

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II



SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE
AREA DIDATTICA SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Dottorato di ricerca in Biologia

XXXIII ciclo

Tesi di dottorato

Studio di nanostrutture antimicrobiche eumelanina-TiO₂ e degradazione di polietilene ad alta densità ad opera di *Cladosporium halotolerans*

Tutor

Professore

Mario Varcamonti

Candidata

Michela Di Napoli

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

INDICE

Capitolo 1

1.1 Introduzione.....	6
1.1.1 L'antibiotico-resistenza.....	7
1.1.2 Resistenza intrinseca.....	7
1.1.3 Resistenza acquisita.....	9
1.1.4 Resistenza mediata da <i>biofilm</i>	9
1.1.5 Strategie alternative all'utilizzo di antibiotici.....	10
1.1.6 Sostanze naturali: oli essenziali.....	10
1.1.7 Peptidi antimicrobici (AMP).....	13
1.1.7.1 AMP di origine umana.....	15
1.1.7.2 AMP di origine batterica.....	17
1.1.8 Nanoparticelle (NP).....	18
1.1.8.1 Meccanismi antibatterici delle nanoparticelle.....	19
1.1.8.2 Applicazione antibatterica delle nanoparticelle.....	20
1.1.9 Scopo della tesi.....	23
1.2 Materiali e metodi.....	26
1.2.1 Materiali.....	27
1.2.2 Sintesi di nanoparticelle di TiO ₂	27
1.2.3 Sintesi di nanoparticelle ibride TiO ₂ DHICA.....	28
1.2.4 Sintesi di nanoparticelle ibride TiO ₂ DOPA.....	29
1.2.5 Preparazione di superfici rivestite.....	29
1.2.6 Preparazione di fibre elettrofilate.....	30
1.2.7 Determinazione del contenuto di eumelanina.....	31
1.2.8 Caratteristiche chimico-fisiche delle nanostrutture ibride.....	31
1.2.9 Indagini EPR: <i>spin-trapping</i> e <i>spin-labeling</i>	33

1.2.10 Rilevazione di H ₂ O ₂ con metodo spettrofotometrico.....	34
1.2.11 Saggi di attività antimicrobica delle nanostrutture ibride.....	35
1.2.12 Misurazioni delle perdite di adenosina trifosfato (ATP)	36
1.2.13 Saggio di eliminazione dei radicali DPPH	36
1.2.14 Caratterizzazione chimico-fisica e morfologica delle garze PCL/PHB.....	37
1.2.15 Assorbimento di acqua delle garze PCL/PHB	37
1.2.16 <i>Test</i> di adesività batterica su garze PCL/PHB	38
1.2.17 Doppia colorazione DAPI/IP e microscopia a fluorescenza.....	38
1.2.18 Colture cellulari eucariotiche.....	39
1.2.19 Citotossicità su cellule HaCat	39
1.2.20 Analisi statistica.....	40
1.3 Risultati.....	41
1.3.1 Contenuto di melanina	42
1.3.2 Attività antimicrobica delle nanostrutture ibride	43
1.3.3 Analisi al microscopio elettronico a trasmissione	46
1.3.4 Analisi di risonanza elettronica paramagnetica	47
1.3.5 Curve dose risposta	48
1.3.6 <i>Test</i> sulla stabilità delle nanostrutture TiO ₂ DHICA_polym.....	50
1.3.7 Attività antimicrobica di surnatanti e in condizioni di oscurità.....	51
1.3.8 Esperimenti di <i>spin-trapping</i> EPR.....	52
1.3.9 Generazione di H ₂ O ₂ e il suo effetto sull'attività antimicrobica	54
1.3.10 Esperimenti di <i>spin-labeling</i> EPR.....	55
1.3.11 Rilevazione dell'interazione nanostrutture-batteri mediante microscopia a fluorescenza	57
1.3.12 Analisi di citotossicità.....	58
1.3.13 Caratterizzazione di fibre elettrofilate ibride	59

1.3.14	Valutazione della capacità di assorbimento d'acqua.....	62
1.3.15	<i>Test</i> biologici su superfici rivestite di TiO ₂ DHICA.....	63
1.3.16	<i>Test</i> biologici su fibre elettrofilate	66
1.3.17	<i>Test</i> di citotossicità.....	68
1.3.18	Caratteristiche chimico-fisiche delle nanostrutture TiO ₂ DOPA.....	69
1.3.19	Studio dell'attività antimicrobica di nanostrutture TiO ₂ DOPA.....	72
1.3.20	Saggio di eliminazione dei radicali DPPH	76
1.3.21	<i>Test</i> di citotossicità.....	77
1.4	<i>Discussione</i>	78
	Capitolo 2	83
2.1	<i>Introduzione</i>	83
2.1.1	Il polietilene (PE).....	84
2.1.2	Degradazione del PE.....	85
2.1.3	Degradazione del PE ad opera di microrganismi.....	88
2.1.4	Biodegradazione del PE: meccanismi enzimatici e molecolari	90
2.1.5	Scopo della tesi	91
2.2	<i>Materiali e metodi</i>	93
2.2.1	Isolamento di microrganismi dall'intestino delle larve <i>Galleria mellonella</i>	94
2.2.2	Analisi della degradazione del polietilene ad alta densità	94
2.2.4	Spettroscopia infrarossa in trasformata di <i>Fourier</i> (FTIR).....	96
2.2.5	<i>Screening</i> della laccasi.....	96
2.2.6	Estrazione di proteine da supernatante fungino	97
2.3	<i>Risultati</i>	98
2.3.1	Isolamento di microrganismi da <i>Galleria mellonella</i>	99
2.3.2	Capacità di <i>Cladosporium halotolerans</i> di degradare HDPE.....	99
2.3.3	Evidenza fisiologica e meccanica della degradazione di HDPE	101

2.3.4 Degradazione dell'HDPE analizzata mediante FTIR	102
2.3.5 <i>Screening</i> di laccasi	104
2.3.6 Effetto del rame sull'attività laccasica.....	105
2.3.7 Analisi dei surnatanti di <i>Cladosporium halotolerans</i>	108
2.4 <i>Discussione</i>	109
<i>Bibliografia Capitolo 1</i>.....	112
<i>Bibliografia Capitolo 2</i>.....	120

Ai miei genitori

Capitolo 1

1.1 Introduzione

1.1.1 L'antibiotico-resistenza

L'aumento e la diffusione della resistenza agli antibiotici rappresenta una sfida per la scienza e per la medicina. Gli ultimi decenni, infatti, hanno visto un drammatico aumento a livello mondiale di batteri patogeni per l'uomo resistenti a uno o più antibiotici [1]. Una recente Giornata mondiale della salute dell'OMS con il tema "Combattere la resistenza ai farmaci: nessuna azione oggi significa nessuna cura domani" ha innescato un aumento dell'attività di ricerca e sono state sviluppate diverse strategie promettenti per ripristinare le opzioni di trattamento contro le infezioni da batteri patogeni resistenti [1]. L'antibiotico resistenza può essere intrinseca, acquisita (Figura 1) o mediata dal *biofilm*.

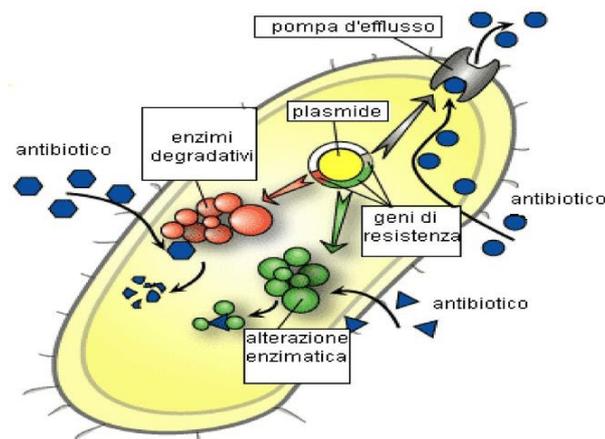


Figura 1: Diversi meccanismi di resistenza agli antibiotici

1.1.2 Resistenza intrinseca

L'intrinseca resistenza agli antibiotici di una specie batterica si riferisce alla sua capacità innata di diminuire o neutralizzare l'efficacia di uno specifico antibiotico attraverso caratteristiche strutturali o funzionali intrinseche [2]. *Pseudomonas aeruginosa* ha dimostrato di possedere un alto livello di resistenza intrinseca alla maggior parte degli

antibiotici attraverso una ristretta permeabilità della membrana esterna, sistemi di efflusso che pompano antibiotici fuori dalla cellula e produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici come le β -lattamasi [3]. La maggior parte degli antibiotici, usati per trattare le infezioni, devono essere in grado di penetrare nella membrana cellulare per raggiungere bersagli intracellulari [4]. Ad esempio, la famiglia di antibiotici aminoglicosidici come tobramicina, gentamicina e amikacina inibisce la sintesi delle proteine batteriche legandosi a subunità ribosomiali 30S [5]. Antibiotici chinolonici come ciprofloxacina e levofloxacina interferiscono con la replicazione del DNA inibendo la DNA girasi e la topoisomerasi IV [6]. Gli antibiotici β -lattamici bloccano la biosintesi della parete cellulare batterica prendendo di mira enzimi coinvolti nella sintesi del peptidoglicano, i quali agiscono senza penetrare attraverso la membrana cellulare, ma sulle transpeptidasi "esterne" [7]. Le polimixine sono un gruppo di antibiotici polipeptidici che si legano ai lipopolisaccaridi (LPS) sulla membrana esterna di *Gram* negativi, con conseguente aumento della permeabilità della membrana cellulare e maggiore assorbimento di antibiotici. Le pompe di efflusso batterico svolgono un ruolo importante nell'espulsione di sostanze tossiche fuori dalla cellula e possono essere classificate in cinque famiglie: *resistance-nodulation-division (RND) family*, *major facilitator superfamily (MFS)*, *ATP-binding cassette (ABC) superfamily*, *small multidrug resistance (SMR) family*, e *multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family* [8].

Altresì importante e causa dei principali meccanismi di resistenza intrinseca nei batteri è la produzione di enzimi che distruggono o modificano gli antibiotici. Molti antibiotici hanno legami chimici suscettibili all'idrolisi [9] di enzimi. Alcuni batteri *Gram* negativi posseggono un gene inducibile *ampC* che codifica per l'enzima idrolitico β -lattamasi. Questo enzima è in grado di rompere il legame ammidico dell'anello β -lattamico, portando all'inattivazione degli antibiotici β -lattamici [9].

1.1.3 Resistenza acquisita

I batteri possono acquisire resistenza agli antibiotici attraverso cambiamenti mutazionali o acquisizione di geni di resistenza tramite trasferimento genico orizzontale [10]. I cambiamenti mutazionali sono in grado di causare un ridotto assorbimento di antibiotico attraverso modifiche del sito bersaglio, o mediante sovra espressione delle pompe di efflusso e di enzimi inattivanti gli antibiotici [10]. Ad esempio alcune mutazioni spontanee possono influenzare l'espressione o la funzione di una specifica porina, riducendo così la permeabilità della membrana [11]. I geni di resistenza agli antibiotici possono essere trasportati su plasmidi, trasposoni, integroni e profagi e i batteri possono acquisire questi geni tramite trasferimento genico orizzontale dalla stessa specie batterica o da specie diverse [3]. I principali meccanismi del trasferimento genico orizzontale coinvolgono trasformazione, trasduzione e coniugazione [12].

1.1.4 Resistenza mediata da biofilm

La resistenza agli antibiotici può essere determinata anche dalla formazione di un *biofilm* come mostrato in Figura 2. Un *biofilm* è un aggregato di microrganismi che aderiscono su una superficie vivente o non vivente e sono incorporati all'interno di una matrice di sostanze polimeriche extracellulari, compresi esopolisaccaridi, proteine, metaboliti e DNA extracellulari (eDNA) [13, 14]. Le cellule microbiche cresciute nel *biofilm* sono meno sensibili agli agenti antimicrobici e alla risposta immunitaria dell'ospite rispetto alle cellule planctoniche [15]. Tuttavia, la sensibilità agli antibiotici può essere ripristinata rapidamente quando i batteri perdono la protezione del *biofilm*, indicando tale resistenza come un meccanismo adattivo [16].

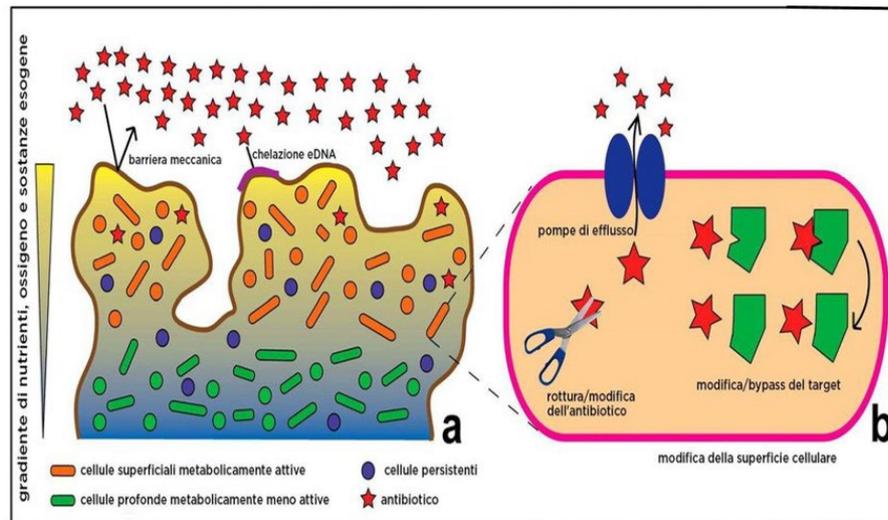


Figura 2: a) Diversi meccanismi di resistenza sviluppati a livello di biofilm b) Diversi meccanismi di resistenza sviluppati a livello di cellule planctoniche.

1.1.5 Strategie alternative all'uso di antibiotici

L'uso e l'abuso di antibiotici che promuove lo sviluppo di ceppi batterici resistenti ai farmaci rappresenta una preoccupazione crescente per la salute pubblica [17]. Pertanto, è altamente desiderabile lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Queste nuove strategie terapeutiche possono agire da sole o in combinazione con terapie convenzionali e comprendono l'uso di sostanze naturali, peptidi antimicrobici (AMP) e nanoparticelle (NP) [18, 19].

1.1.6 Sostanze naturali: oli essenziali

Recentemente il mondo scientifico ha considerato le sostanze naturali quali possibili fonti di molecole potenzialmente terapeutiche per fronteggiare varie problematiche di sanità pubblica, tra cui le continue emergenze infettive con fenomeni associati di farmaco-resistenza. Numerosi sono gli studi riguardanti il loro effetto sui microrganismi *in vitro* e sul loro utilizzo in terapia come additivo al trattamento medico tradizionale soprattutto in un momento in cui i microrganismi stanno diventando sempre più resistenti ai farmaci [20,

21]. Essi sono classificati come metaboliti secondari [22, 23] e la loro caratteristica lipofilia è importante in quanto ne facilita l'interazione con la membrana cellulare batterica. Tuttavia, come riportato in Figura 3, possono influenzare molti altri processi che avvengono all'interno delle cellule: inibiscono la sintesi degli acidi nucleici e la produzione di proteine che regolano l'espressione genica [22, 24]; limitano o inibiscono l'attività di enzimi come la lipasi, la coagulasi [25], l'amminoacido decarbossilasi [26, 27] ed enzimi che idrolizzano gli antibiotici [28]; disattivano le pompe di efflusso e influenzano il *biofilm* aumentando la penetrazione degli antibiotici nella biomassa.

