dell'olio) e antibatteriche (sfruttando le potenzialità antimicrobiche dell'olio). Una prima piccola parte del lavoro è stata dedicata al titanio, per il quale sono state esplorate la funzionalizzazione e il rivestimento, mentre la parte più corposa del lavoro è stata dedicata al polietilene per il quale è stato valutato l'uptake di olio da soluzioni a diversa concentrazione fino al 100%.

Lo strato di olio che viene a formarsi è differente per i due materiali, dato che nel caso del titanio sembra essere più spesso e superficiale, mentre nel polietilene tende in parte ad essere assorbito (per questo si parla di immersione e non funzionalizzazione). Le analisi successive al SEM, ADC, FTIR confermano la presenza dell'olio su entrambi, in particolar modo nel caso di UHMWPE soaked al 100% e titanio coated, anche se lo strato non sembra uniformemente distribuito.

Valutando però le potenzialità sul polimero, l'EO considerato non sembra avere ottime qualità lubrificanti a seguito dell'uptake sul materiale, probabilmente a causa di una viscosità molto bassa (molto simile a quella dell'acqua) e provocando un leggero aumento del COF e della profondità e area della traccia nei test tribologici di pin-on-disk. Anche per quanto riguarda le capacità antimicrobiche, l'olio di *Mentha* di Pancalieri non sembra conferire al polietilene spiccate proprietà antibatteriche o batteriostatiche. Si è inoltre osservato, un effetto tossico nel caso di contatto diretto con le cellule, ma non nel caso di test di citotossicità indiretta, indice probabilmente del mancato rilascio nei mezzi di coltura. Questo dato evidenzia la possibilità di utilizzare una sostanza di questo tipo in applicazioni, come quella articolare dove non si ha un contatto diretto con le cellule tissutali.

Alla luce dei risultati ottenuti, si evince come la composizione dell'EO selezionato o le modalità di accoppiamento con il materiale non lo rendano adeguato agli scopi del lavoro; per questo motivo si potrebbero valutare gli effetti di un diverso metodo di estrazione che lo renda più viscoso o di un rilascio più controllato tramite una modifica del trattamento scelto per legare la sostanza sul materiale, in modo da ridurre la sua tossicità e migliorarne l'aspetto lubrificante e antibatterico.

Ringraziamenti

In primo luogo voglio ringraziare la Prof. Silvia Spriano e la Dott.ssa Sara Ferraris per la pazienza e disponibilità dimostrata durante questo lavoro, comprendendo e colmando le mie lacune nella fase iniziale e continuando a guidarmi durante il percorso, con particolare costanza.

Grazie a coloro che hanno collaborato in questo lavoro: ad Andrea Cochis e ai suoi collaboratori del Dipartimento di Scienze della Salute presso l'Università del Piemonte Orientale UPO, per aver messo a disposizione le loro conoscenze e la strumentazione per completare questo studio; a Giovanna dell'Istituto di Scienze e Tecnologie per l'Energia e la Mobilità Sostenibili (STEMS), al Consiglio Nazionale delle Ricerche, grazie alla quale ho potuto dare inizio alla mia tesi con l'uscita fuori porta in azienda, ho condiviso la sorpresa nell'apprezzare l'associazione menta-cioccolato, ho avuto un supporto continuo nelle analisi finali che son sembrate interminabili e la possibilità di conoscere persone genuine e di buon cuore.

Ringrazio la mia famiglia per il sostegno in questo lungo tragitto, con alti e bassi; so che non è stato facile per nessuno di noi. Eli, sei stata la toppa sopra ogni mio errore e il mio calmante naturale; hai fatto tuo il ruolo di sorella maggiore fin da subito e con gli anni hai avuto la pazienza di studiarmi fino a comprendermi. Avrei molto altro per cui ringraziarti, non essendo tuttavia brava con le parole cerco e cercherò di farlo con i miei gesti. Grazie Giukio, perché hai reso Eli la persona che è oggi e per essere stato per me una presenza costante e oltre che un supporto e aiuto da ormai qualche anno. Grazie per la disponibilità. Papà tu hai provato a darmi il giusto indirizzo fin da subito, ma malgrado la mia incostanza non hai mai perso le speranze e io, malgrado i tuoi silenzi, ho percepito sempre il tuo appoggio. Mamma, sei così maledettamente cocciuta, ma il tuo cambiamento con il tempo è una delle poche cose che maggiormente mi ha sorpresa. Sei il mio tormento e a modo tuo la mia sostenitrice, anche se io non sempre lo capisco.

Andrea avrei un'infinità di motivi per cui ringraziarti, ma a te devo principalmente l'essere giunta fin qui: con gli anni sei arrivato a credere in me più di quanto faccia io, hai saputo darmi i giusti stimoli insieme a quel pizzico di coraggio e sicurezza necessari e sei disposto a continuare a nutrirmi con tutto ciò, malgrado spesso ti trovi a dover abbattere un muro spesso. Sei la mia fonte di ispirazione.

Chiara e Giada siete state sorprendentemente sempre la mia ancora di salvezza e le mie supporter durante tutto il percorso, intuendo quali fossero le parole giuste da pronunciare in determinate situazioni; la distanza ci ha solo dato degli argomenti in più per i quali perdere la voce una volta riviste.

Valeria ti ringrazio perché il superamento di gran parte dei miei ultimi esami lo devo a te, mi hai donato il tuo sapere senza condizioni e fino all'ultimo sapevo che rivolgendomi a te avrei trovato la risposta

che cercavo, grazie alle tue innumerevoli esperienze di chissà quante vite vissute e la memoria infallibile.