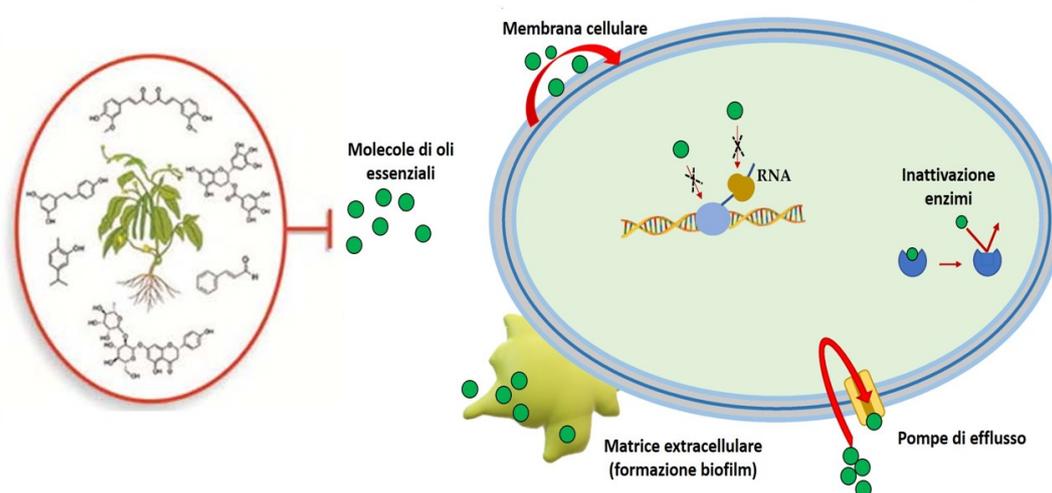


Figura 3: Azione antimicrobica di molecole estratte da oli essenziali

Queste potenzialità hanno spinto il nostro gruppo di ricerca a studiare oli essenziali estratti da tre diverse tipologie di piante: *Mentha x piperita L.* e *Mentha arvensis L.* [29]; *Anthemis secundiramea* [30] e *Conium maculatum L.* [31]. Gli oli essenziali di *Mentha x piperita L.* var. *Mitcham* e *Mentha arvensis* var. *piperascens* risultano particolarmente ricchi di monoterpeni ossigenati che rappresentano i metaboliti più importanti. Entrambi gli oli posseggono un'attività antimicrobica forte e dose dipendente contro ceppi patogeni resistenti alle sostanze antimicrobiche [29]. Da esperimenti di

microscopia a fluorescenza è emerso che il possibile *target* delle molecole estratte da *M. piperita* e *M. arvensis* è la membrana batterica. Da analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) i batteri di controllo non trattati avevano un aspetto tipico ben noto di protoplasma abbastanza denso di elettroni e delimitato da una parete cellulare solida. Il mutato aspetto dei batteri trattati suggerisce che il protoplasma, sotto l'effetto tossico del mentolo, perde la maggior parte o tutto il suo contenuto, mostrando un aspetto chiaro o addirittura vuoto. Tuttavia, le pareti cellulari presentavano ancora una struttura solida e densa di elettroni suggerendo che l'olio ha indotto la lisi del protoplasma agendo sulla membrana senza danneggiare l'ultrastruttura della parete. È noto, infatti, che i monoterpene e in particolare il mentolo, agiscono contro i batteri *Gram* positivi e *Gram* negativi perturbando la frazione lipidica della membrana plasmatica del microrganismo, con conseguente alterazione della permeabilità della membrana e fuoriuscita di materiali intracellulari [29].

Altrettanto promettente è risultato l'olio essenziale estratto dalle foglie e dai fiori di *Anthemis secundiramea*, che ha mostrato una buona attività antibatterica contro i ceppi *Gram* negativi e positivi, una buona attività *antibiofilm* e assenza di tossicità per le cellule eucariotiche. Al contrario, possiede ottime proprietà antiossidanti promuovendo l'aumento dell'attività di enzimi quali superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutadione perossidasi (GPx) nelle cellule polimorfonucleate.

Per quanto concerne *Conium maculatum*, noto anche come 'cicuta', è un'erbaccia nitrofila appartenente alle *Apiaceae* (Ombrellifere) [32]. La sua tossicità è data dalla presenza di alcaloidi piperidinici [32-33], generalmente accumulati nei dotti secretori insieme agli oli essenziali [34]. Molto si sa circa la biosintesi e la struttura degli alcaloidi rispetto ai componenti volatili [35, 36]. Pertanto, ci si è concentrati sulle proprietà antimicrobiche dell'olio essenziale, ottenuto dai fiori e dalle foglie di *C. maculatum*, contro due ceppi *Gram*

negativi: *Escherichia coli* DH5 α e *Pseudomonas aeruginosa* PAOI che rappresentano rispettivamente un ceppo modello e un patogeno opportunistico per le piante. In studi precedenti è stato dimostrato che il composto volatile maggiormente presente nelle foglie di cicuta è il (E)cariofillene che agisce [37] entrando nel doppio strato lipidico della membrana batterica provocando la perdita della sua fluidità e permeabilità, inibizione della respirazione e alterazione dei processi di trasporto [38]. Considerando i risultati presenti in letteratura, si è ipotizzato che le molecole antimicrobiche siano prodotte come strategia di difesa nelle foglie ma non nelle infiorescenze dove si trovano invece i composti attrattori prodotti per gli impollinatori. Emergono, quindi, nuove informazioni sulla potenziale applicazione degli oli essenziali di cicuta per combattere i patogeni difficili da debellare a supporto di quelle che sono le nuove scoperte riguardanti le strategie alternative all'utilizzo degli antibiotici.

1.1.7 Peptidi antimicrobici (AMP)

I peptidi antimicrobici, chiamati anche peptidi di difesa dell'ospite, sono prodotti da una vasta varietà di organismi, dai batteri agli animali e sono attivi contro un'ampia gamma di microrganismi [39]. Hanno dimensioni comprese tra 15 e 100 residui e la maggior parte sono composti anfipatici altamente cationici in grado di subire diverse modifiche *post-traduzionali* [40]. Il dominio cationico di questi peptidi si impegna in interazioni di tipo elettrostatico con la superficie delle cellule batteriche carica negativamente per la presenza di lipopolisaccaridi e acidi teicoici (TA), mentre il dominio idrofobo interagisce con i lipidi della membrana batterica [41, 42]. È opinione diffusa, infatti, che l'effetto battericida degli AMP sia dovuto alla formazione di pori nella membrana citoplasmatica batterica, con perdita di controllo sui flussi ionici attraverso la membrana e conseguente morte cellulare. Le cellule dei mammiferi, invece, sono di natura zwitterionica con carica netta neutra per la presenza di fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e sfingomieline (SM) rendendo difficile

l'interazione con gli AMP carichi positivamente. Inoltre, le membrane cellulari umane contengono significative quantità di colesterolo che influenzano la fluidità della membrana e aumentano la stabilità del doppio strato lipidico [43]. Queste notevoli differenze tra membrane batteriche ed eucariotiche, riportate in Figura 4, possono spiegare la selettività degli AMP per i batteri.

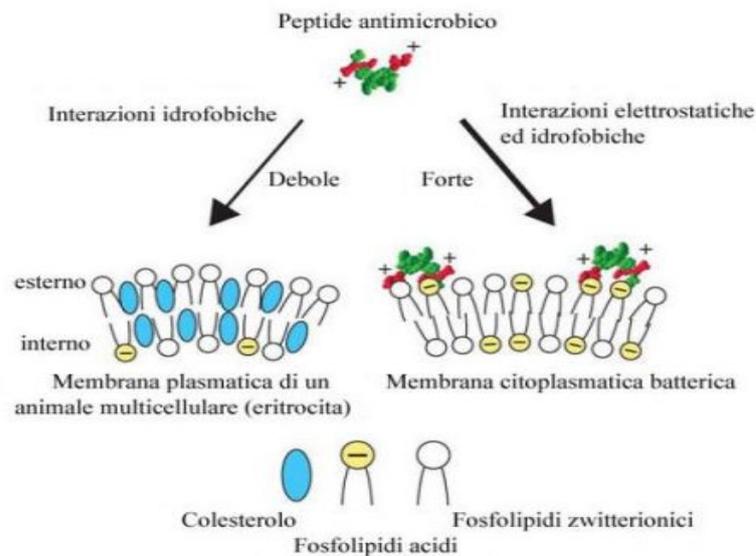


Figura 4: Differenti tipi di interazioni tra peptidi antimicrobici e la membrana eucariotica e procariotica

Tuttavia l'attività degli AMP può anche coinvolgere bersagli intracellulari bloccando i processi cellulari essenziali senza causare estesi danni alla membrana [44, 45]. Oltre all'attività antimicrobica, essi possiedono proprietà antibiofilmogene e immunomodulatorie [46, 47, 48]. Come conseguenza della loro attività ad ampio spettro, gli AMP sono stati suggeriti come alternativa agli antibiotici convenzionali per combattere le infezioni batteriche; dimostrano una cinetica di uccisione rapida, bassi livelli di resistenza indotta e bassa tossicità per l'ospite [49, 47]. Inoltre, alcuni di essi hanno mostrato sinergia con antibiotici convenzionali contro molti batteri promuovendo l'assorbimento di antibiotici, la rottura della formazione di *biofilm* o l'inibizione del *quorum sensing* batterico [50, 51].

D'altra parte, gli svantaggi degli AMP riguardano l'attività emolitica nelle cellule ospiti; la rapida degradazione nel corpo umano perché suscettibili alla proteolisi; e l'elevato costo di produzione [52, 49]. Tuttavia, sono state sviluppate varianti stabili sintetiche che incorporano amminoacidi innaturali (pep-tidomimetici) per superare questi difetti.

1.1.7.1 AMP di origine umana

Gli AMP, compresi quelli prodotti nelle cellule umane e derivanti dal normale processo di traduzione ribosomiale di RNA messaggero (mRNA) sono in contrasto con la sintesi di peptidi non ribosomiali (NRPS). Il prodotto principale è una pre-proteina che viene quindi elaborata fino alla lunghezza finale di AMP attivo. Questa differenza nelle origini genetiche degli AMP e degli antibiotici NRPS determina una diversità nelle composizioni dei prodotti finali. Gli AMP prodotti per via ribosomiale contengono solo il normale complemento di amminoacidi presenti nelle proteine, a volte con modificazioni *post*-traduzionali. Gli antibiotici prodotti da NRPS, al contrario, non sono vincolati dalle limitazioni della traduzione ribosomiale e di solito contengono una miscela di amminoacidi normali insieme ad amminoacidi non canonici e non presenti in nessuna proteina [53]. Gli AMP umani variano in lunghezza da 5 a 149 amminoacidi [54, 55]. Essi sono stati identificati in diverse secrezioni umane, tessuti e tipi di cellule. Durante gli anni '90 nell'uomo sono state scoperte tantissime nuove classi di AMP, tra cui le defensine [56] e le catelicidine [57] stimolando la ricerca a comprendere il numero e la varietà di AMP umani utili per il controllo delle infezioni batteriche. Per queste ragioni il nostro gruppo di ricerca si è interessato alle caratteristiche di una nota glicoproteina, l'apolipoproteinaE (ApoE), che svolge un ruolo chiave nel trasporto di colesterolo e altri lipidi nel sangue e nel sistema nervoso centrale. Oltre a questi ruoli consolidati, ApoE ha anche proprietà immunomodulatorie; inibendo la proliferazione dei linfociti T [58, 59], regolando la produzione di ossido nitrico nelle

piastrine [60] e facilitando la presentazione dell'antigene lipidico CD1 su cellule T *natural killer* [61]. Queste osservazioni suggeriscono che ApoE ha importanti funzioni biologiche, indipendenti dal suo ruolo canonico nel legame delle lipoproteine ricche di colesterolo a livello dei tessuti epatici e periferici. Una varietà di enzimi, come la catepsina D, la trombina, la serina proteasi simile alla chimotripsina e le proteasi aspartiche, sono state proposte per mediare la scissione di ApoE [62]. A tal proposito, recentemente, è stato sviluppato un metodo bioinformatico che identifica i peptidi antimicrobici all'interno di precursori di proteine più grandi e predice quantitativamente la loro attività antibatterica [63]. È interessante notare che un'ampia varietà di proteine umane le cui funzioni primarie non sono necessariamente correlate alla difesa dell'ospite, contengono AMP nascosti all'interno della loro sequenza [64-66]. Per mezzo di questo metodo, sono stati individuati 2 peptidi criptici in ApoE: ApoE (133-150) e ApoE (133-167) [67]. È stata caratterizzata la capacità di ApoE (133-150) di assumere conformazioni stabili in presenza di agenti che mimano la membrana batterica, nonché le sue proprietà antibatteriche e immunomodulatorie [67]. Allo stesso modo, ApoE (133-167) possiede proprietà antimicrobiche contro isolati clinici, inibisce la formazione di *biofilm* sia di *Gram* positivi che di *Gram* negativi e presenta proprietà aggiuntive legate alla sua lunghezza (35 residui) e alla sua capacità di assumere una conformazione elicoidale regolare in presenza di detergenti esopolisaccaridi (come LPS). Questi risultati acquisiscono un maggiore significato se consideriamo: (1) l'abilità di ApoE di interagire con LPS; (2) l'assenza di tossicità quando ApoE è somministrato alle cellule umane; (3) la capacità di inibire l'espressione di citochine infiammatorie indotte da LPS. Questi aspetti associati ad ulteriori proprietà biologiche di peptidi criptici, come mostrato per ApoE (133-167), potrebbero aprire uno scenario futuro in cui i peptidi potrebbero, in modo efficace e selettivo, operare in condizioni in cui gli antibiotici falliscono.

1.1.7.2 AMP di origine batterica

Gli LPS sono componenti principali della membrana esterna dei batteri *Gram* negativi e sono essenziali per la crescita e la vitalità batterica, tuttavia i macrofagi stimolati da LPS inducono il rilascio di citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL1 e IL6) nel sangue, come mostrato in Figura 5, con conseguente *shock* settico [68-70].

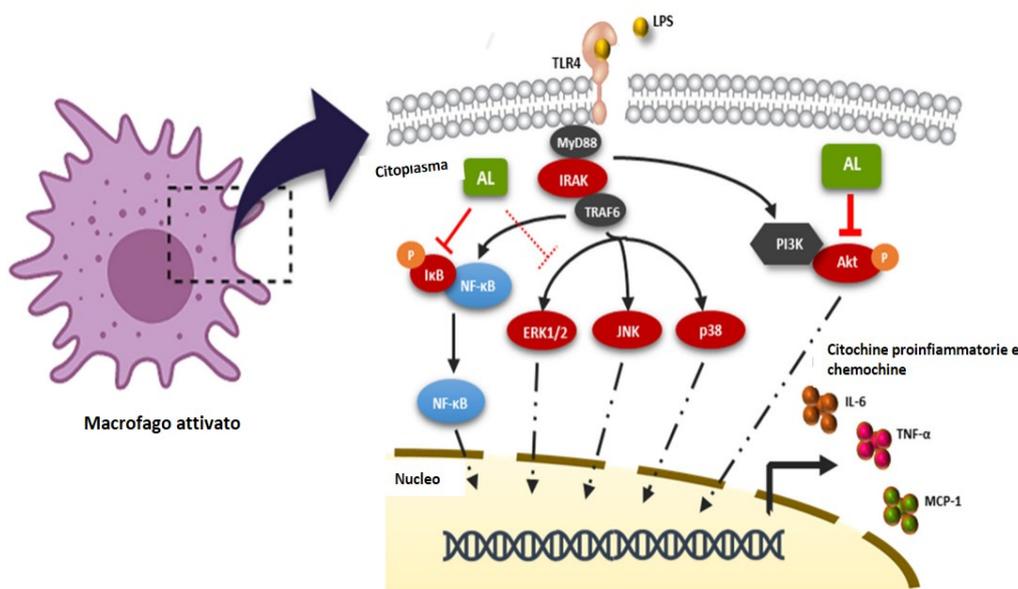


Figura 5: Rilascio di citochine infiammatorie indotto dal legame di LPS al *toll like receptor*4 (TLR4)

Di conseguenza, gli LPS sono un ottimo bersaglio per gli AMP perché hanno il potenziale di arrestare la crescita di batteri multiresistenti e neutralizzare l'azione degli LPS rilasciati. In generale, i peptidi antimicrobici si legano a LPS attraverso interazioni elettrostatiche tra i loro amminoacidi cationici (Lisina e Arginina) e le teste dell'LPS, e questo complesso viene stabilizzato attraverso interazioni idrofobiche tra gli amminoacidi idrofobici dei peptidi e le catene aciliche grasse dell'LPS [71, 72]. In merito al legame tra LPS batterico e AMP, il nostro gruppo di ricerca ha caratterizzato un piccolo peptide, denominato EFV12, prodotto da *Lactobacillus gasseri* SF1109 isolato intestinale umano [73]. È stata studiata la capacità

di EFV12 di legare l'LPS, con conseguente attenuazione della risposta infiammatoria nelle cellule epiteliali intestinali *in vitro*. È stato ampiamente dimostrato che il microbiota intestinale e i metaboliti, prodotti da microbi commensali, sono regolatori chiave dell'omeostasi intestinale e in molti casi della risposta immunitaria dell'ospite [74]. Dallo studio è emerso, infatti, che EFV12, possiede un'attività antimicrobica diretta contro la crescita eccessiva dei patogeni del tratto gastrointestinale [75], agendo probabilmente contro le membrane batteriche; ed è in grado di contrastare l'insulto infiammatorio generato dall'LPS impedendone, a monte, il legame al TLR4 e interferendo, a valle, con la via delle *Map Kinasi* (MAPK) di *Erks*, *JNK* e *p38*.

1.1.8 Nanoparticelle (NP)

Attualmente, le nanoparticelle hanno guadagnato una notevole attenzione per il trattamento di una serie di malattie, tra cui cancro e infezioni batteriche. Le nanoparticelle sono piccoli materiali di dimensioni inferiori ai 100 nm utilizzati in una varietà di applicazioni chimiche, biologiche e biomediche [76, 77]. I meccanismi antibatterici delle NP sono poco compresi, ma i più accreditati includono l'induzione dello *stress* ossidativo, il rilascio di ioni metallici e i meccanismi non ossidativi. I molteplici meccanismi adottati dalle NP contro i microrganismi richiederebbero più mutazioni geniche simultanee per lo sviluppo della resistenza antibatterica. Numerosi sono i vantaggi delle NP:

- **Dimensioni:** le dimensioni ultracompatte e controllabili delle NP sono adatte per condurre operazioni antimicrobiche e combattere i batteri intracellulari [78]. Esse sono facilmente fagocitate dalle cellule ospiti e sono indicate per il trasporto di farmaci [79] infatti, la loro flessibilità ne facilita l'ingresso per endocitosi promuovendo il rilascio intracellulare della maggior parte del farmaco.

- **Protezione:** all'interno delle NP, i farmaci sono protetti dagli effetti dannosi ad opera di reazioni chimiche e nel siero il livello rimane alto per un tempo più prolungato.
- **Precisione e sicurezza:** è difficile, quando si usano antibiotici convenzionali senza l'ausilio di un vettore, favorire l'assorbimento di farmaci ad alte dosi in un determinato distretto corporeo prevenendo gli effetti collaterali. Le NP favoriscono il rilascio del farmaco in corrispondenza del sito di azione riducendone, quindi, gli effetti collaterali.
- **Combinazione:** possono essere combinati più farmaci o sostanze antimicrobiche all'interno della stessa NP e le NP possono essere, a loro volta, combinate con altri costrutti per migliorare le proprietà antibatteriche delle molecole [80].

1.1.8.1 Meccanismi antibatterici delle nanoparticelle

Il meccanismo d'azione con cui le NP esercitano un potere antimicrobico può essere associato all'induzione di *stress* ossidativo, [81] al rilascio di ioni metallici, [82] o a meccanismi non ossidativi [83]. Questi tre tipi di meccanismi possono verificarsi simultaneamente. Gli effetti antibatterici delle NP sono i seguenti: 1) interruzione della membrana cellulare batterica; 2) generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS); 3) penetrazione della membrana cellulare batterica; e 4) induzione degli effetti antibatterici intracellulari, comprese le interazioni con DNA e proteine [83]. La composizione della membrana cellulare determina un adsorbimento diverso delle NP da parte dei batteri *Gram* positivi e *Gram* negativi [84]. L'LPS presente solo sui *Gram* negativi è carico negativamente e attrae le NP. Al contrario, l'acido teicoico tipico dei batteri *Gram* positivi ne impedisce l'aggregazione. Tuttavia, molti studi dimostrano che le NP hanno una maggiore attività contro i batteri *Gram* positivi in quanto la parete cellulare dei batteri *Gram* negativi è composta da LPS, lipoproteine e fosfolipidi, che formano una barriera di penetrazione

consentendo l'ingresso di sole macromolecole. Al contrario, la parete cellulare dei batteri *Gram* positivi comprende uno strato di peptidoglicano, acido teicoico e abbondanti pori che permettono alle molecole estranee di penetrare, provocando danno alla membrana e morte cellulare [85]. Alcuni studi [86] hanno confermato che le NP di biossido di titanio (TiO_2) possono aderire alla superficie delle cellule batteriche per produrre ROS e danneggiare la struttura della membrana cellulare, come mostrato in Figura 6, provocando la fuoriuscita di materiale intracellulare e morte.

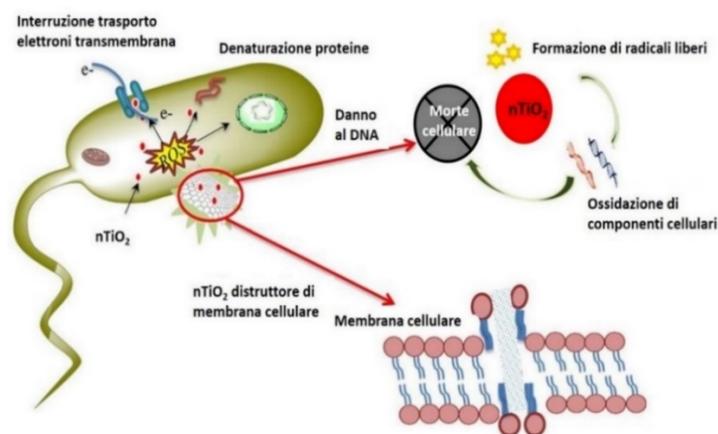


Figura 6: NP di TiO_2 che aderendo alla superficie delle cellule batteriche danneggiano la struttura della membrana cellulare provocando la fuoriuscita di materiale intracellulare e morte.

1.1.8.2 Applicazione antibatterica delle nanoparticelle

Le nanoparticelle rivestono un ruolo importante in ambito biomedico e trovano applicazione nel rivestimento antibatterico di dispositivi impiantabili e nella medicazione per le ferite.

- Esistono due tipi di dispositivi impiantabili umani con rivestimenti antimicrobici; il primo tipo è completamente impiantabile, come valvole cardiache o impianti dentali. L'applicazione di un rivestimento con ossido di titanio [87] inibisce l'adesione e la crescita dei batteri come *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis* ed *Escherichia coli* e previene il verificarsi di infiammazioni intorno

agli impianti. L'altro tipo di dispositivo è parzialmente impiantabile, come cateteri endovenosi o cateteri neurochirurgici, più inclini alla colonizzazione batterica, aumentando così il rischio di infezione nelle applicazioni cliniche.

- La pelle è la barriera protettiva naturale del corpo, essa non protegge solo il corpo da agenti patogeni e corpi estranei ma mantiene anche l'equilibrio dinamico dell'acqua e degli elettroliti. La cosiddetta medicazione, deve essere utilizzata nel processo di guarigione delle ferite per ripristinare la funzione di barriera della pelle, per accelerare la guarigione delle ferite e per ridurre il rischio di infezione. Potrebbe assumere, tuttavia, ulteriori caratteristiche come favorire la proliferazione e migrazione dei fibroblasti, accelerare la formazione del tessuto epiteliale, ridurre la formazione di cicatrici e presentare effetti antibatterici e antinfiammatori [88].

Sebbene le nanoparticelle mostrino una grande attività antimicrobica *in vitro* e *in vivo*, sono ancora limitati gli esperimenti in fase clinica a causa dei loro potenziali effetti collaterali quali, alterazione della risposta immunitaria e iperproduzione di citochine infiammatorie. In futuro gli studi che utilizzano nanoparticelle devono concentrarsi sul materiale selezionato, sulla dimensione e sulla dose di nanoparticelle somministrata. A tal proposito recentemente, c'è stato un crescente interesse per gli ibridi organici ed inorganici come alternative per ottenere nuovi nanomateriali funzionali. Questi ibridi realizzati mediante accoppiamento di molecole organiche a nanostrutture inorganiche non solo combinano le proprietà spesso dissimili di componenti inorganici ed organici in un unico materiale, ma forniscono l'opportunità di produrre nuovi materiali multifunzionali con un ampio spettro di proprietà note e altre ancora sconosciute. In questa continua ricerca di accoppiamenti organico-inorganico, il biossido di titanio è uno dei materiali inorganici più interessanti. TiO_2 è un prodotto economico, ecologico e fotostabile, nonché catalizzatore ad alte prestazioni in processi foto ossidativi [89-91]. D'altro canto nel ricco insieme di specie organiche utili per

funzionalizzare le fasi inorganiche, le eumelanine rappresentano biomolecole promettenti per la progettazione di nanomateriali originali per ampie applicazioni tecnologiche [92]. Le eumelanine sono pigmenti idrofobici con carica negativa ad alto peso molecolare, presenti nei mammiferi, piante e microrganismi [93, 94]. Molti studi hanno recentemente dimostrato che le melanine interferiscono con numerosi meccanismi di difesa dell'ospite: sono altamente immunogeniche [95], hanno proprietà anti-infiammatorie, [96] ed esercitano un'azione protettiva contro microrganismi e radiazioni UV [97]. La melanizzazione della pelle e di altri tessuti, infatti, è una componente importante del sistema di difesa immunitario innato: in questo contesto la funzione dell'eumelanina nella pelle consiste nell'inibire la proliferazione di batteri, funghi e parassiti a livello del derma e dell'epidermide [98, 99]. In particolare, le eumelanine sono prodotte dall'ossidazione della tirosina attraverso la tirosinasi a DOPA (o-diidrossifenilalanina) e dopachromo; inoltre la ciclizzazione media per formare l'acido 5,6-diidrossiindolo (DHI) o l'acido 5,6-diidrossiindolo-2-carbossilico (DHICA) come riportato in Figura 7 [93]. Poiché l'isolamento delle eumelanine naturali è un processo molto complicato, è possibile imitarne la formazione ossidando *in vitro* DHI e DHICA per ottenere modelli di eumelanina sintetica abbastanza simili al pigmento naturale [93, 100].

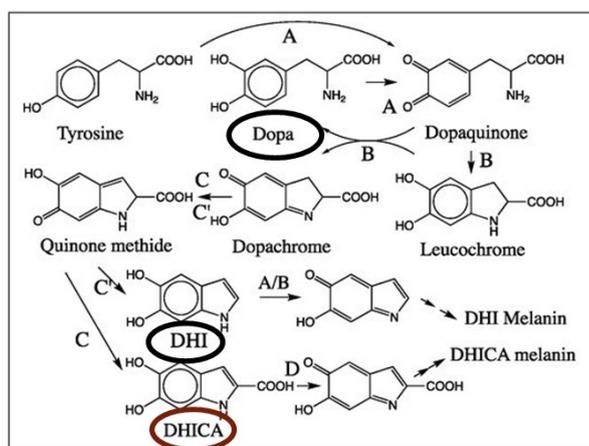


Figura 7: Intermedi di reazione della sintesi melanogenica

1.1.9 Scopo della tesi

L'uso e l'abuso di antibiotici che promuove lo sviluppo di ceppi batterici resistenti ai farmaci rappresenta una preoccupazione crescente per la salute pubblica [17]. Per questo motivo nella prima parte del mio progetto di dottorato ho focalizzato l'attenzione su un argomento ampiamente discusso quale l'antibiotico resistenza. Ho valutato possibili strategie alternative all'utilizzo dei comuni antibiotici quali oli essenziali derivanti da piante naturali, peptidici antimicrobici e nanoparticelle funzionalizzate. Ho riposto particolare attenzione su quest'ultimo aspetto e in collaborazione con i Ricercatori del Dipartimento di Ingegneria dei Biomateriali dell'Università di Napoli Federico II ho analizzato i molteplici aspetti di nanoparticelle di biossido di titanio coniugate ad eumelanine. Il TiO_2 promuove la polimerizzazione dell'acido 5,6-diidrossindolo-2-carbossilico. Sono state prodotte, attraverso sintesi idrotermale, nanostrutture ibride di TiO_2 DHICA tramite un processo a più fasi che coinvolge una procedura *sol-gel* (TiO_2 DHICA_{ti}) e una successiva esposizione a vapori di ammoniaca (TiO_2 DHICA_{polym}) [101-103]. È stato valutato il rapporto tra il precursore di eumelanina DHICA e il TiO_2 , al fine di definire la morfologia e l'organizzazione strutturale delle nanostrutture Melanina- TiO_2 . Attraverso *test* su *Escherichia coli DH5α* è stato studiato il contributo di ogni componente, nonché del complesso TiO_2 DHICA alle prestazioni biologiche. Ho indagato circa il meccanismo d'azione di questi sistemi e a questo scopo la caratterizzazione biocida è stata combinata con la risonanza elettronica paramagnetica (EPR) per studiare come le specie radicaliche prodotte dagli ibridi interagiscono con le membrane batteriche. In effetti alcuni manoscritti sostengono che l'azione antimicrobica delle eumelanine si basa sulla generazione di ROS [104]. In realtà, i meccanismi di tossicità delle nanoparticelle sono molto complicati, poiché diverse cause possono determinarne l'attività antimicrobica oltre alla produzione dei ROS,

come danni alla membrana batterica e lisciviazione di frazioni citotossiche [105, 106]. Ogni aspetto è stato sistematicamente affrontato attraverso un'indagine chimico-fisica e biologica. Successivamente, dati i numerosi risultati positivi ottenuti abbiamo valutato la possibilità di utilizzare in futuro questi biomateriali per la medicazione delle ferite. È stato realizzato un tessuto in fibra di Policaprolattone /Poliidrossibutirrato (PCL/PHB) rivestito di TiO_2DHICA . Un materiale ideale per la medicazione delle ferite dovrebbe essere un sistema elastico, biocompatibile e biodegradabile con attività antimicrobica [107]. In particolare, le garze PCL/PHB possono essere ottenute per elettrofilatura bilanciando morbidezza e resistenza meccanica [108, 109]. Tuttavia, le loro caratteristiche idrofobiche limitano fortemente la bagnabilità e l'adesione cellulare [110, 111]. L'utilizzo di nanostrutture ceramiche idrofile, compreso TiO_2 , è una valida strategia per affrontare questo problema, migliorando la compatibilità dei tessuti [112]. Come ulteriore importante limitazione, questi polimeri biocompatibili possono essere soggetti ad adesione batterica [113, 114] determinando gravi infezioni [115]. L'incorporazione di agenti antimicrobici nelle garze è un approccio efficace per superare questa limitazione. Nel tentativo di progettare frazioni biologicamente attive di nuova generazione, un'enorme promessa viene dalla melanina. Le nanostrutture di TiO_2DHICA sono state combinate a fibre di PCL/PHB seguendo due diverse strategie, in seguito ne è stata valutata l'attività antibatterica e la citotossicità. Proseguendo nel nostro studio abbiamo voluto investigare sulla capacità degli ioni di titanio di interagire con un altro precursore della melanina, la DOPA. La tirosina viene prima convertita in DOPA-chinone (DQ) mediante l'azione dell'enzima tirosinasi (Tyr). All'interno dei melanosomi, il DOPA-chinone ciclizza per formare leucodopacromo che si converte spontaneamente in un intermedio di colore arancione noto come dopacromo. Come dimostrato da studi *in vitro*, il dopacromo perde il suo acido carbossilico, formando il 5,6-diidrossiindolo, la cui polimerizzazione forma eumelanina. Metodologie di analisi complementare, spettroscopie

nell'ultravioletto-visibile (UV-Vis) e risonanza paramagnetica elettronica, sono state impiegate per studiare le caratteristiche del sistema sia durante la procedura di sintesi che come prodotto finale. In seguito alla caratterizzazione chimico-fisica sono andate a valutare il comportamento antimicrobico e antiossidante delle nanostrutture ibride finali.

1.2 Materiali e metodi

1.2.1 Materiali

Il 5,6-diidrossindolo-2-carbossilico è stato preparato come descritto [106, 118]. Isopropossido di titanio/isopropanolo (TTiP), acido acetico, trietilammina (TEA), 3,4-diidrossifenilalanina (DOPA), lipopolisaccaride di *Escherichia coli* O111:B4, tampone fosfato composto da NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ · 6H₂O 0,5 mM a pH 7,4 (PBS), *Luria-Bertani (LB) agar*, il 4,6-diamidino-2-fenilindolo dicloridrato (DAPI), lo ioduro propidio (PI), Dulbecco *medium* essenziale minimo (DMEM) e penicillina-streptomomicina sono stati ottenuti da *Sigma-Aldrich*. Diclorometano, metanolo, e solventi per HPLC sono stati ottenuti da *Merck* (Darmstadt, Germania). La linea cellulare di cheratinociti immortali non cancerogeni HaCaT è stata fornita da *Cell Lines Service (CLS)*, Germania. L'utilizzo di cellule umane per le analisi scientifiche ha seguito i principi etici riguardanti la sperimentazione umana, preventivamente approvata dal comitato etico locale.

1.2.2 Sintesi di nanoparticelle di TiO₂

Le nanoparticelle di TiO₂ sono state preparate mediante sintesi idrotermale [119, 120]. Una soluzione precursore è stata ottenuta aggiungendo goccia a goccia 6 mL di isopropossido di Ti/isopropanolo (Sol-1, 3,38 M in TTiP) a 31,3 mL di soluzione acquosa a pH 1,5 ottenuto con acido acetico (Sol-2). Dopo l'aggiunta di Sol-1 è stato ottenuto un precipitato bianco che, sotto agitazione a temperatura ambiente per due giorni, ha portato a una soluzione colloidale giallastra, indicando così la risospensione del precipitato e la riduzione della dimensione delle particelle al di sotto di 20 nm [121]. La trietilammina è stata quindi aggiunta goccia a goccia alla soluzione colloidale di TiO₂ fino a raggiungere il pH 7. La sospensione del precipitato bianco ottenuta è stata, quindi, sigillata in un recipiente di *teflon*.