Dani, Max, Seba, Ceci ed Ele insieme siamo stati autodistruttivi dal punto di vista universitario, ma per me anche una fonte di spensieratezza e gioia, costruendo dei ricordi della maggior parte dei quali molto probabilmente non avrò memoria. Ci siamo lasciati e ritrovati vivendo esperienze diverse che non hanno però modificato i nostri caratteri e quindi il legame presente. Mi piace pensare che ci sia ancora molta strada da intraprendere insieme, magari da sobri.

Jurgi sei la collega di corso che conosco da più tempo e anche la mia prima compagna di uscite; grazie per non avermi abbandonata malgrado fossi lenta nel comprendere ogni argomento di informatica e per essere stata sempre te stessa con me, premurosa e affettuosa.

Bibliografia

- [1] **K. Wińska, W. Maczka, J. Łyczko, M. Grabarczyk, A. Czubaszek, and A. Szumny**, "[Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative?](#)", *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Molecules*, 2130, (2019)
- [2] **D. Macheboeuf, D.P. Morgavi, Y. Papon, J.-L. Mousset, M. Arturo-Schaan**, "Dose–response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population", *Animal Feed Science and Technology*, Volume 145, Issues 1–4, 335-350, (2008)
- [3] **A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H. Aït Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F.N.R. Renaud, A. Elaissari**, "[Essential oils: From extraction to encapsulation](#)", *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 483, Issues 1-2, 220-243, (2015)
- [4] **F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar**, "[Biological effects of essential oils – A review](#)", *Food and Chemical Toxicology*, Volume 46, Issues 2, 446-475, (2008)
- [5] **Jean Baptiste Hzounda Fokou, Pierre Michel Jazet Dongmo e Fabrice Fekam Boyom**, "[Essential Oil's Chemical Composition and Pharmacological Properties](#)", (2020)
- [6] **Javad Sharifi-Rad, Antoni Sureda, Gian Carlo Tenore, Maria Daglia, Mehdi Sharifi-Rad, Marco Valussi, Rosa Tundis, Marzieh Sharifi-Rad, Monica R. Loizzo, Adedayo Oluwaseun Ademiluyi, Razieh Sharifi-Rad, Seyed Abdulmajid Ayatollahi, e Marcello Iriti**, "Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems", *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Molecules*, 22(1):70, (2017)
- [7] <https://it.wikipedia.org/wiki/Isoprene>
- [8] **J.D. Thompson, J.C. Chalchat, A. Michet, Y.B. Linhart, B. Ehlers**, "Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes", *Journal of Chemical Ecology*, 29 (4): 859-80, (2003)
- [9] **M. Melegari**, "L'olio essenziale: variabilità, metodiche estrattive, tecnologie" (2011)
- [10] **Hesham H. A. Rassem, Abdurahman H. Nour, Rosli M. Yunus**, "[Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review](#)", *Australian journal of basic and applied sciences*, 117-127, (2016)
- [11] <https://www.oliessenziali.eu/prodotto/metodi-di-estrazione/>
- [12] <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html#solvent-extraction>
- [13] **T. Geramitcioski, V- Mitrevski e V. Mijakovski**, "[Design of a small press for extracting essential oil according VDI 2221](#)", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, (2018)

ha formattato: Colore carattere: Testo 1

ha formattato: Colore carattere: Testo 1

ha formattato: Tipo di carattere: Grassetto, Colore carattere: Testo 1

ha formattato: Tipo di carattere: Grassetto, Colore carattere: Testo 1

ha formattato: Tipo di carattere: Grassetto, Colore carattere: Testo 1

ha formattato: Colore carattere: Testo 1

ha formattato: Tipo di carattere: Grassetto, Colore carattere: Testo 1

ha formattato: Tipo di carattere: Grassetto, Colore carattere: Testo 1

ha formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto, Colore carattere: Testo 1

Codice campo modificato

- [14] **Pascaline Aimee Uwineza e Agnieszka Waśkiewicz**, "Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials", *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Molecules*, 25(17): 3847, (2020)
- [15] **G.N.Sapkale, S.M. Patil, U.S. Sirwase e P.K. Bhatbhage**, "Supercritical Fluid Extraction- a review", *International Journal of Chemical Sciences*, 729-743, (2010)
- [16] **A. Haghghi Asl e M. Khajenoori**, "[Subcritical Water Extraction](#)", libro: Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modelin (pp.29), Capitolo 17, (2013)
- [17] **Yan Cheng, Fumin Xue, Shuai Yu, Shichao Du e Yu Yang**, "Subcritical Water Extraction of Natural Products", *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Molecules*, 26(13): 4004, (2021)
- [18] **Min-Jung Ko, Hwa-Hyun Nam & Myong-Soo Chung**, "Subcritical water extraction of bioactive compounds from *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae)", *Sci Rep* **10**, 10890 (2020)
- [19] **Mohammad H. Eikani, Fereshteh Golmohammad, Soosan Rowshanzamir**, "Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.)", *Journal of Food Engineering* 80(2): 735-740, (2007)
- [20] **Ying Li, Anne Sylvie Fabiano-Tixier, Maryline Abert Vian, Farid Chemat**, "Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry", *Trends in Analytical Chemistry (TrAC)*, Volume 47, pagine 1-11, (2013)
- [21] **R. Amorati, M. C. Foti, e L. Valgimigli**, "Antioxidant Activity of Essential Oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46): 10835-10847, (2013)
- [22] https://it.wikipedia.org/wiki/Perossidazione_lipidica
- [23] [https://www.univpm.it/Entra/Engine/RAServeFile.php/f/P002330/allegati_ins/Chill\(0910\)Dia05Antiossidanti.pdf](https://www.univpm.it/Entra/Engine/RAServeFile.php/f/P002330/allegati_ins/Chill(0910)Dia05Antiossidanti.pdf)
- [24] **Chircov C, Miclea II, Grumezescu V, Grumezescu AM**. "Essential Oils for Bone Repair and Regeneration-Mechanisms and Applications", *Materials (Base)*. 2021 Apr 9;14(8):1867. doi: 10.3390/ma14081867. PMID: 33918697; PMCID: PMC8069393.
- [25] <http://www.oeige.it/images/formazione/infezioni-ospedaliere/i-batteri.pdf>
- [26] **Caterina Sbaffi, Elena Olmastroni, Elena Tragni**, "Antibiotico-resistenza: cause, conseguenze, strategie di ricerca e politiche sanitarie per contrastarla"
- [27] <https://scoiattolorampante.wordpress.com/2012/05/27/il-potere-antimicrobico-degli-oli-essenziali-parte-i/#:~:text=Una%20caratteristica%20importante%20dei%20componenti,cellula%20e%20causare%20la%20morte>
- [28] **López Romo A, Quirós R.**, "Appropriate use of antibiotics: an unmet need", *Ther Adv Urol*. 2019