(il volume del liquido corrispondente al 75% del totale), posta in un forno a circolazione e conservata a 120°C per 24 h. Le polveri di TiO₂ sono state ottenute per centrifugazione e 3 lavaggi con acqua distillata. Al termine del processo, i precipitati ottenuti sono stati risospesi in acqua.

1.2.3 Sintesi di nanoparticelle ibride TiO₂ DHICA

Le nanoparticelle ibride TiO₂DHICA sono state preparate seguendo quasi la stessa procedura utilizzata per la sintesi di nanoparticelle nude. Brevemente, dopo aver ottenuto la soluzione colloidale giallastra di TiO₂, sono stati aggiunti 10 mg di DHICA per 1,193 mL di TTiP appena prima della neutralizzazione con TEA fino a raggiungere il pH 7. La soluzione è diventata marrone subito dopo l'aggiunta di DHICA. Diversi rapporti dei due precursori, TTiP e DHICA, sono stati utilizzati per sintetizzare le nanostrutture al fine di indagare l'effetto del contenuto di eumelanina sulle proprietà strutturali e biologiche delle nanostrutture finali. In base alle diverse quantità del monomero DHICA utilizzato, le nanoparticelle finali sono state indicate come TiO₂DHICA0.5, TiO₂DHICA1, TiO₂DHICA2, TiO₂DHICA5 e TiO₂DHICA20. Nello specifico, i campioni ottenuti dopo la sintesi idrotermale (a 120 ° C per 24 h) sono denominati TiO₂DHICA__{ti}. In seguito, quantità specifiche di TiO₂DHICA__{ti} sono state sottoposte ad ossidazione mediante esposizione ad un'atmosfera ossidante (atmosfera di ossigeno e vapori di ammoniaca) a temperatura controllata (25–40°C). I vapori di ammoniaca sono stati prodotti equilibrando l'atmosfera con una soluzione di ammoniaca (dal 28% al 7% di NH₃ in H₂O) in una camera sigillata alla pressione di 1 atm. I tempi di esposizione variavano tra le 2 e le 18 ore. I campioni ottenuti dopo questa procedura sono denominati TiO₂DHICA__{polym}. Infine, come controllo sono state preparate nanoparticelle di DHICA-eumelanina nuda [122].

1.2.4 Sintesi di nanoparticelle ibride TiO₂ DOPA

La polimerizzazione della L-3,4-diidroossifenilalanina (L-DOPA) in presenza di TiO₂-sol è stata realizzata eseguendo il protocollo utilizzato per ottenere nanoparticelle ibride di TiO₂DHICA. Sono stati utilizzati diversi rapporti dei due precursori, TTiP e DOPA. In dettaglio, in seguito alla formazione di una sospensione colloidale composta da piccole nanoparticelle di TiO₂, è stata aggiunta una quantità specifica di DOPA (20 mg per 1,193 mL di TTiP) appena prima dell'aggiunta di TEA. È stata ottenuta una sospensione arancione, sigillata all'interno di un recipiente di *teflon* (il volume del liquido corrispondente al 75% del totale), posta in un forno a circolazione e mantenuto a 120 ° C per una notte. Le nanostrutture ibride a base di TiO₂DOPA sono state recuperate mediante centrifugazione e ripetuti lavaggi con acqua distillata. I campioni ottenuti sono indicati come TiO₂DOPA_{ti}. Allo stesso modo delle nanostrutture ibride TiO₂DHICA, aliquote delle sospensioni di TiO₂DOPA_{ti} sono state sottoposte ad ossidazione mediante esposizione ad un'atmosfera ossidante e indicate, al termine del processo, come TiO₂DOPA_{polym}. Infine, come controllo sono state preparate nanoparticelle di DOPA-eumelanina nuda [123].

1.2.5 Preparazione di superfici rivestite

Le superfici rivestite sono state preparate mediante procedura di *drop casting* (goccia di fusione), ponendo un volume specifico di sospensione di nanostrutture TiO₂DHICA su vetrini circolari di 15 mm di diametro usati come supporti. Prima della deposizione, ciascun supporto era stato opportunamente idrofilizzato su un lato mediante *Oxygen Plasma Etching* (per 2 minuti a 0,50 mbar). Pochi secondi dopo il processo di incisione, 200µL di una sospensione acquosa di nanostrutture TiO₂DHICA da 1,5 mg/mL sono stati depositati goccia a goccia sui vetrini in modo da avere 300µg di nanostrutture che coprivano in modo

omogeneo la superficie di ciascun supporto, con un grado di rivestimento impostato a 170 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. In seguito, la serie di supporti è stata essiccata in stufa ventilata a 60°C per 20 minuti per allontanare il solvente.

1.2.6 Preparazione di fibre elettrofilate

Policaprolattone e polidrossibutirrato sono stati sciolti a 80°C sotto agitazione magnetica in una soluzione di CHCl_3 : EtOH = 4:1 v/v per 3 ore. Dopo il raffreddamento, la sospensione di nanoparticelle in etanolo (74 mg/mL) è stata aggiunta alla soluzione di polimeri. La concentrazione finale di PCL e PHB era rispettivamente di 68 e 52 mg/mL, mentre il contenuto di nanoparticelle TiO_2DHICA nella sospensione era del 9,4% in peso (su base secca). La sospensione così preparata è stata utilizzata per generare membrane nanofibrose PCL/PHB/ TiO_2DHICA in un unico passaggio mediante una procedura di elettrofilatura ad ago singolo. Le deposizioni sono state effettuate su carte da filtro imbevute di una soluzione PEDOT: PSS che è un complesso polielettrolitico disponibile in commercio, conduttivo e solubile in acqua utilizzato per rendere la carta più conduttiva. La soluzione polimerica è stata caricata in siringhe di vetro e collegata a una pompa a siringa (modello KDS 200, KD *Scientific*). Le deposizioni sulle fibre sono state effettuate in condizioni ambientali in un impianto di elettrofilatura fatto in casa (IIA-CNR, Monterotondo, Roma, Italia) dotato di una *clean box* ventilata. Il tempo di deposizione è stato fissato a 25 min per ottenere un sottile tappetino elettrofilato sulla carta conduttrice. I campioni ottenuti con questa procedura sono denominati come garze PCL/PHB cariche di TiO_2DHICA . Successivamente, è stata studiata una diversa strategia di caricamento del *nanofiller*: una dispersione di acqua, etanolo e TiO_2DHICA (~ 10 mg/mL; H_2O : EtOH = 10:1) è stata utilizzata per funzionalizzare un lato della garza PCL/PHB mediante tecnica *elettrospray*. Circa 3,4 mg di TiO_2DHICA sono stati spruzzati sulla garza di 170 mg durante la procedura di deposizione al fine di ottenere uno

strato omogeneo e robusto facile da maneggiare senza distacco di particelle. I campioni ottenuti saranno indicati come garze di PCL/PHB rivestite di TiO₂DHICA.

1.2.7 Determinazione del contenuto di eumelanina

Il campione con un contenuto di particelle ibride o sintetiche di eumelanina (da 10 a 5 mg) è stato sospeso in 1 mL di NaOH (1M) e trattato con H₂O₂ all'1,5% a temperatura ambiente e sotto vigorosa agitazione. Dopo 24 h la miscela è stata trattata con 5% di Na₂S₂O₅, portata a pH 4 con 85% di H₃PO₄, filtrata utilizzando membrane di nylon (13 mm, 0,45 µm; *Alltech Associates, Deerfield, IL, USA*) e analizzata mediante HPLC. Le analisi cromatografiche sono state eseguite su uno strumento *Shimadzu SCL-10AV VP* dotato di un rivelatore UV-visibile SPD-10AV VP, impostato a 254 e 280 nm. È stata utilizzata una colonna *Synergi Hydro-RP 80A* (250 mm×4,60 mm, 4 µm; *Phenomenex, Torrance, CA, USA*), con acido formico all'1% portato a pH 2,8 con idrossido di sodio/metanolo 97:3 (v/v) come l'eluente, ad una velocità di flusso di 0,8 mL/min. I surnatanti sono stati analizzati con uno spettrofotometro *Shimadzu UV-2600* (*Shimadzu Italia, Milano, Italia*) determinando i valori di assorbanza a 350 nm. Il contenuto di melanina è stato stimato dalla media di tre misurazioni indipendenti.

1.2.8 Caratteristiche chimico-fisiche delle nanostrutture ibride

La morfologia delle nanostrutture ibride è stata studiata eseguendo analisi di microscopia elettronica a trasmissione. In particolare, i campioni sono stati preparati posizionando una goccia delle sospensioni ibride su un lato delle griglie di rame, 200 mesh con membrana di carbonio. Le immagini TEM sono state scattate con un microscopio *TECNAI 20 G2: FEI COMPANY (CRYO-TEM-TOMOGRAPHY)*. La superficie specifica (SBET) e il volume dei pori (VP) dei nanoibridi sono stati valutati generando isoterme a sette punti a 77 K per

l'adsorbimento di N₂ (*Autosorb-1, Quantachrome*) utilizzando una quantità di campione di carbone in grado di fornire una superficie specifica pari a 5 m² nella cella del campione. Gli esperimenti di risonanza elettronica paramagnetica sono stati condotti mediante lo spettrometro *Bruker Elexys E-500 in banda X (9 GHz) (Bruker, Rheinstetten, Germania)*, dotato di una sonda ad altissima sensibilità. I campioni analizzati sono stati posti in capillari di vetro sigillati a fiamma e inseriti coassialmente in un tubo di quarzo *standard* da 4 mm. Le misurazioni sono state eseguite a ~ 25 °C. Le impostazioni strumentali utilizzate per l'analisi sono state definite come segue: ampiezza di scansione di 100 G; frequenza di modulazione di 100 kHz; ampiezza di modulazione di 1.0 G e risoluzione di 1024 punti. Basandosi su questi parametri di acquisizione definiti, gli spettri EPR hanno permesso di monitorare in modo specifico la componente organica. In dettaglio per le nanostrutture ibride TiO₂DOPA, sono state registrate due serie di misure EPR: la prima è stata eseguita sulle miscele acquose delle nanostrutture ibride, mentre la seconda è stata realizzata sulle polveri solide delle nanostrutture ibride finali TiO₂DOPA al fine di indagare le proprietà chimiche e strutturali della parte organica all'interno dei nanoibridi. Per ogni campione sono stati raccolti 12 spettri differenti. L'analisi quantitativa (cioè i valori del fattore g e della densità di *spin*) degli spettri EPR è stata realizzata mediante uno *standard* interno composto da polvere di MgO/MnO, inserita nel tubo di quarzo coassialmente con i campioni analizzati [124]. L'analisi quantitativa degli spettri EPR è stata realizzata specificatamente determinando l'ampiezza della linea di segnale, ΔB , misurata come distanza picco-picco del segnale derivato prima (*output* strumentale), mentre la determinazione dei contributi gaussiano e lorentziano alla linea-forma è stata ottenuta stimando il rapporto $\Delta B_{1/2} / \Delta B$, dove $\Delta B_{1/2}$ è la larghezza a metà altezza del segnale di assorbimento EPR. In tutti i casi considerati, le caratteristiche della forma della linea sono state stimate e riportate come percentuali del carattere lorentziano. Le misurazioni UV-Vis della riflettanza diffusa sulle

polveri sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro *Jasco* e BaSO₄ come riferimento nell'intervallo di lunghezze d'onda 190–850 nm. D'altra parte, gli spettri di assorbimento dell'UV-Vis sulle miscele reattive sono stati registrati con uno spettrometro *UV-Vis Cary* 100 da 250 a 800 nm, ponendo il campione in cuvette di quarzo con percorso ottico di 1 cm.

1.2.9 Indagini EPR: *spin-trapping* e *spin-labeling*

Sono state eseguite due serie di misurazioni EPR, utilizzando metodi di *spin-trapping* e *spin-labeling*. Il primo serve a rilevare la produzione di ROS da nanoibridi TiO₂DHICA, mentre il secondo ci consente di indagare l'interazione delle nanostrutture con doppi strati lipidici che mimano le membrane esterne dei *Gram* negativi. Per la rilevazione dei ROS i campioni sono stati preparati utilizzando la seguente procedura: una quantità specifica di *5,5-dimetil-pirrolina-N-oxide* (DMPO) è stata aggiunta in 1 mL di sospensioni di nanostrutture ibride (a una concentrazione di 2 mg/mL) in modo da avere una concentrazione di *spin-trap* finale di 20mM. Dopo 10 minuti dalla preparazione della dispersione, i campioni sono stati centrifugati e i supernatanti sono stati analizzati mediante spettroscopia EPR. Per studiare l'interazione delle nanostrutture con le biomembrane, sono stati preparati i liposomi di fosfatidiletanolamina (DOPE)/fosfatidilglicerato (DOPG)/LPS 48/12/40 w/w/w (60/15/25 mol⁻¹ mol⁻¹ mol⁻¹) mescolando quantità appropriate di DOPE, DOPG e LPS di *Escherichia coli* O111: B4, sciolto nella miscela CH₂Cl₂ – CH₃OH (2:1 v/v, concentrazione di lipidi 10 mg/mL), in una provetta a fondo tondo. Per eseguire misurazioni EPR, è stato aggiunto anche un volume appropriato di fosfatidilcolina (n-PCSL) marcata con *spin* in etanolo (1 mg/mL) alla miscela organica lipidica in modo da avere un contenuto di *spin-label* uguale all'1% in peso dei lipidi totali. Quindi, è stato prodotto un sottile *film* lipidico evaporando i solventi con azoto gassoso secco. I *film* essiccati sono stati idratati con 50mL di tampone fosfato 10 mM (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl a pH 7,4) e ripetutamente vortexata, ottenendo una

sospensione di vescicole Multi-Lamellare (MLV), che è stata poi estrusa a temperatura ambiente (11 estrusioni attraverso una membrana di policarbonato da 100 nm) per ottenere una sospensione di vescicole unilamellari grandi (LUV). Campioni di lipidi contenenti rispettivamente nanostrutture di TiO₂DHICA, TiO₂ nudo e DHICA-eumelanina sono stati preparati seguendo la stessa procedura, aggiungendo una quantità specifica della corrispondente sospensione di nanostrutture a quelle di liposomi. Il rapporto nanostrutture-lipidi era 0,5:1 p/p. Gli esperimenti EPR sono stati condotti mediante lo spettrometro *Bruker Elexys E-500* in banda X (9 GHz) (*Bruker, Rheinstetten, Germania*), come riportato nel paragrafo 2.7.

1.2.10 Rilevazione di H₂O₂ con metodo spettrofotometrico

Per rilevare H₂O₂ nelle sospensioni di nanostrutture è stato utilizzato il *test* di ossidazione ferrosa xilenolo arancione (FOX). Più in dettaglio, 0,2 mL di sospensione di nanoparticelle TiO₂DHICA_polym (1,5 mg/mL) sono stati incubati in assenza e in presenza di 0,2 mL di H₂O₂ 0,25 mM (30 min). Ciascuna soluzione è stata trattata con 4 mL di miscela di reagenti contenente 0,10 mM di xilenolo arancio, 0,25 mM di ammonio ferro (II) solfato esaidrato in 250 mM H₂SO₄ (30 mL) e 3,88 mM di 1,1,3,3-tetrametossipropano, idrossianisolo butilato (BHA) in metanolo (270 mL). Dopo 30 minuti sotto agitazione a temperatura ambiente, è stata misurata l'assorbanza a 593 nm. Gli esperimenti di controllo sono stati eseguiti in assenza di TiO₂DHICA_polym o H₂O₂. È stata preparata anche una curva di calibrazione con H₂O₂ [125].