ha formattato: Tipo di carattere: Non Grassetto, Colore carattere: Automatico

- [29] **Ana Paula Longaray Delamare, Ivete T. Moschen-Pistorello, Liane Artico, Luciana Atti-Serafini, Sergio Echeverrigaray**, “Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil”, *Food Chemistry*, Volume 100, Issue 2, Page 603-608, (2007)
- [30] **Yunbin Zhang, Xiaoyu Liu, Yifei Wang, Pingping Jiang, SiewYoung Quek**, “Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*”, *Food Control*, Volume 59, Page 282-289, (2016)
- [31] **Haiying Cui, Chenghui Zhang, Changzhu Li, Lin Lin**, “Antibacterial mechanism of oregano essential oil”, *Industrial Crops and Products*, Volume 139, 111498, (2019)
- [32] **Jouki M, Mortazavi SA, Yazdi FT, Koocheki A.**, “Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil”, *Carbohydr Polym.* Jan;99:537-46. doi: 10.1016/j, (2014)
- [33] **Aelenei P, Rimbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoia AC, Brebu M, Horhoge CE, Miron A.**, “Coriander essential oil and linalool - interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria”, *Lett Appl Microbiol*, 68(2):156-164, (2019)
- [34] **Ehsani A, Alizadeh O, Hashemi M, Afshari A, Aminzare M.**, “Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Melissa officinalis* and *Dracocephalum moldavica* essential oils”, *Vet Res Forum*, 8(3):223-229, (2017)
- [35] **Insawang S, Pripdeevech P, Tanapichatsakul C, Khruengsai S, Monggoot S, Nakham T, Artrod A, D'Souza PE, Panuwet P.** “Essential Oil Compositions and Antibacterial and Antioxidant Activities of Five *Lavandula stoechas* Cultivars Grown in Thailand”, *Chem Biodivers*, (2019)
- [36] **Raeiszadeh M, Pardakhty A, Shariffar F, Farsinejad A, Mehrabani M, Hosseini-Nave H, Mehrabani M.**, “Development, physicochemical characterization, and antimicrobial evaluation of niosomal myrtle essential oil”, *Res Pharm Sci*, 13(3):250-261, (2018)
- [37] **Abdollah Ghasemi Pirbalouti, Iraj Hossayni, Hamze-Ali Shirmardi**, “Essential oil variation, antioxidant and antibacterial activity of mountain fennel (*Zaravschanica membranacea* (Boiss.) M. Pimen”, *Industrial Crops and Products*, Volume 50, Page 443-448, (2013)
- [38] **Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V.**, “Anticancer activity of essential oils: a review”, *J Sci Food Agric.*, 93(15):3643-53. doi: 10.1002/jsfa.6267, (2013)
- [39] **Ron Cuba**, “Toxicity myths essential oils and their carcinogenic potential”, *International Journal of Aromatherapy*, Volume 11, Issue 2, Page 76-83, (2001)
- [40] <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/366-measuring-toxicity>
- [41] **Rojas-Armas, J., Arroyo-Acevedo, J., Ortiz-Sánchez, M. et al.**, “Acute and Repeated 28-Day Oral Dose Toxicity Studies of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil in Rats”, *Toxicol Res.* 35, 225–232 (2019)