1.2.11 Saggi di attività antimicrobica delle nanostrutture ibride

L'attività antimicrobica dei campioni TiO₂, TiO₂DHICA_ti, TiO₂DHICA_polym, TiO₂DOPA_ti e TiO₂DOPA_polym è stata valutata rispetto a *Escherichia coli* DH5 α . Una singola colonia del ceppo è stata risospesa in 5 mL di brodo di coltura *Luria-Bertani* e incubato per una notte a 37°C. Quando la coltura ha raggiunto un OD600 di 1 unità, è stata diluita (1:100) in tampone fosfato 20 mM a pH 7,0. Le sospensioni di nanoparticelle sono state sonicate in ghiaccio con un sonicatore al 50% di ampiezza per 10 min (alternando 30 secondi on/off) prima di preparare la miscela con i batteri. Nelle curve dose-risposta, i campioni sono stati preparati aggiungendo 1/25 del volume di cellule batteriche e le sospensioni di nanoparticelle sono state utilizzate a diverse concentrazioni (da 0 a 400 μ g/mL), il volume finale di 500 μ L è stato raggiunto con tampone fosfato 20 mM a pH 7,0. Lo stesso test è stato condotto su cellule di *Escherichia coli* DH5 α per valutare l'attività antimicrobica di:

- sospensioni di nanoparticelle conservate per diversi giorni (0, 2, 5, 15, 21) a una concentrazione fissa di 200 μ g/mL [126].
- surnatante delle nanoparticelle (volume % corrispondente alla concentrazione di NP di 200 μ g/mL), ottenuto per centrifugazione a 13000 rpm a 4°C per 2 ore, precipitazione delle nanoparticelle e filtrazione con filtri da 0,22 mm.
- H₂O₂ a diverse concentrazioni (da 0,1 a 1000 mM).

Il controllo negativo di ogni esperimento era rappresentato da cellule batteriche non trattate. I campioni sono stati incubati a 37°C per 10 minuti o 4 ore e al termine di ogni trattamento, due diluizioni (1:100 e 1:1000) di ciascun campione sono state piastrate su terreno agarizzato LB e incubate per una notte a 37°C. Il giorno seguente, la % di sopravvivenza batterica è stata stimata contando le colonie presenti su ciascuna piastra e confrontando le cellule trattate

con le nanoparticelle ai controlli. Le deviazioni standard erano meno del 5% per ogni esperimento eseguito in triplice copia.

1.2.12 Misurazioni delle perdite di adenosina trifosfato (ATP)

E. coli DH5 α è stato cresciuto in brodo *Muller Hinton* (MH) a 37°C fino alla fase logaritmica. Un mL di sospensione batterica è stato incubato con nanoparticelle di TiO₂, TiO₂DOPA_{ti} e TiO₂DOPA_{polym} (200 μ g/mL) per 10 min a 37°C. I campioni sono stati centrifugati e il surnatante è stato conservato a 4°C fino a ulteriore utilizzo. Il *pellet* batterico è stato risospeso in tampone di lisi (EDTA 4mM, Tris 100mM pH 7,75) e ulteriormente incubato a 100°C. I lisati cellulari sono stati quindi centrifugati e i supernatanti sono stati mantenuti in ghiaccio. Il controllo positivo dell'esperimento è rappresentato dalla polimixinaB (10 μ g/mL) nota per formare pori nella membrana e per determinare il rilascio di ATP, mentre il controllo negativo è rappresentato dall'ampicillina (50 μ g/mL). Successivamente, sono stati determinati i livelli di ATP intracellulare ed extracellulare utilizzando il *kit* di determinazione dell'ATP di *Molecular Probes*, secondo le istruzioni del produttore [127].

1.2.13 Saggio di eliminazione dei radicali DPPH

Le proprietà antiossidanti delle nanostrutture a base di TiO₂DOPA sono state studiate mediante il saggio di eliminazione dei radicali *1,1-difenil-2-picrylhydrazyl* (DPPH) [128]. In breve, 100 μ L di una sospensione di TiO₂DOPA a diverse concentrazioni (da 250 a 1000 μ g/mL) sono state aggiunte a 900 μ L di una soluzione metanolica DPPH (0,002% p/v). Le miscele sono state tenute al buio, a temperatura ambiente per 30 min. La riduzione della concentrazione di DPPH è stata quantificata misurando l'assorbanza a 515 nm. Gli esperimenti di controllo sono stati condotti utilizzando nanostrutture di TiO₂ nelle stesse condizioni; la DOPA nuda è stata usata come controllo positivo. L'attività di *scavenging* del

DPPH è stata espressa come IC50, cioè la concentrazione minima del campione in grado di consentire una diminuzione del 50% della concentrazione iniziale del radicale libero [129].

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato.

1.2.14 Caratterizzazione chimico-fisica e morfologica delle garze

PCL/PHB

Le analisi morfologiche delle garze e delle superfici di vetro sono state eseguite mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). Le misurazioni EPR sono state effettuate sulle garze PCL/PHB caricate con TiO₂DHICA e sulle garze PCL/PHB rivestite con TiO₂DHICA per verificare la presenza di nanostrutture ibride a base di melanina. Gli esperimenti sono stati eseguiti come descritto in precedenza nel paragrafo 2.8.

1.2.15 Assorbimento di acqua delle garze PCL/PHB

Le garze PCL/PHB nude e le garze caricate e rivestite con TiO₂DHICA sono state immerse in acqua o in una soluzione SBF, a tempi di ammollo differenti. I campioni sono stati rimossi dal liquido, l'acqua in eccesso è stata rimossa usando carta assorbente e sono stati determinati i valori di peso umido. L'assorbimento di acqua (*water uptake* WU) è stato valutato mediante l'equazione: $\%WU = [WM-DM] / (DM) \times 100$ dove WM e DM sono rispettivamente massa umida e massa secca. Sono state eseguite tre serie di esperimenti in triplice copia. Il valore WU è espresso come media \pm SD tra i risultati ottenuti.

1.2.16 Test di adesività batterica su garze PCL/PHB

Una singola colonia di *E. coli* DH5 α è stata risospesa in 5 mL di LB e incubata per una notte a 37°C. Quando la coltura ha raggiunto un OD600 di 1 unità, è stata diluita (1:100) su piastra a 12 pozzetti in diversi volumi (250, 500 e 1000 μ L) di tampone fosfato. Un pozzetto privo di vetrino ed un pozzetto contenente un vetrino nudo rappresentavano il controllo negativo, gli altri pozzetti contenevano oltre alle cellule batteriche un vetrino rivestito di TiO₂DHICA. La piastra è stata incubata a 37°C per 4, 24, 48 ore. Al termine di ciascun trattamento da ogni pozzetto sono state effettuate due diluizioni (1:100 e 1:1000), poste su terreno agarizzato e incubate per una notte a 37°C. Lo stesso *test* è stato eseguito su cellule di *E. coli* incubate in 250 μ L di PBS con garze PCL/PHB (controllo negativo), garze di PCL/PHB caricate con TiO₂DHICA e garze PCL/PHB rivestite di TiO₂DHICA. Il giorno successivo, la percentuale di adesione è stata stimata contando le colonie su ciascuna piastra. Le deviazioni standard erano inferiori al 5% per ogni esperimento eseguito in triplicato.

1.2.17 Doppia colorazione DAPI/IP e microscopia a fluorescenza

Per la doppia colorazione, 200 μ L di coltura batterica di *E. coli* DH5 α (a metà fase logaritmica) è stata incubata al buio per 10 minuti o 4 ore a 37°C in agitazione in presenza o assenza di TiO₂, TiO₂DHICA_polym, TiO₂DOPA_ti e TiO₂DOPA_polym ad una concentrazione di 200 μ g/mL. Dopo l'incubazione, 10 μ L di coltura batterica sono stati mescolati con una soluzione di DAPI (1 mg/mL concentrazione finale) e ioduro propidio 20 mg/mL. Allo stesso modo sono stati analizzati i vetrini, utilizzati per il test di adesività, incubati con cellule di *E. coli* DH5 α per 4, 24 e 48 ore in 250 μ l di PBS. Le diapositive sono state osservate utilizzando un microscopio a fluorescenza *Olympus BX51* (Olympus, Tokyo, Giappone) utilizzando un filtro DAPI (eccitazione/emissione: 358/461 nm). I tempi di

acquisizione standard erano 1000 ms per la doppia colorazione DAPI/IP. Le immagini sono state acquisite utilizzando una fotocamera digitale *Olympus DP70*.

1.2.18 Colture cellulari eucariotiche

Le cellule HaCat sono una linea cellulare di cheratinociti immortali aneuploidi trasformata spontaneamente da pelle umana adulta, ampiamente utilizzata nella ricerca scientifica [130]. Queste cellule sono state coltivate in *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM), integrato con il 10% di siero bovino fetale (FBS) e l'1% di penicillina-streptomicina a 37°C in atmosfera umidificata del 5% di CO₂. I composti TiO₂DHICA_polym, TiO₂DOPA_ti, TiO₂DOPA_polym, garze di PCL/PHB e garze di PCL/PHB rivestite di TiO₂DHICA sono stati utilizzati a concentrazioni crescenti per valutarne la citotossicità. [67]

1.2.19 Citotossicità su cellule HaCat

La citotossicità sulle cellule HaCat è stata valutata eseguendo il 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5difeniltetrazoliobromuro (MTT), saggio colorimetrico che valuta l'attività metabolica cellulare. Le cellule sono state coltivate, come descritto in precedenza, e piastrate in *multiwell* da 96 pozzetti ad una densità di 5x10³ cellule per pozzetto, in 200 µL di terreno contenente TiO₂DHICA_polym (100, 200, 400, 800 µg/mL) per 24 ore e DOPA_ti e DOPA_polym a 50, 100, 200, 400 µg/mL. In modo analogo è stata valutata la tossicità delle garze. Le cellule sono state coltivate come descritto in precedenza e piastrate in *multiwell* da 12 pozzetti a una densità di 1x10⁵ cellule per pozzetto, in 250 µL di terreno. Il pozzetto privo di garza rappresentava il controllo negativo, garze PCL/PHB e garze PCL/PHB rivestite con TiO₂DHICA sono state aggiunte a ciascun pozzetto per 4, 24, 48 e 72 ore. Dopo il trattamento, il terreno è stato aspirato e la soluzione MTT è stata aggiunta al pozzetto ad una concentrazione finale di 0,5 mg/mL. Dopo 4 ore di incubazione, la soluzione MTT è stata

rimossa e i sali di formazano sono stati sciolti in HCl 0,1 N. La sopravvivenza cellulare è stata espressa come assorbanza dei cristalli di formazano misurata a 570 nm con un lettore di piastre automatico (*Multi scan spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*). Il test di citotossicità è stato eseguito 3 volte. Le deviazioni standard erano sempre <5% per ogni esperimento.

1.2.20 Analisi statistica

I dati sono presentati come media \pm deviazione *standard* e ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il *GraphPad Software Prism* (versione 4.0; La Jolla, CA, USA) per determinare le differenze significative. i dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) seguita dal *test post-hoc* di *Tukey*. Le barre con la stessa lettera non indicano differenze statisticamente significative. Le barre con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (P<0,05).

1.3 Risultati

1.3.1 Contenuto di melanina

TiO₂ promuove la polimerizzazione dell'acido 5,6-diidrossiindolo-2-carbossilico [102]. Sono stati impostati diversi rapporti tra il precursore dell'eumelanina DHICA e il catalizzatore per la sua polimerizzazione TiO₂ durante la procedura di sintesi. Al fine di definire la composizione chimica degli ibridi, è stata seguita una procedura che prevede la degradazione ossidativa [101, 131] di nanosistemi ibridi mediante trattamento di una sospensione del campione appropriato, in acqua alcalina e perossido di idrogeno per 3 ore [102]. La reazione è stata interrotta mediante riduzione, acidificata ed estratta con acetato di etile. Gli acidi pirrolici organici estraibili sono stati analizzati e quantificati mediante HPLC consentendo di ottenere una stima indiretta del contenuto di eumelanina (vedi Tabella 1). I dati hanno confermato che il pigmento eumelanina si è formato all'interno degli ibridi. Un confronto approssimativo con un campione di DHICA-eumelanina ha permesso di stimare il contenuto di pigmento negli ibridi nell'intervallo 5–60% p/p per TiO₂DHICA_{ti} e TiO₂DHICA_{polym} a diversi rapporti TTiP/DHICA.

Campioni	Eumelanina		% cellule batteriche vive	
	ti	polym	ti	polym
TiO ₂	–		70	
TiO ₂ -DHICA0.5	5%		58	5
TiO ₂ -DHICA1	10%		57	1
TiO ₂ -DHICA2	15%		47	0
TiO ₂ -DHICA5	40%		36	0
TiO ₂ -DHICA20	60%		22	0

Tabella 1: Rese degli acidi pirrolici mediante degradazione ossidativa di nanosistemi ibridi per stimare il contenuto di eumelanina negli ibridi TiO₂DHICA.

1.3.2 Attività antimicrobica delle nanostrutture ibride

Di questi stessi nanosistemi TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{DHICA_ti}$ e $\text{TiO}_2\text{DHICA_polym}$ è stata studiata l'attività antimicrobica contro *Escherichia coli DH5 α* , in seguito ad esposizione agli UV responsabile della fotoattivazione del TiO_2 . Alle colture cellulari batteriche è stata aggiunta una sospensione di nanoparticelle a una concentrazione di 200 $\mu\text{g/mL}$. I risultati della caratterizzazione antimicrobica sono riportati in Figura 8 e riassunti nella Tabella 1 come % di sopravvivenza batterica riportata nel paragrafo precedente. Il TiO_2 nudo non era molto attivo contro il ceppo indicatore anche dopo l'irradiazione UV [101], $\text{TiO}_2\text{DHICA_ti}$ ha mostrato una significativa attività dopo l'irradiazione UV 254 e 366 nm e quando il contenuto di DHICA in $\text{TiO}_2\text{DHICA_ti}$ variava dal 5% al 60%. I nanosistemi $\text{TiO}_2\text{DHICA_polym}$ hanno mostrato una significativa attività antimicrobica anche senza irradiazione UV per tutti i campioni a diversi rapporti TTiP/DHICA.

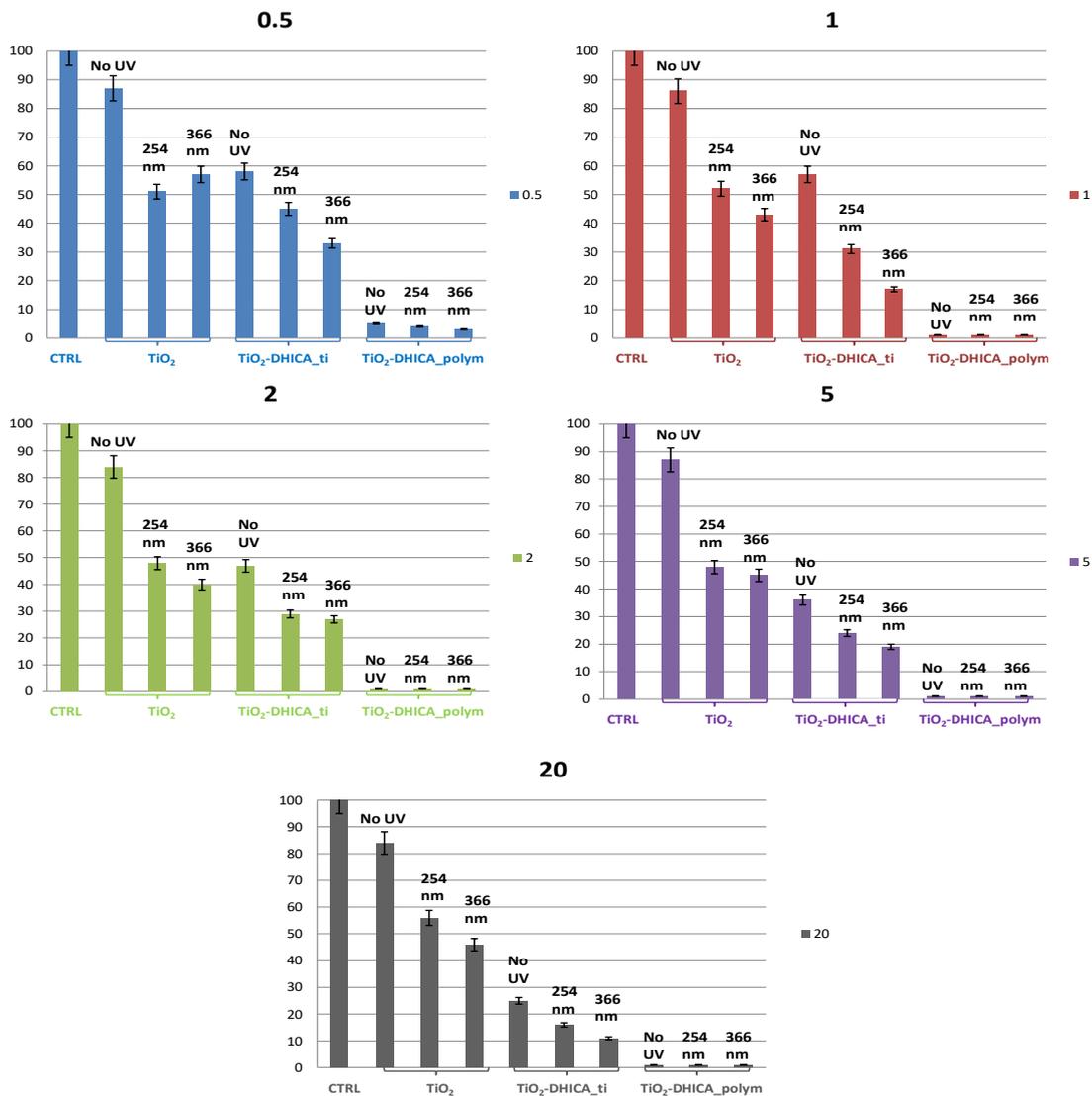


Figura 8: Attività antibatterica delle nanoparticelle a base di TiO₂ contro *Escherichia coli*. Sull'asse y è rappresentata la % di sopravvivenza batterica. La barra CTRL corrisponde alle cellule batteriche non trattate. 0.5, 1, 2, 5 e 20 indicano i diversi rapporti TTiP/DHICA utilizzati. I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti; le deviazioni *standard* risultano sempre inferiori al 5%.