- [42] **Claudia Turek and Florian Conrad Stintzing**, “Stability of Essential Oils: A Review”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Volume:12, Page: 40-53, (2013)
- [43] **Hamid Majeed, Yuan-Yuan Bian, Barkat Ali, Anjum Jamil, Usman Majeed, Qaiser Farid Khan, Khalid Javed Iqbal, Charles F. Shoemaker e Zhong Fang**, “Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends”, Issue 72, (2015)
- [44] **Tullio V, Roana J, Scalas D, Mandras N.**, “Evaluation of the Antifungal Activity of *Mentha x piperita* (Lamiaceae) of Pancalieri (Turin, Italy) Essential Oil and Its Synergistic Interaction with Azoles”, *Molecules*, (2019)
- [45] **Zárybnický T, Matoušková P, Lancošová B, Šubrt Z, Skálová L, Boušová I.**, “Inter-Individual Variability in Acute Toxicity of R-Pulegone and R-Menthofuran in Human Liver Slices and Their Influence on miRNA Expression Changes in Comparison to Acetaminophen”, *Int J Mol Sci*, (2018)
- [46] **Engel W.**, “In vivo studies on the metabolism of the monoterpene pulegone in humans using the metabolism of ingestion-correlated amounts (MICA) approach: explanation for the toxicity differences between (S)-(-)- and (R)-(+)-pulegone”, *J Agric Food Chem.*, (2003)
- [47] **S. Cyrus Khojasteh and Shimako Oishi and Sidney D. Nelson**, “Metabolism and toxicity of menthofuran in rat liver slices and in rats”, *Chemical research in toxicology*, Volume: 23 11, Page:1824-32, (2010)
- [48] **Baibars M, Eng S, Shaheen K, Alraies AH, Alraies MC.**, “Menthol toxicity: an unusual cause of coma”, *Case Rep Med.*, (2012)
- [49] <https://ortopediaborgotaro.it/otb-news-per-il-paziente-ortopedia-borgotaro/164-il-fallimento-di-una-protesi-articolare-la-chirurgia-di-revisione-quando-ne-ho-bisogno>
- [50] **Yufang Bi, Guixue Xia, Chao Shi, Jianglin Wan, Longqiang Liu, Yuan Chen, Yueming Wu, Wenjing Zhang, Min Zhou, Hongyan He, Runhui Liu**, “Therapeutic strategies against bacterial biofilms”, *Fundamental Research*, Volume 1, Issue 2, Page 198-212, (2021)
- [51] <https://dstunisannio.it/sites/default/files/2019-11/3.Biofilm%20microbici%20p1.pdf>
- [52] <https://simsi.it/il-batiscafo-ossigeno-terapia-iperbarica/il-microbioma-di-una-lesione-cutanea-come-rompere-lequilibrio-batterico/>
- [53] **Chen L, Song X, Xing F, Wang Y, Wang Y, He Z, Sun L.**, “A Review on Antimicrobial Coatings for Biomaterial Implants and Medical Devices”, *J Biomed Nanotechnol.*, (2020)
- [54] **Vaidya MY, McBain AJ, Butler JA, Banks CE, Whitehead KA**, “Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Planktonic and Biofilm Phenotypes”, *Scientific Reports*, volume 7, (2017)
- [55] **Kalelkar PP, Riddick M, García AJ.**, “Biomaterial-based delivery of antimicrobial therapies for the treatment of bacterial infections”, *Nat Rev Mater.* (2022)

- [56] **Shatavari Kulshrestha, e Asad U. Khan**, “Nanomedicine for anticancer and antimicrobial treatment: an overview”, *IET Nanobiotechnol.*, doi: [10.1049/iet-nbt.2018.5112](https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5112), (2018)
- [57] **Mijnendonckx K, Leys N, Mahillon J, Silver S, Van Houdt R.**, “Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance”, *Biomaterials*, (2013)
- [58] **Christiane Beer, Rasmus Foldbjerg, Yuya Hayashi, Duncan S. Sutherland, Herman Autrup**, “Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion?”, *Toxicology Letters*, Volume 208, Issue 3, Pagine 286-292, (2012)
- [59] **Xiang Ge**, “Antimicrobial biomaterials with non-antibiotic strategy”, *Biosurface and Biotribology*, Volume 5, Issue 3, Pagine:71-82, (2019)
- [60] **Yu, Q. L. et al.**, “Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells”, *Sci. Rep.* 6, 26667, doi:10.1038/srep26667 (2016)
- [61] **TP Shareena Dasari, Y Zhang, e H Yu**, “Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Gold (I) and (III) Ions and Gold Nanoparticles”, *Biochem Pharmacol(Los Angel)*, 4(6): 199., doi: [10.4172/2167-0501.1000199](https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000199), (2015)
- [62] **Marzie Hejazy , Mohammad Kazem Koohi, Adele Bassiri Mohamad Pour, Davood Najafi**, “Toxicity of manufactured copper nanoparticles - A review”, *Nanomedicine Research Journal*, Pagine 1-9, (2018)
- [63] **Rizwan Ullah, Muhammad Sohail Zafar e Nazish Shahani**, “Potential fluoride toxicity from oral medicaments: A review”, *Iran J Basic Med Sci.*, doi: 10.22038/IJBMS.2017.9104, (2017)
- [64] **Vandebriel RJ, De Jong WH**, “A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles”, *Nanotechnol Sci Appl.* (2012)
- [65] **Ondrej Chlumsky, Sabina Purkrtova, Hana Michova, Hana Sykorova, Petr Slepicka, Dominik Fajstavr, Pavel Ulbrich, Jitka Viktorova, e Katerina Demnerova**, “Antimicrobial Properties of Palladium and Platinum Nanoparticles: A New Tool for Combating Food-Borne Pathogens“, *Int J Mol Sci.* doi: 10.3390/ijms22157892, (2021)
- [66] **Gopal, J., Hasan, N., Manikandan, M. et al.**, “Bacterial toxicity/compatibility of platinum nanospheres, nanocuboids and nanoflowers”, *Sci Rep* 3, 1260, <https://doi.org/10.1038/srep01260> (2013)
- [67] **Rita Teixeira-Santos, Marisa Gomes, Luciana C. Gomes, Filipe J. Mergulhão**, “Antimicrobial and anti-adhesive properties of carbon nanotube-based surfaces for medical applications: a systematic review”, *iScience*, Volume 24, Issue 1, (2021)
- [68] **Jia, Guang; Wang, Haifang; Yan, Lei; Wang, Xiang; Pei, Rongjuan; Yan, Tao; Zhao, Yuliang; Guo, Xinbiao**, “Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene”, *39(5)*, 1378–1383. doi:10.1021/es048729I, (2005)

- [69] **Liao, Ken-Hsuan; Lin, Yu-Shen; Macosko, Christopher W.; Haynes, Christy L.**, "Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts", *ACS Applied Materials & Interfaces* 3(7), 2607-2615, DOI: 10.1021/am200428v, 2011
- [70] **Pelin, M., Fusco, L., León, V. et al.**, "Differential cytotoxic effects of graphene and graphene oxide on skin keratinocytes", *Sci Rep* 7, 40572, <https://doi.org/10.1038/srep40572>, (2017)
- [71] **Sougata Jana¹ and Subrata Jana**, "Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems", *Functional Chitosan.*, doi: 10.1007/978-981-15-0263-7_15, (2020)
- [72] **Julie Frigaard, Janicke Liaaen Jensen, Hilde Kanli Galtung e Marianne Hiorth**, "The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan Based Nanoparticles", *Pharmacol*, (2022)
- [73] **S. M. Kelleher, O. Habimana, J. Lawler, B. O' Reilly, S. Daniels, E. Casey, and A. Cowley**, "Cicada Wing Surface Topography: An Investigation into the Bactericidal Properties of Nanostructural Features", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8 (24), 14966-14974, DOI: 10.1021/acsami.5b08309, (2016)
- [74] **Jenkins, J., Mantell, J., Neal, C. et al.**, "Antibacterial effects of nanopillar surfaces are mediated by cell impedance, penetration and induction of oxidative stress", *Nat Commun* 11, 1626, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15471-x>, (2020)
- [75] **Watson GS, Green DW, Schwarzkopf L, Li X, Cribb BW, Myhra S, Watson JA**, "A gecko skin micro/nano structure - A low adhesion, superhydrophobic, anti-wetting, self-cleaning, biocompatible, antibacterial surface", *Acta Biomater*, (2015)
- [76] **Green, D., Lee, KH., Watson, J. et al.**, "High Quality Bioreplication of Intricate Nanostructures from a Fragile Gecko Skin Surface with Bactericidal Properties", *Sci Rep* 7, 4102, <https://doi.org/10.1038/srep41023>, (2017)
- [77] **Meng Yang, Yonghui Ding, Xiang Ge, Yang Leng**, "Control of bacterial adhesion and growth on honeycomb-like patterned surfaces", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 135, Page 549-555, ISSN 0927-7765, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.010>. (2015)
- [78] **Sara Ferraris, Enrica Verné, Gissur Örylgsson, Paulo Tambasco, Felipe Perraro Sehn, Chuen-How Ng, Hilmar Janusson, Giuliana Banche, Valeria Allizond, Cinzia Margherita Bertea, Lia Rimondini, Andrea Cochis, Vincenzo Guarino, Alessio Varesano, Claudia Vineis, Giovanna Gautier di Confiengo e Silvia Spriano**, "Natural Coatings on Titanium Surfaces to Improve Their Biological Response", *Materials Proceedings* (MDPI), Volume2, <https://doi.org/10.3390/CIWC2020-06835> (2020)
- [79] **Rita Teixeira-Santos,¹ Marta Lima,¹ Luciana C. Gomes,¹ e Filipe J. Mergulha**, "Antimicrobial coatings based on chitosan to prevent implant-associated infections: A systematic review", Volume 24, Issue 12, (2021)

- [80] **Carvalho FM, Teixeira-Santos R, Mergulhão FJM, Gomes LC.**, “The Use of Probiotics to Fight Biofilms in Medical Devices: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *Microorganisms*, (2020)
- [81] **Virginia Sáenz de Viteri and Elena Fuentes**, “Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials”, *Tribology*, Le principali modifiche apportate al titanio puntano a migliorarne l’aspetto osteointegrativo e antibatterico DOI: 10.5772/55860, (2013),.
- [82] **Chen R, Willcox MD, Ho KK, Smyth D, Kumar N.**, “Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its in vivo antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models”, *Biomaterials*, pr;85:142-51. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.063, (2016)
- [83] **Gouveia, Z.; Perinpanayagam, H.; Zhu, J.**, “Development of Robust Chitosan–Silica Class II Hybrid Coatings with Antimicrobial Properties for Titanium Implants”, *Coatings*, 10, 534. <https://doi.org/10.3390/coatings10060534>, (2020)
- [84] **A. Sandeep Kranthi Kiran, T.S. Sampath Kumar, Govindaraj Perumal, Rutvi Sanghavi, Mukesh Doble, Seeram Ramakrishna**, “Dual nanofibrous bioactive coating and antimicrobial surface treatment for infection resistant titanium implants”, *Progress in Organic Coatings*, Volume 121, Pagine 112-119, ISSN 0300-9440, <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.04.028>, (2018)
- [85] **Wu Y, Zhou H, Zeng Y, Xie H, Ma D, Wang Z, Liang H.**, “Recent Advances in Copper-Doped Titanium Implants”, *Materials (Basel)*, Mar 22;15(7):2342. doi: 10.3390/ma15072342, (2022)
- [86] **Allizond, V.; Comini, S.; Cuffini, A.M.; Banche, G.**, “Current Knowledge on Biomaterials for Orthopedic Applications Modified to Reduce Bacterial Adhesive Ability”, *Antibiotics*, 11, 529. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040529>, (2022)
- [87] **Radin S, Ducheyne P**, “Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on titanium alloy fracture plate material”, *Biomaterials*, Mar;28(9):1721-9, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.035, (2007)
- [88] <https://www.totalplastics.com/product/lennite-implant-grade-uhmwpe/>
- [89] **Nikhil Avinash Patil, James Njuguna, Balasubramanian Kandasubramanian**, “UHMWPE for biomedical applications: Performance and functionalization”, *European Polymer Journal*, Volume 125, 109529, ISSN 0014-3057, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109529>, (2020)
- [90] **Ke Wu, Samuel P. Douglas, Gaowei Wu, Alexander J. MacRobert, Elaine Allan, Caroline E. Knapp e Ivan P. Parkin**, “A rugged, self-sterilizing antimicrobial copper coating on ultra-high molecular weight polyethylene: a preliminary study on the feasibility of an antimicrobial prosthetic joint material”, *J. Mater. Chem. B*, 7, 3310, (2019)
- [91] **Harrasser, N., Jüssen, S., Banke, I.J. et al**, “Antibacterial efficacy of ultrahigh molecular weight polyethylene with silver containing diamond-like surface layers. *AMB Expr* 5, 64 <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0148-x>, (2015)
- [92] **D. Delle Side, V. Nassisi, E. Giuffreda, L. Velardi, P. Alifano, A. Talà, S.M. Tredici**, “Highly antibacterial UHMWPE surfaces by implantation of titanium ions”, *Nuclear Instruments and*

- Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, Volume 331, Page 172-175, ISSN 0168-583X, <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2013.11.027>, (2013)
- [93] **Hassanein, N.**, "Evaluating the bioactivity and biocompatibility of nylon coated ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE)", [*Master's Thesis, the American University in Cairo*], *AUC Knowledge Fountain*, <https://fount.aucegypt.edu/etds/1568>, (2019)
- [94] **Jacqueline H Yim¹, Michelle S Fleischman, Victor Rodriguez-Santiago, Lars T Piehler, André A Williams, Julia L Leadore, Daphne D Pappas**, "Development of antimicrobial coatings by atmospheric pressure plasma using a guanidine-based precursor", *ACS Appl Mater Interfaces*, (22):11836-43, doi: 10.1021/am403503a, (2013)
- [95] **Jun-Beom Park, Gil Lee, Byeong Gon Yun, Chang-Hyen Kim, Youngkyung Ko**, "Comparative effects of chlorhexidine and essential oils containing mouth rinse on stem cells cultured on a titanium surface", *Mol Med Rep.*, 9(4):1249-53, doi: 10.3892/mmr.2014.1971, (2014)
- [96] **Vega, O., Araya, J.J., Chavarría, M. et al.**, "Antibacterial biocomposite materials based on essential oils embedded in sol-gel hybrid silica matrices", *J Sol-Gel Sci Technol*79, 584-595, <https://doi.org/10.1007/s10971-016-4045-9>, (2016)
- [97] **Magetsari PhD R, Dewo PhD P, Saputro Md BK, Lanodiyu Md Z.**, "Cinnamon Oil and Chitosan Coating on Orthopaedic Implant Surface for Prevention of Staphylococcus Epidermidis Biofilm Formation", *Malays Orthop J.*, 8(3):11-4. doi: 10.5704/MOJ.1411.003, (2014)
- [98] **Robu, A.; Antoniac, A.; Grosu, E.; Vasile, E.; Raiciu, A.D.; Iordache, F.; Antoniac, V.I.; Rau, J.V.; Yankova, V.G.; Ditu, L.M.; Saceleanu, V.**, "Additives Imparting Antimicrobial Properties to Acrylic Bone Cements. *Materials*, 14, 7031, <https://doi.org/10.3390/ma14227031>, (2021)
- [99] **M. Cazzolaa, S. Ferrarisa, V. Allizondb, C.M. Berteac, C. Novaraa, A. Cochisd, F. Geobaldoa, A. Bistolfie, A.M. Cuffinib, L. Rimondinid, G. Bancheb,1, S. Spriano**, "Grafting of the peppermint essential oil to a chemically treated Ti6Al4V alloy to counteract the bacterial adhesion", *Surface and Coatings Technology*, Volume 378, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125011>, (2019)
- [100] https://it.wikipedia.org/wiki/Liquido_sinoviale
- [101] <https://www.alamy.it/anatomia-dell-articolazione-sinoviale-capsula-articolare-con-liquido-sinoviale-e-membrana-illustrazione-vettoriale-image389526142.html>
- [102] **Max Marian, Raj Shah, Blerim Gashi, Stanley Zhang, Kiran Bhavnani, Sandro Wartzack, Andreas Rosenkranz**, "Exploring the lubrication mechanisms of synovial fluids for joint longevity – A perspective", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 206, 111926, ISSN 0927-7765, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111926>, (2021)
- [103] **Cristina Balagna, Maria Giulia Faga, Silvia Spriano**, "Tribological behavior of a Ta-based coating on a Co-Cr-Mo alloy", *Surface and Coatings Technology*, Volume 258, Pages 1159-1170, ISSN 0257-8972, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.07.016>, (2014)
- [104] **Seiichiro Hironaka**, "Boundary Lubrication and Lubricants", (2004)