In seguito, l'attività antimicrobica, riportata in tabella, è stata normalizzata a quella della DHICA-eumelanina nuda (RRA=1) e mostrata nella Figura 9 come attività antimicrobica relativa (RAA) sia per TiO₂DHICA_{ti} che per TiO₂DHICA_{polym}. Nella stessa figura, la linea orizzontale (RRA=1) corrisponde al valore di riferimento dell'attività antimicrobica relativa (RAA) della DHICA-emelanina nuda. I valori RRA degli ibridi TiO₂DHICA_{ti} sotto

luce visibile e irradiazione UV mostrano una tendenza all'aumento con la quantità di eumelanina all'interno dei campioni. Un graduale aumento dell'attività antimicrobica è anche apprezzato quando gli ibridi vengono irradiati con luce UV rispettivamente a 254 e 366 nm. Inoltre, da questo confronto, gli ibridi $\text{TiO}_2\text{DHICA_polym}$ sono apparsi chiaramente più attivi contro *Escherichia coli* DH5 α , suggerendo che l'ulteriore trattamento di ossidazione produce un miglioramento graduale nell'attività antibatterica dei nanomateriali. Inoltre, come mostrato in Figura 9, l'efficacia antimicrobica degli ibridi $\text{TiO}_2\text{DHICA_polym}$ apparentemente non dipende dal contenuto di eumelanina (a partire dal 10%) all'interno dei campioni. Al fine di comprendere i fattori alla base delle diverse prestazioni antimicrobiche degli ibridi, è stata effettuata una caratterizzazione chimico-fisica dettagliata.

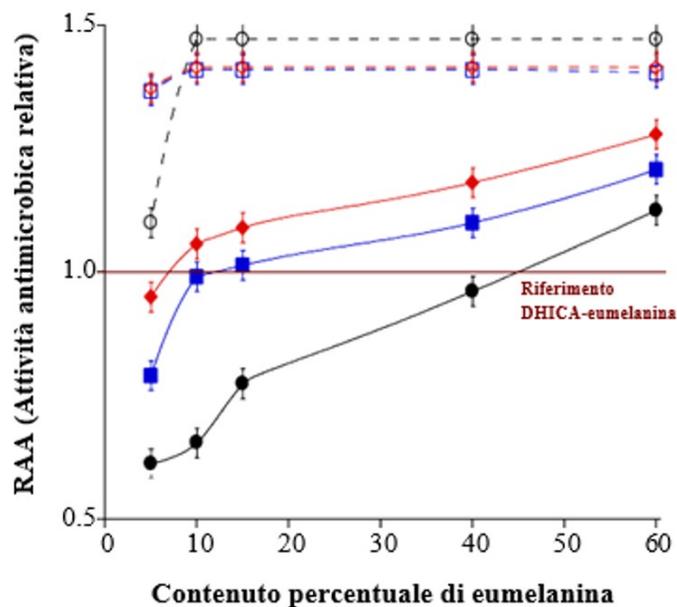


Figura 9: Dipendenza dal contenuto di eumelanina dell'attività antimicrobica relativa (RAA) esibita dagli ibridi $\text{TiO}_2\text{DHICA_ti}$ (simboli pieni) e $\text{TiO}_2\text{DHICA_polym}$ (simboli vuoti), dopo nessuna irradiazione UV (cerchi), irradiazione UV a 254 nm (quadrati) e 366 nm (rombi). Il RAA è stato calcolato normalizzando la % di morte cellulare causata dagli ibridi rispetto all'attività antimicrobica della DHICA-eumelanina nuda.

1.3.3 Analisi al microscopio elettronico a trasmissione

Al fine di comprendere i fattori alla base delle diverse prestazioni antimicrobiche degli ibridi, è stata effettuata una caratterizzazione chimico-fisica dettagliata. TiO_2 nudo, DHICA-eumelanina e le nanostrutture ibride di TiO_2 DHICA sono state studiate al TEM. Le immagini sono mostrate in Figura 10. Come mostrato nel pannello A, le nanostrutture nude di TiO_2 si mostrano simili a bastoncini (dimensioni 3×12 nm), mentre la DHICA-eumelanina presenta una forma cubica di circa 30 nm [101, 102]. Diverse morfologie sono state osservate per campioni ibridi (Figura 10B-F). il campione TiO_2 DHICA5 (Figura 10E) presenta particelle di forma arrotondata brunastra, di circa 10 nm; particelle con la stessa morfologia sono state apprezzate anche negli ibridi TiO_2 DHICA2. I cambiamenti nella morfologia sono dovuti al coinvolgimento della DHICA nella crescita degli ibridi [102, 132], in competizione con TEA come agente complessante, per l'affinità dei suoi gruppi catecolici per gli ioni Ti^{4+} [102]. Le immagini al TEM hanno indicato chiaramente che non sono state rilevate differenze prima e dopo la fase di polimerizzazione ossidativa e in dipendenza del contenuto di eumelanina.

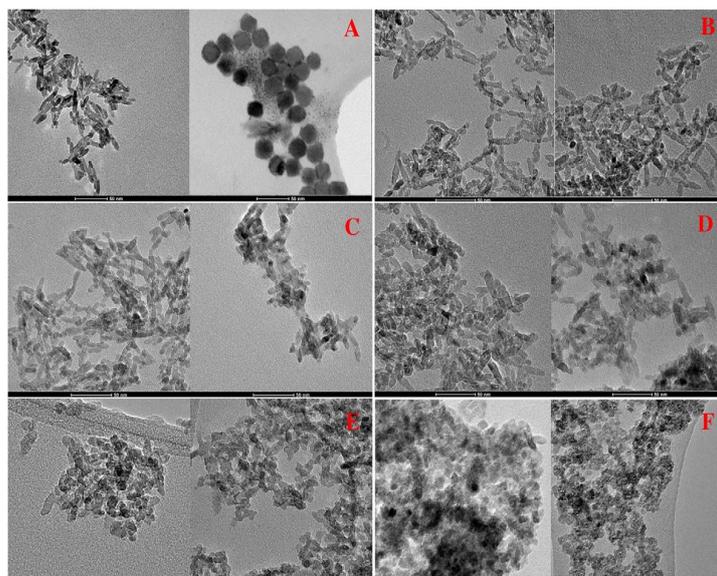


Figura 10: Micrografie TEM di TiO_2 nudo e DHICA-eumelanina (pannello A), TiO_2 DHICA0.5_ti e TiO_2 DHICA0.5_polym (pannello B), TiO_2 DHICA1_ti e TiO_2 DHICA1_polym (pannello C),

TiO₂DHICA2_ti e TiO₂DHICA2_polym (pannello D), TiO₂DHICA5_ti e TiO₂DHICA5_polym (pannello E), TiO₂DHICA20_ti e TiO₂DHICA20_polym (pannello F).

1.3.4 Analisi di risonanza elettronica paramagnetica

Successivamente abbiamo indagato sulle proprietà molecolari degli ibridi mediante EPR. L'analisi EPR fornisce informazioni significative sulla natura dei centri paramagnetici e sulle proprietà molecolari dei materiali solidi. Tutti gli spettri EPR sono riportati nella Figura 10, mentre i parametri spettrali calcolati da essi sono riassunti nella Tabella 2. Osservando la Figura 11, non è stato rilevato alcun segnale per TiO₂ nudo (spettro a), indicando l'assenza di ossigeno vacante o Ti³⁺ in queste polveri. Nella stessa figura, sono anche mostrati gli spettri EPR di TiO₂DHICA_ti (linee continue), TiO₂DHICA_polym (linee tratteggiate) a diversi rapporti TTiP/DHICA (pannello A) e lo spettro DHICA-eumelanina come controllo (pannello B). Tutti gli spettri EPR hanno mostrato un singolo segnale approssimativamente simmetrico a un valore g nell'intervallo di ~ 2.0035–2.0040, tipico dei radicali concentrati sul carbonio derivati dal processo di polimerizzazione di DHICA, in accordo con la letteratura [101, 102, 133]. Tuttavia, un'analisi più approfondita degli spettri ha mostrato che gli spettri TiO₂DHICA_ti e TiO₂DHICA_polym erano evidentemente più ampi di quello relativo a DHICA-eumelanina. La differenza nella forma delle linee è stata corroborata dalla determinazione quantitativa dell'ampiezza del segnale (ΔB). Questo parametro, rilevabile dagli spettri sperimentali (Figura 11), è correlato alla distanza media tra i centri dei radicali. I valori ΔB determinati dagli spettri TiO₂DHICA_ti e TiO₂DHICA_polym erano significativamente inferiori al valore ottenuto dallo spettro di DHICA-eumelanina. Questa evidenza indica che negli ibridi i centri radicali presentano una netta distribuzione spaziale all'interno delle nanostrutture, probabilmente a causa della presenza di TiO₂ che modula l'organizzazione macromolecolare. Questo effetto è particolarmente intenso nel caso degli

spettri TiO₂DHICA5_polym e TiO₂DHICA20_polym, come indicato da una maggiore distanza media tra i centri dei radicali ($\Delta B = 4,5 \pm 0,2G$) suggerendo che un'organizzazione molecolare diversa è indotta in campioni esposti ai vapori di NH₃.

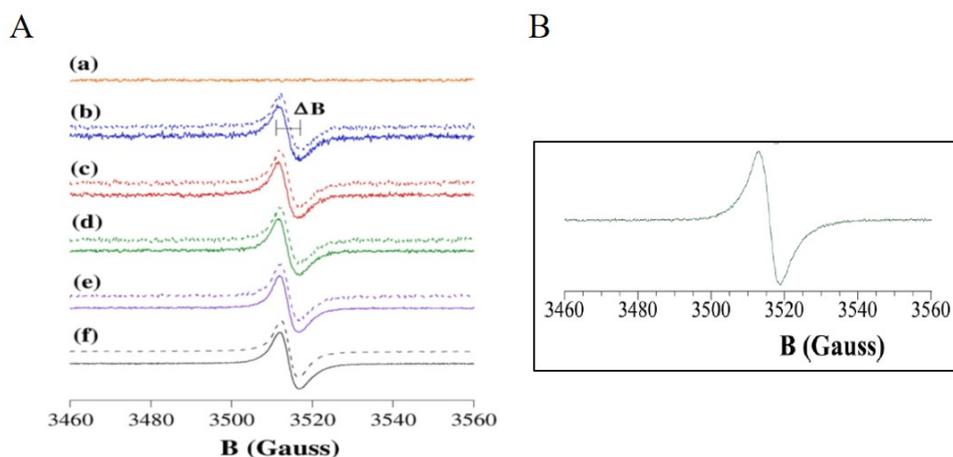


Figura 11: Pannello A: spettri EPR di TiO₂ (a), TiO₂DHICA_{ti} (linee continue) e TiO₂DHICA_{polym} (linee tratteggiate) con rapporti di peso TTiP/DHICA di 0,5 (b), 1 (c), 2 (d), 5 (e) e 20 (f). Pannello B: spettro EPR di DHICA-eumelanina.

	ΔB (G)	
	ti	polym
DHICA-eumelanina	–	5.6 ± 0.1
TiO ₂ -DHICA0.5	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1
TiO ₂ -DHICA1	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1
TiO ₂ -DHICA2	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1
TiO ₂ -DHICA5	5.0 ± 0.1	4.5 ± 0.1
TiO ₂ -DHICA20	4.9 ± 0.1	4.5 ± 0.1

Tabella 2: Parametri spettrali EPR per nanoibridi TiO₂DHICA.

1.3.5 Curve dose risposta

Abbiamo, quindi, proseguito con la valutazione dell'attività antimicrobica a diversi tempi e concentrazioni. DHICA-eumelanina, TiO₂DHICA_{ti} e TiO₂DHICA_{polym} sono stati utilizzati per le curve dose-risposta, incubando cellule di *E. coli* con diverse concentrazioni (da 0 a 400 $\mu\text{g/mL}$) di nanostrutture per testarne l'attività. Nel paragrafo 3.2 abbiamo

dimostrato che le NP hanno una eccellente attività antimicrobica contro il ceppo batterico *E. coli* dopo 4 ore di trattamento a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; dai risultati delle curve dose-risposta è stata confermata l'attività delle NP (Figura 12) ed è stata osservata per $\text{TiO}_2\text{DHICA_polym}$ un'azione biocida solo dopo 10 minuti di incubazione con le cellule di *E. coli*. Come mostrato in Figura 12, i risultati dell'attività antimicrobica sono proporzionali alla concentrazione delle NP e le curve sono quasi completamente sovrapponibili, indicando che l'attività antimicrobica era molto simile per entrambi i tempi di incubazione utilizzati. Una cinetica simile è stata verificata con nanostrutture DHICA–eumelanina e $\text{TiO}_2\text{DHICA_ti}$ ottenute senza l'esposizione a vapori di ammoniaca, come riportato nei pannelli B e C. Tuttavia, la nostra attenzione si è concentrata sui $\text{TiO}_2\text{DHICA_polym}$ che mostra la più alta attività antimicrobica rendendo loro il miglior candidato per future applicazioni nel campo farmacologico.

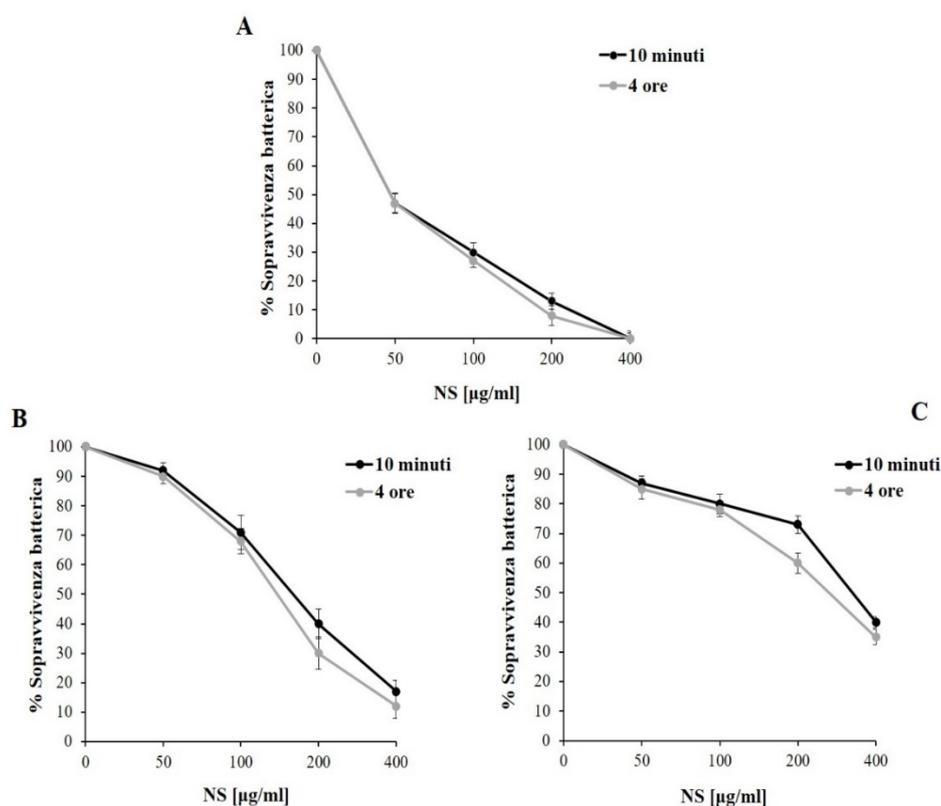


Figura 12: Attività antimicrobica di $\text{TiO}_2\text{DHICA_polym}$ (pannello A), DHICA-eumelanina (pannello B) e $\text{TiO}_2\text{DHICA_ti}$ (pannello C) a differenti concentrazioni (0–400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) valutate

mediante conta delle colonie, dopo 4 ore (cerchi grigi) e 10 minuti (cerchi neri) di incubazione, contro il ceppo *Escherichia coli* DH5 α . I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti; le deviazioni *standard* risultano sempre inferiori al 10%.