- [105] **Zhexun Sun, Elizabeth Feeney, Ya Guan, Sierra G. Cook, Delphine Gourdon, Lawrence J. Bonassar e David Putnam**, "Boundary mode lubrication of articular cartilage with a biomimetic diblock copolymer", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Volume 16, Issue 25, Page:12437-12441, (2019)
- [106] **Subir Ghosh, Dipankar Choudhury, Nabangshu Shekhar Das, Belinda Pinguan-Murphy**, "Tribological role of synovial fluid compositions on artificial joints - A systematic review of the last 10 years", *Lubrication Science* 26(6), DOI:[10.1002/lis.1266](https://doi.org/10.1002/lis.1266), (2014)
- [107] **Dhorali Gnanasekaran, Venkata Prasad Chavidi**, "Vegetable Oil based Bio-lubricants and Transformer Fluids", *Springer Nature*, Singapore ISBN: 978-981-10-4869-2, DOI:[10.1007/978-981-10-4870-8](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4870-8), (2017)
- [108] **N.A. Zainal, N.W.M. Zulkifli, M. Gulzar, H.H. Masjuki**, "A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 82, Part 1, Pages 80-102, ISSN 1364-0321, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.004>, (2017)
- [109] **A. Dridi, W. Bensalah, S. Mezlini, S. Tobji, M. Zidi**, "Influence of bio-lubricants on the orthodontic friction", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Volume 60, Pages 1-7, ISSN 1751-6161, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.12.026>, (2016)
- [110] **A.Z. Syahir, N.W.M. Zulkifli, H.H. Masjuki, M.A. Kalam, Abdullah Alabdulkarem, M. Gulzar, L.S. Khuong, M.H. Harith**, "A review on bio-based lubricants and their applications", *Journal of Cleaner Production*, Volume 168, Pages 997-1016, ISSN 0959-6526, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.106>, (2017)
- [111] **Fabio Roveta**, "Oli vegetali: applicazione e possibili utilizzi in sostituzione degli oli di origine minerale", Tesi magistrale, Politecnico di Torino, (2020)
- [112] **Merola M, Affatato S.**, "Materials for Hip Prostheses: A Review of Wear and Loading Considerations", *Materials* (Basel), 12(3):495. doi: 10.3390/ma12030495, (2019)
- [113] **Wilson Wang and Chye Khoon Poh**, "Titanium Alloys in Orthopaedics", DOI: 10.5772/55353, (2013)
- [114] **Mitsuo Niinomi**, "Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods", *Science and Technology of Advanced Materials*, 4:5, 445-454, DOI: 10.1016/j.stam.2003.09.002, (2003)
- [115] **U.Anjaneyulu, V. Zhang, Pei-Gen Ren**, "Bioinert Ceramics for Biomedical Applications", *Biomedical Sci and Tech Series*, (2019)
- [116] **Sharon S. Brown, Ian C. Clarke**, "A Review of Lubrication Conditions for Wear Simulation in Artificial Hip Replacements", *Tribology Transactions*, Pages 72-78, <https://doi.org/10.1080/05698190500519223>, (2007)

- [117] **Subir Ghosh, Dipankar Choudhury, Nabangshu Shekhar Das, Belinda Pinguan-Murphy** “Tribological role of synovial fluid compositions on artificial joints - A systematic review of the last 10 years”, *Lubrication Science* 26(6), DOI:10.1002/lis.1266, (2014)
- [118] **Hironori Shinmori, Mayo Kubota, Takehiro Morita, Tetsuo Yamaguchi, Yoshinori Sawae,** “Effects of Synovial Fluid Constituents on Friction between UHMWPE and CoCrMo”, *Tribology Online*, Volume 15 Issue 4 Page 283-292, <https://doi.org/10.2474/trol.15.283>, (2020)
- [119] **Mazzucco D, Spector M.**, “The John Charnley Award Paper— The role of joint fluid in the tribology of total joint arthroplasty”, *Clin Orthop Relat Res*;429:17–32, (2004)
- [120] **Arad, Shoshana (Malis); Rapoport, Lev; Moshkovich, Alex; van Moppes, Dorit; Karpasas, Mark; Golan, Roxana; Golan, Yuval,** “Superior Biolubricant from a Species of Red Microalga”, *Langmuir*, 22(17), 7313- 7317. doi:10.1021/la060600x), (2006)
- [121] **Li, Jinjin; Liu, Yuhong; Luo, Jianbin; Liu, Pengxiao; Zhang, Chenhui,** “Excellent Lubricating Behavior of *Brasenia schreberi* Mucilage”, *Langmuir*, 28(20), 7797–7802, doi:10.1021/la300957v), (2012)
- [122] **Wenrui Liu, Kunpeng Wang, Jian Song, Lin Zhang, Yuhong Liu,** “Ultralow friction of basil-based gel in the presence of ethanol as a green lubricant for biomedical applications”, *Tribology International*, Volume 165, 107320, ISSN 0301-679X, <https://doi.org/10.1016/j.triboint.2021.107320>, (2022)
- [123] **Xu, J.; Luo, J. B.; Liu, S. H.; Xie, G. X.; Ma, L.**, “Tribological characteristics of aloe mucilage. Tribology - Materials, Surfaces & Interfaces”, 2(2), 72–76, doi:10.1179/175158308x300469, (2008)
- [124] **Salem, A., Guezmil, M., Bensalah, W., Mezlini, S.**, “Tribological Behavior of HDPE Against Stainless Steel on the Presence of Bio-Lubricants”, **Design and Modeling of Mechanical Systems—III**. CMSM 2017, Lecture Notes in Mechanical Engineering. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66697-6_90, (2018)
- [125] **P. Arkoudeas, F. Zannikos, E. Lois,** “The tribological behavior of essential oils in low sulphur automotive diesel”, *Fuel*, Volume 87, Issues 17–18, Pages 3648-3654, ISSN 0016-2361, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.06.008>, (2008)
- [126] **Mohamed Ouknin, Amal Boumezzourh, Zouhair Lakbaibi, Pierre Ponthiaux, Jean Costa and Lhou Majidi,** “Tribological behavior of stainless steel in sulfuric acid in the presence of *Thymus zygis* subsp. *gracilis* essential oil: experimental and quantum chemical studies”, <https://doi.org/10.1515/corrrev-2020-0053>, (2021)
- [127] [https://www.plasma.com/it/lessicodellatecnologiadelplasma/colore-del-plasma/;](https://www.plasma.com/it/lessicodellatecnologiadelplasma/colore-del-plasma/)
- [128] <https://www.gambetti.it/portfolio-articoli/tucano-plasma-a-bassa-pressione/>
- [129] [https://it.wikipedia.org/wiki/Plasma_\(fisica\)](https://it.wikipedia.org/wiki/Plasma_(fisica))
- [130] https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html