1.3.6 Test sulla stabilità delle nanostrutture *TiO₂DHICA_polym*

Abbiamo indagato sulla stabilità dell'attività antimicrobica utilizzando NP di *TiO₂DHICA_polym* ad una concentrazione di 200 $\mu\text{g/mL}$, dopo un diverso tempo di conservazione a temperatura ambiente. Come riportato in Figura 13, l'attività antimicrobica di *TiO₂DHICA_polym* era molto alta all'inizio, promuovendo la morte del 90% dei batteri, ed è diminuita lentamente dopo diversi giorni di conservazione. Tuttavia, dopo 21 giorni causava ancora il 50% di mortalità.

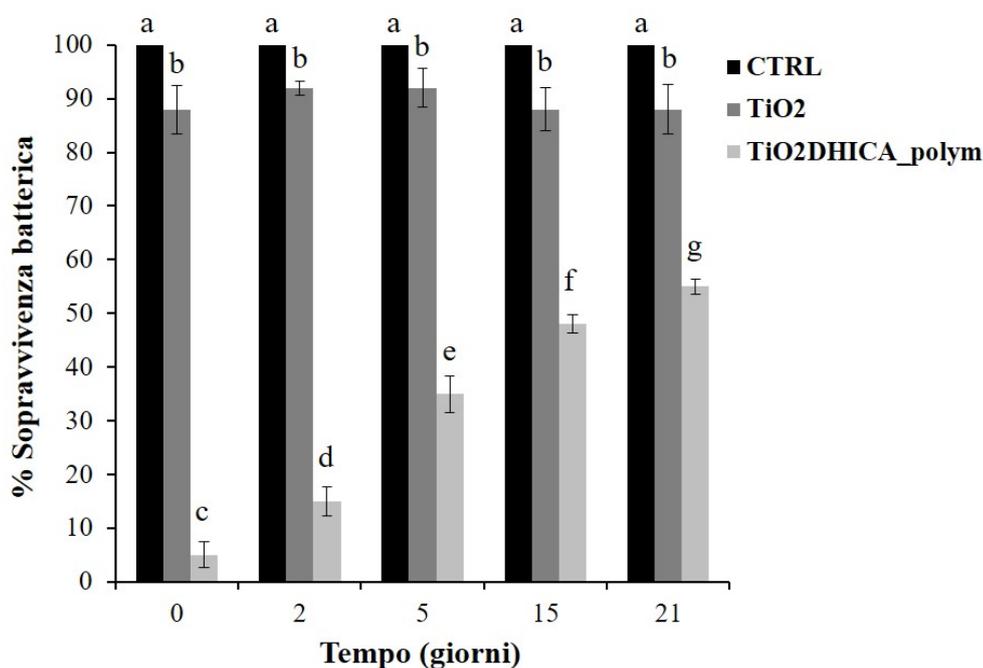


Figura 13: Attività antimicrobica di *TiO₂DHICA_polym* conservato per 21 giorni, valutato in base alla conta delle colonie, contro *Escherichia coli*. Ogni barra è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti; i dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) seguita dal *test post-hoc* di *Tukey*. Le barre con la stessa lettera non indicano differenze statisticamente significative. Le barre con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$).

1.3.7 Attività antimicrobica di surnatanti e in condizioni di oscurità

A questo punto ci siamo chiesti cosa determinasse la mortalità batterica e per valutare l'eventuale rilascio da parte delle nanostrutture di composti antimicrobici, come specie radicaliche, in soluzione a causa della degradazione dell'eumelanina, abbiamo deciso di separare le nanostrutture di TiO₂DHICA_polym dal solvente e di trattare le cellule batteriche con i supernatanti filtrati. I nostri dati hanno mostrato che il supernatante non presentava attività antimicrobica (Figura 14), che viene esplicitata, altresì, solo in seguito all'esposizione diretta dei batteri alle nanoparticelle.

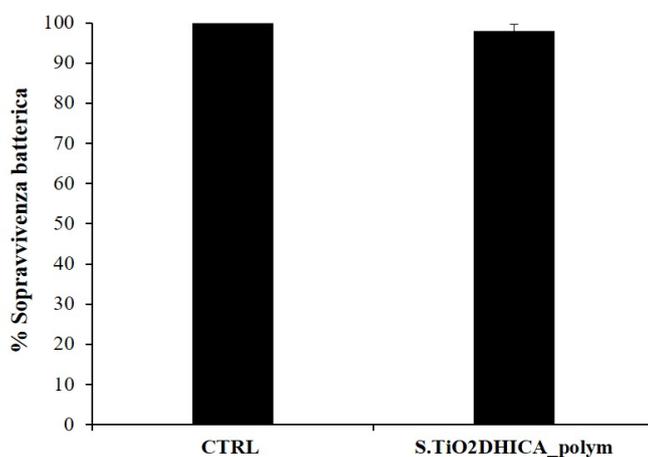


Figura 14: Attività antimicrobica del surnatante TiO₂DHICA_polym dopo 4 ore di incubazione contro *E. coli*. I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti.

Inoltre, sono stati eseguiti saggi di attività antimicrobica a una concentrazione fissa di nanostrutture ibride (200 µg/mL) in oscurità, condizione in cui è fortemente ridotta la produzione di specie radicaliche •OH. Come mostrato in Figura 15, c'è stata una leggera diminuzione dell'attività antimicrobica, rispetto allo stesso esperimento condotto alla luce.

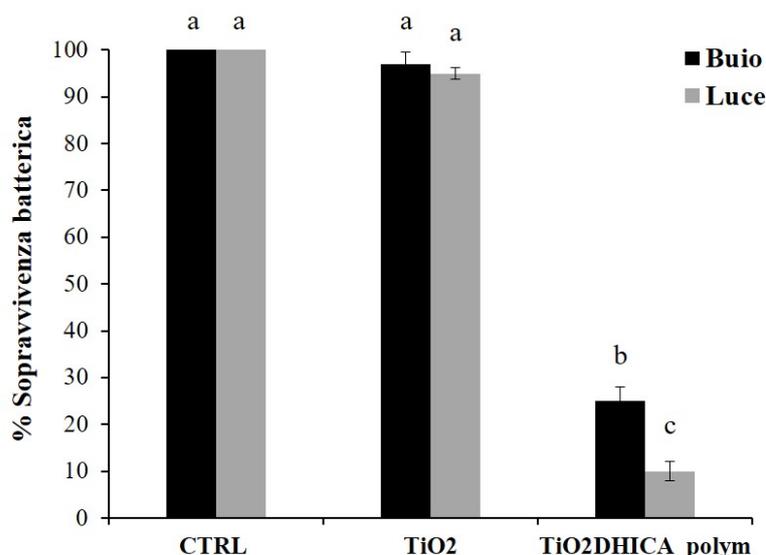


Figura 15: Attività antimicrobica delle NP contro le cellule di *E. coli* dopo 4 ore, al buio e alla luce. Il controllo (CTRL) è rappresentato da cellule batteriche non trattate con NP. Ogni barra è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti; i dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) seguita dal *test post-hoc* di Tukey. Le barre con la stessa lettera non indicano differenze statisticamente significative. Le barre con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,01$).

1.3.8 Esperimenti di *spin-trapping* EPR

Più in dettaglio per valutare se l'azione biocida delle nanostrutture fosse innescata dallo *stress* ossidativo è stata studiata, mediante il metodo di *spin-trapping* EPR, la generazione di specie reattive dell'ossigeno in ambiente acquoso. In effetti, la reattività chimica estremamente elevata di queste specie implica che hanno una durata troppo breve per essere rilevate, ostacolandone le misurazioni dirette. La tecnica dello *spin-trapping* EPR ha rappresentato un metodo utile per superare questo problema [102, 134, 135]. I radicali liberi reattivi si legano a reagenti adeguati come il DMPO, gli *spintraps*, per produrre addotti di *spin*, che sono radicali liberi a vita più lunga e possono essere monitorati mediante spettroscopia EPR a temperatura ambiente. Preventivamente, abbiamo verificato che il DMPO nella sospensione acquosa di nanoparticelle non producesse segnali di interferenza

(Figura 16A). Sia DHICA–eumelanina che TiO₂DHICA_polym in ambiente acquoso promuovono la comparsa di un segnale nello spettro EPR che mostra un caratteristico quartetto con un rapporto di intensità 1:2:2:1 (Figura 16B–D). Esso corrisponde all'addotto DMPO-OH formato dalla cattura del radicale •OH su DMPO. È stata realizzata un'analisi quantitativa di questo spettro che ha fornito valori coerenti con quelli riportati in letteratura per lo stesso addotto, confermando la formazione di quantità significative di radicali •OH nelle sospensioni di nanostrutture DHICA–eumelanina e TiO₂DHICA_polym. Nessun segnale è stato apprezzato nello spettro EPR di nanostrutture di TiO₂ nude in sospensione acquosa, confermando così l'assenza di specie radicaliche nel sistema. La concentrazione e l'evoluzione nel tempo di •OH prodotta da DHICA-eumelanina e TiO₂DHICA_polym, conservati sia alla luce che al buio, è stata determinata valutando l'intensità degli spettri EPR degli addotti. In particolare, è stato ottenuto mediante doppia integrazione del primo segnale derivato utilizzando i metodi standard riportati in lavori precedenti. I risultati sperimentali, riportati in Figura 17A, hanno indicato la formazione di una bassa concentrazione di •OH (10⁻⁸ μM) per tutti i sistemi considerati. In particolare, nel caso di DHICA-eumelanina e TiO₂DHICA_polym conservate al buio, non sono state osservate variazioni significative nel tempo, mentre una leggera diminuzione è stata osservata nei primi 15 giorni nel caso di TiO₂DHICA_polym conservato alla luce. Infine, nella Figura 17B, sono state correlate l'evoluzione temporale della concentrazione di •OH prodotta da TiO₂DHICA_polym esposte alla luce alla corrispondente attività biocida, mostrando una tendenza decrescente simile.

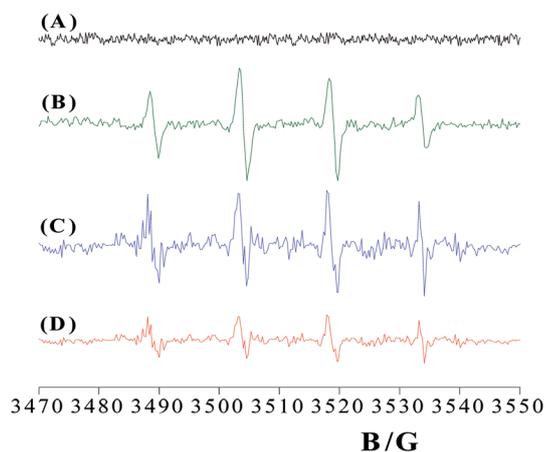


Figura 16: Spettri EPR di una soluzione acquosa di DMPO a 25 mM (A), in presenza di DHICA-eumelanina (B), in presenza di TiO₂DHICA_polym esposto alla luce (C) e al buio (D).

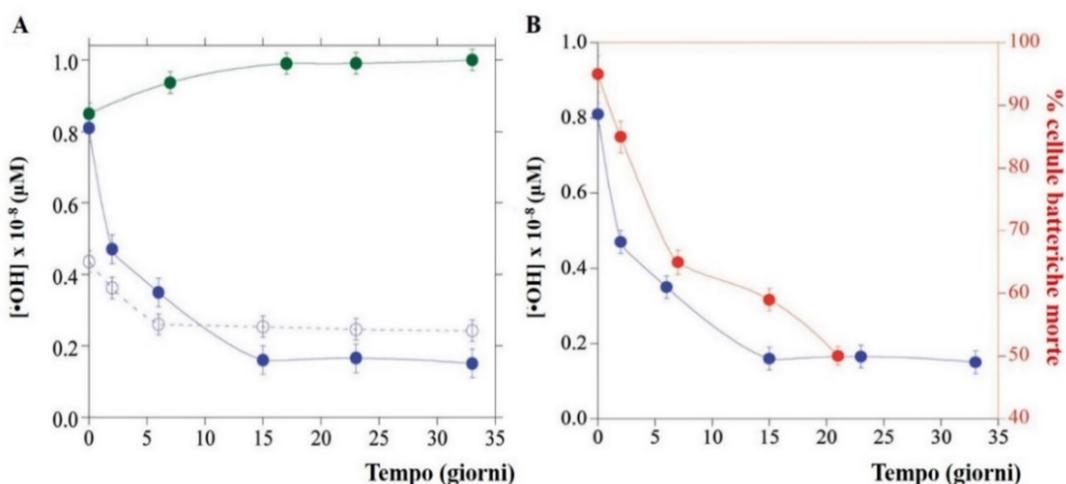


Figura 17: (Pannello A) Evoluzione temporale di •OH formato in sospensione acquosa da DHICA-eumelanina (punti verdi) e TiO₂DHICA_polym esposto alla luce (punti blu pieni) e al buio (punti blu aperti). (Pannello B) Evoluzione temporale di •OH formato da TiO₂DHICA_polym esposto alla luce (punti blu) rispetto alla corrispondente attività antimicrobica esercitata (punti rossi).

1.3.9 Generazione di H₂O₂ e il suo effetto sull'attività antimicrobica

Al fine di valutare il potenziale ossidativo delle nanostrutture, è stata anche controllata la possibile generazione di H₂O₂ per la sua nota tossicità. Il *test*, basato sul metodo FOX, ha rivelato la formazione di $0,10 \pm 0,02 \mu\text{M}$ di H₂O₂ da parte di una sospensione di particelle (1,5 mg/mL) dopo 30 min di incubazione sotto flusso di ossigeno. Sebbene sia stata osservata

la formazione di H_2O_2 , il livello rilevato è apparso troppo basso per una possibile azione biocida, a causa delle condizioni altamente ossidanti richieste (cioè il flusso di ossigeno). Per comprendere il contributo del perossido di idrogeno all'attività antimicrobica delle NP, è stata eseguita una curva dose-risposta aggiungendo alle cellule batteriche H_2O_2 a diverse concentrazioni (da 0 a 1000 μM). La mortalità cellulare era proporzionale all'aumento della concentrazione di H_2O_2 come mostrato in Figura 18 ma alla concentrazione trovata nella soluzione di nanoparticelle ovvero 0,10 e 0,02 μM , l'attività antimicrobica del perossido di idrogeno era assente.

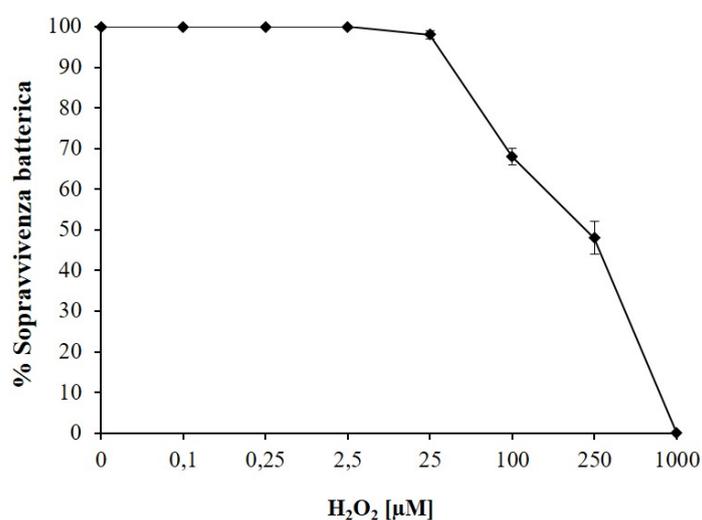


Figura 18: Attività antimicrobica del perossido di idrogeno a diverse concentrazioni (0,1-1000 μM) valutate mediante saggio di conta delle colonie, contro *Escherichia coli*. I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti.