- [131] <https://www.alfatest.it/tecniche/sem-microscopia-elettronica-scansione/>
- [132] https://it.wikipedia.org/wiki/Microscopio_elettronico_a_scansione
- [133] **Samapti Kundu**, "Synthesis and characterizations of some nanocrystalline metal oxide semiconductors and composites with different morphologies", Swapan Kumar Pradhan, Department of Physics, The University of Burdwan, <http://hdl.handle.net/10603/257378>, (2018)
- [134] https://www.mt.com/it/it/home/products/L1_AutochemProducts/ReactIR/ftir-spectroscopy.html; <https://www.ism.cnr.it/it/tempism/analisi/spettroscopia/laboratori-di-spettroscopia/spettroscopia-infrarossa-a-trasformata-di-fourier-ftir.html>
- [135] https://www.pianetachimica.it/NMR/spetri/08_soluzione_S.htm
- [136] **Cazzola M, Ferraris S, Banche G, Gautier Di Confiengo G, Geobaldo F, Novara C, Spriano S.**, "Innovative Coatings Based On Peppermint Essential Oil on Titanium and Steel Substrates: Chemical and Mechanical Protection Ability", *Materials* (Basel), 13(3):516. doi: 10.3390/ma13030516, (2020)
- [137] **Thomas Luxbacher**, "The Zeta Potential for Solid Surface Analysis", (2014)
- [138] **Donald M. Brunette, Pentti Tengvall, Marcus Textor, Peter Thomsen**, "Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications", ISBN: 978-3-642-63119-1, *Springer*, (2001)
- [139] **E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, I.M. Elewa, H.H. Soliman**, "Roughness parameters", *Journal of Materials Processing Technology*, Volume 123, Issue 1, Pages 133-145, ISSN 0924-0136, [https://doi.org/10.1016/S0924-0136\(02\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0924-0136(02)00060-2), (2002)
- [140] <https://www.vulcanoline.it/rugosita-ra-rz-rt-rq-rms/#:~:text=I%20parametri%20di%20rugosit%C3%A0%20pi%C3%B9,numeric%20sono%20espressi%20in%20micron>
- [141] <https://orbitbiotech.com/bacterial-growth-curve-generation-time-lag-phase-log-phase-exponential-phase-decline-phase/>
- [142] **Elena Gabetti, Barbara Sgorbini, Federico Stilo, Carlo Bicchi, Patrizia Rubiolo, Franco Chialva, Stephen E. Reichenbach, Valentina Bongiovanni, Chiara Cordero, Andrea Cavallero**, "Chemical fingerprinting strategies based on comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with gas chromatography-olfactometry to capture the unique signature of Piemonte peppermint essential oil (*Mentha x piperita* var *Italo-Mitcham*), *Journal of Chromatography A*, Volume 1645, 462101, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462101>, (2021)
- [143] **M. Cazzola**, " Multifunctional surfaces for implants in bone contact appliations", PhD Thesis, (2018)

- [144] **Taylan O, Cebi N, Sagdic O**, "Rapid Screening of *Mentha spicata* Essential Oil and L-Menthol in *Mentha piperita* Essential Oil by ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Multivariate Analyses", *Foods*, 10(2):202. doi: 10.3390/foods10020202, (2021)
- [145] **J. Zieba Palus**, "The usefulness of infrared spectroscopy in examinations of adhesive tapes for forensic purposes", (2017)
- [146] https://www.chimica-online.it/download/spettri_IR/interpretazione_spettri_IR.htm
- [147] **Zdeňka Kolská, Z. Makajová, Kateřina Kolarová, Nikola Kasálková Slepíčková, Alena Rezníčková Simona Trostová, Jakub Siegel, Vaclav Svorcik**, "Electrokinetic Potential and Other Surface Properties of Polymer Foils and Their Modifications", (2013)
- [148] **Kristina J. Trevino, Jeffrey C. Shearer, Patrick R. McCurdy, Shannon E. Pease-Dodson, Christabel C. Okegbe, Ellen R. Fisher**, "Isoelectric points of plasma-modified and aged silicon oxynitride surfaces measured using contact angle titrations", *Surface and Interface Analysis*, Volume 43, (2011)
- [149] **Saracá-Taquera Brazil, Marcos Túlio Silva, Leonardo Luiz Borges, Tatiana de Sousa Fiuza, Leonice Manrique Faustino Tresvenzol, Edemilson Cardoso da Conceição, Celyane R. Batista, Caio Barros Matos**, "Viscosity of the Oil-resins and Chemical Composition of the Essential Oils from Oils-resins of *Copaifera multijuga* Hayne Growing in the National Forest Saracá-Taquera Brazil", *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, Volume 20, Issue 5, <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1358673>, (2017)
- [150] **Guezmil M, Bensalah W, Mezlini S.**, "Tribological behavior of UHMWPE against TiAl6V4 and CoCr28Mo alloys under dry and lubricated conditions", *J Mech Behav Biomed Mater.* Oct;63:375-385, doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.07.002, (2016)
- [151] **Alessandro Ruggiero, Roberto D'Amato, Emilio Gómez**, "Experimental analysis of tribological behavior of UHMWPE against AISI420C and against TiAl6V4 alloy under dry and lubricated conditions", *Tribology International*, Volume 92, Pages 154-161, ISSN 0301-679X, <https://doi.org/10.1016/j.triboint.2015.06.005>, (2015)
- [152] **Vanessa Kapps, Clara Muniz Almeida, Rafael Mello Trommer, Carlos Alberto Senna, Marcia Marie Maru**, "Scatter in delamination wear tests of tribopair materials used in articulated implants", *Tribology International*, (2019)
- [153] **D. Jauffre`s, O. Lame, G. Vigier, F. Dore´, V. Fridrici**, "Yield, Creep, and Wear Properties of Ultra High Molecular Weight Polyethylene Processed by High Velocity Compaction", *Wiley InterScience*, DOI 10.1002/app.28697, (2008)