1.3.10 Esperimenti di spin-labeling EPR

Basandoci sui dati ottenuti, la formazione di ROS potrebbe, dunque, spiegare solo in minima parte l'attività antibatterica delle nanostrutture TiO_2DHICA . Di conseguenza per validare l'ipotesi secondo cui a causare la mortalità batterica è soprattutto il contatto tra i microrganismi e le nanostrutture sono stati condotti esperimenti di *spin-labeling* mimando

la struttura della membrana batterica esterna. DOPE e DOPG sono stati scelti per riprodurre i fosfolipidi zwitterionici e cationici solitamente presenti nelle membrane batteriche esterne mentre il lipopolisaccaride *Escherichia coli* O111: B4 rappresenta la caratteristica molecola LPS che gioca il ruolo chiave nella patogenesi delle infezioni da *Gram* negativi [136, 137]. La fosfatidilcolina marcata con *spin* sulla posizione 5 della catena acilica sn-2 (5-PCSL) è stata incorporata nei doppi strati lipidici di DOPE/DOPG/LPS 48/12/40 w/w/w. 5-PCSL monitora la regione del doppio strato appena sotto l'interfaccia idrofila ed è il più indicativo per valutare i cambiamenti nella microstruttura del doppio strato. Gli spettri 5-PCSL nelle membrane DOPE/DOPG/LPS in assenza e presenza di nanostrutture TiO₂DHICA_polym, TiO₂ nudo e DHICA-eumelanina sono mostrati in Figura 19. In tutti i casi si osserva una forma di linea anisotropa ben risolta, che indica che il movimento rotatorio delle molecole marcate lungo un asse è diverso da quello nelle altre due direzioni. Questa forma di linea è tipica delle molecole associate a strutture stratificate come i doppi strati lipidici, in cui la rotazione lungo l'interfaccia del doppio strato è diversa rispetto a quelle lungo gli assi che giacciono su di essa. Pertanto, gli spettri EPR dimostrano chiaramente che TiO₂ nudo (Figura 19C) e DHICA-eumelanina (Figura 19D) non causano cambiamenti significativi nello spettro di 5-PCSL nei doppi strati DOPE/DOPG/LPS. Al contrario, è stato osservato un forte aumento del carattere anisotropo nello spettro dopo l'aggiunta di TiO₂DHICA_polym (Figura 19B), suggerendo una significativa perturbazione dei doppi strati lipidici causata dalle nanostrutture ibride.

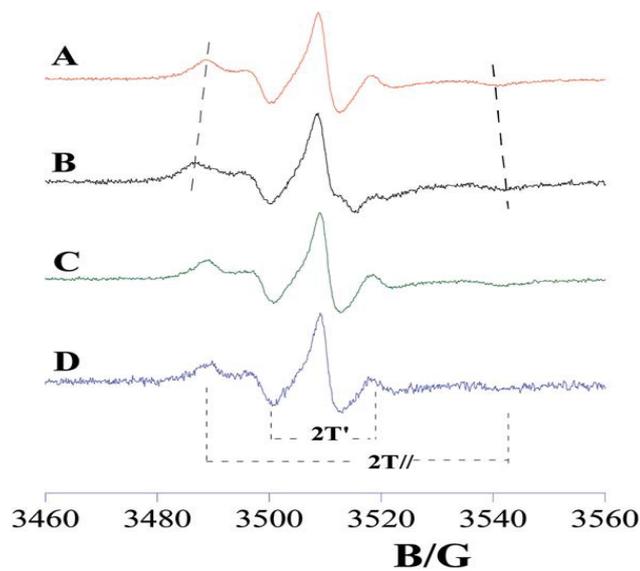


Figura 19: Spettri EPR di 5-PCSL in membrane DOPE/DOPG/LPS prima dell'aggiunta di nanostrutture (A) dopo l'aggiunta di TiO₂DHICA_polym (B), TiO₂ nudo (C) e DHICA-eumelanina (D).

1.3.11 Rilevazione dell'interazione nanostrutture-batteri mediante microscopia a fluorescenza

Dagli esperimenti di *spin-labeling* abbiamo dimostrato una chiara interazione tra la membrana batterica e le nanostrutture. Per supportare questi dati e verificare l'effetto delle nanostrutture sull'integrità delle membrane batteriche, sono stati eseguiti esperimenti di microscopia a fluorescenza. Le cellule di *Escherichia coli* sono state utilizzate e colorate con DAPI, colorante fluorescente per il DNA e ioduro di propidio, in grado di entrare solo nelle cellule con membrane danneggiate e quindi considerato un indicatore di rottura della membrana cellulare. I risultati di questi esperimenti sono riportati nella Figura 20. Quando le membrane sono intatte, le cellule batteriche appaiono blu grazie al DAPI (Figura 20C). Dopo un trattamento con TiO₂DHICA_polym (200 µg/mL) per 10 minuti (Figura 20D), una quantità significativa di cellule ha sviluppato una fluorescenza rossa suggerendo

l'interruzione dell'integrità della membrana. La Figura 20B mostra l'adesione di cellule batteriche su un aggregato di nanoparticelle.

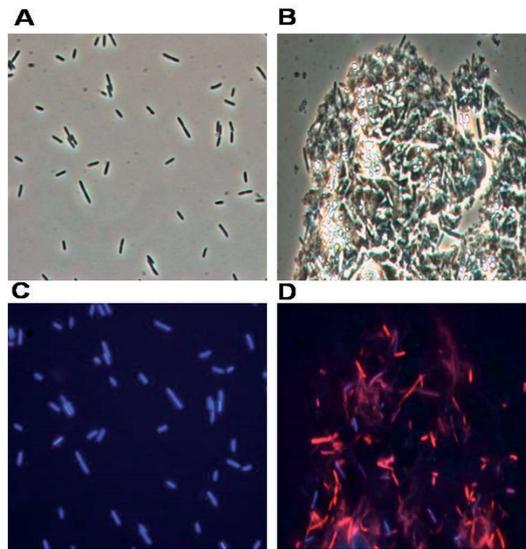


Figura 20: I pannelli mostrano cellule batteriche di *Escherichia coli* osservate in microscopia ottica (A e B) e in microscopia a fluorescenza (C e D). Cellule batteriche non trattate (A e C); cellule trattate con TiO₂DHICA_polym (B e D).

1.3.12 Analisi di citotossicità

Validata l'attività antimicrobica abbiamo indagato i possibili effetti citotossici su una linea di cheratinociti di pelle mediante saggio MTT secondo la procedura descritta nei metodi. Il test MTT è un saggio colorimetrico che permette di testare la proliferazione e la vitalità cellulare ed in particolare l'efficienza mitocondriale. L'MTT è un sale di tetrazolio che nel caso di cellule vitali viene ridotto dall'ambiente altamente riducente delle cellule proliferanti per azione della deidrogenasi mitocondriale. La riduzione dell'MTT determina la formazione di cristalli di formazano che attribuiscono la caratteristica colorazione violacea ai campioni. Al contrario in cellule non proliferanti o morte aventi quindi mitocondri non attivi, il sale non verrà ridotto, con una conseguente mancanza di colorazione violacea. Le

cellule sono state trattate con TiO₂DHICA_polym a varie concentrazioni (da 0 a 800 µg/mL) per 24 ore e, come mostrato in figura 21, non è stata riscontrata alcuna tossicità.

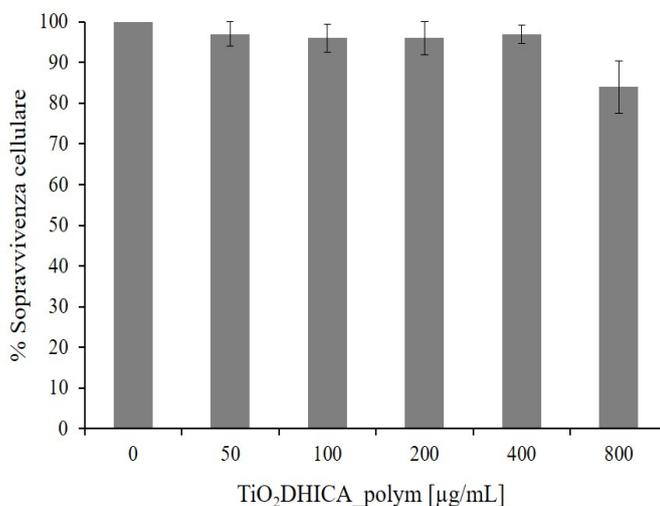


Figura 21: Effetti citotossici di TiO₂DHICA_polym (0-800 µg/mL) su cheratinociti mediante saggio MTT. I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti; le deviazioni *standard* risultano sempre inferiori al 10%.

1.3.13 Caratterizzazione di fibre elettrofilate ibride

L'elevata efficacia biocida di questi sistemi unita all'assenza di qualsiasi effetto citotossico osservato sulle cellule eucariotiche stabilisce il loro enorme potenziale come agenti antimicrobici topici per la cura delle ferite. A tale scopo le nanostrutture di TiO₂DHICA sono state combinate con fibre di PCL/PHB attraverso la tecnologia dell'elettrofilatura seguendo due diverse strategie. Nel primo caso, le nanoparticelle ibride sono state disperse nella soluzione PCL/PHB prima dell'elettrofilatura per ottenere garze elettrofilate di PCL/PHB caricate con TiO₂DHICA. Nel secondo caso, le nanostrutture di TiO₂DHICA sono state depositate su fibre di PCL/PHB, mediante elettrospruzzo, generando garze di PCL/PHB rivestite di TiO₂DHICA. I tappetini nanofibrosi ottenuti sono stati studiati e confrontati in morfologia, caratteristiche chimico-fisiche e attività antibatterica come segue. La morfologia

della superficie delle garze di PCL/PHB è stata studiata mediante SEM e mostrate in Figura 22. Le garze di PCL/PHB nude erano prive di perline e contenevano fibre di 1,9 micron di diametro con una deviazione *standard* di 0,5 micron come riportato in Figura 22a, b, invece, le garze di PCL/PHB caricate con TiO₂DHICA hanno un diametro medio di 1,7 micron con una deviazione *standard* di 0,5 micron (Figura 22c, d). Il diametro è lo stesso all'interno della deviazione *standard* confrontando le due tipologie di garze e questo potrebbe essere attribuito a due effetti antagonistici, ovvero un aumento sia della conducibilità che della viscosità dovuto alla presenza delle nanoparticelle di TiO₂DHICA. Solitamente, maggiore è la conducibilità, minore è il diametro delle fibre [138], ma nel caso le nanoparticelle possono anche aumentare la viscosità della soluzione provocando un aumento del diametro delle fibre. Inoltre, le garze cariche di TiO₂DHICA apparivano ruvide (Figura 22d), suggerendo la presenza di nanostrutture di TiO₂DHICA all'interno delle stesse.

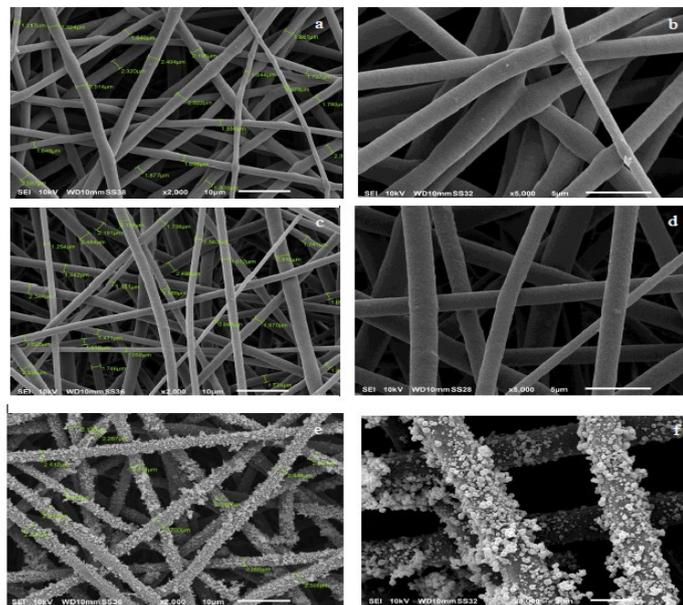


Figura 22: Immagini SEM di: garze PCL/PHB nude (a, b); garze PCL/PHB caricate con TiO₂DHICA (c, d); garze rivestite di TiO₂DHICA (e, f).

Inoltre, è stato possibile osservare strutture luminose sulla loro superficie, dimostrando la deposizione di nanostrutture di TiO_2DHICA (Figura 22e-f). Da immagini ad alto ingrandimento (Figura 22f) queste sono state depositate come aggregati submicrometrici sferici con un diametro che va da 100 a 400 nm. Come mostrato dalle immagini SEM nella Figura 22, le garze presentavano una struttura simile a una rete con porosità interconnessa, necessaria per consentire il trasferimento, la crescita e la differenziazione delle cellule. Inoltre, questa microstruttura dovrebbe mantenere la ferita bagnata, promuovendone infine il processo di guarigione [139]. Infine, la struttura simile a un nastro suggeriva un elevato rapporto superficie/volume, che avrebbe dovuto consentire un elevato assorbimento degli essudati della ferita. Pertanto, le garze PCL/PHB hanno mostrato un alto potenziale come medicazioni per la guarigione delle ferite [139]. L'evidenza dell'incorporazione di nanostrutture di TiO_2DHICA all'interno e sulle garze di PCL/PHB è stata confermata dalla spettroscopia EPR sulla base di una delle proprietà più caratteristiche della melanina, ovvero il suo comportamento paramagnetico persistente. Come mostrato in Figura 23, gli spettri EPR hanno mostrato la presenza di un segnale singolo e ampio con un fattore g di $\sim 2.0035 \pm 0.0003$, che è tipico dei radicali concentrati sul carbonio caratteristici dei pigmenti simili alla melanina. In particolare, entrambe le tipologie di garze hanno presentato questo segnale, riproducendo perfettamente lo stesso picco ottenuto per nanostrutture nude di TiO_2DHICA , come mostrato in Figura 23a [101]. Questa conclusione è stata confermata anche dalla determinazione quantitativa dell'ampiezza del segnale (ΔB), che è correlata alla distanza media tra i centri dei radicali all'interno del materiale. Analogamente a quello osservato per le nanostrutture nude di TiO_2DHICA , gli spettri EPR dei campioni elettrofilati presentavano un $\Delta B = 5,0 \pm 0,2$ G. In particolare, le somiglianze nei parametri EPR delle garze nude e delle garze caricate e rivestite di TiO_2DHICA hanno assicurato che la melanina non subisse alcun cambiamento strutturale durante la preparazione delle stesse.

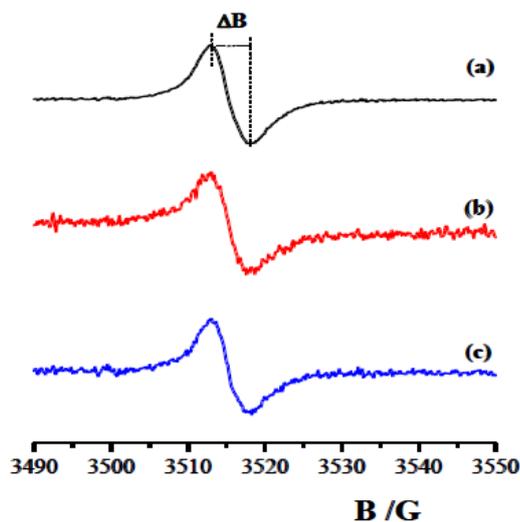


Figura 23: Spettri EPR di (a) nanostrutture di TiO_2DHICA , (b) garze cariche di TiO_2DHICA , (c) garze rivestite di TiO_2DHICA

1.3.14 Valutazione della capacità di assorbimento d'acqua

Altro parametro importante da valutare per un costrutto di medicazione è la capacità di assorbire grandi quantità di liquidi [140, 141]. Le proprietà di assorbimento dell'acqua delle medicazioni svolgono un ruolo chiave nel trattamento delle ferite poiché consentono di mantenere l'equilibrio dell'umidità e di rimuovere gli essudati in eccesso. Per valutare questa caratteristica, sono stati effettuati *test* di assorbimento d'acqua su campioni preparati sia in acqua distillata che in SBF (*Simulated body fluid*), per simulare condizioni fisiologiche. La Figura 24 mostra l'assorbimento di acqua da garze di PCL/PHB nude e da garze di PCL/PHB con nanostrutture di TiO_2DHICA imbevute di SBF. La cinetica di assorbimento dell'acqua era molto rapida per tutti i campioni dopo 18 ore di ammollo. In particolare, le garze PCL/PHB nude e rivestite di TiO_2DHICA hanno mostrato assorbimenti d'acqua di circa il 300% in peso, mentre le garze caricate con TiO_2DHICA hanno mostrato un risultato inferiore (200% in peso). Risultati molto simili, ma con una cinetica più rapida, sono stati ottenuti immergendo i campioni in acqua distillata, poiché il peso costante si raggiungeva

solo dopo 5 ore di ammollo. L'assorbimento d'acqua dipende principalmente dall'elevata superficie delle garze disponibile per l'assorbimento di acqua, questo spiega il grande assorbimento d'acqua anche nelle garze nude e in quelle caricate con TiO_2DHICA , che hanno evidenziato un comportamento idrofobo [142, 143]. Tuttavia, queste ultime mostrano il valore più basso. D'altro canto l'enorme capacità di assorbimento d'acqua evidenziata dalle garze rivestite di TiO_2DHICA anche in soluzioni che simulano fluidi biologici, mostra che queste garze possono assorbire gli essudati della ferita e mantenere un ambiente umido, supportando ulteriormente il loro alto potenziale come costrutti di medicazione [144, 145].

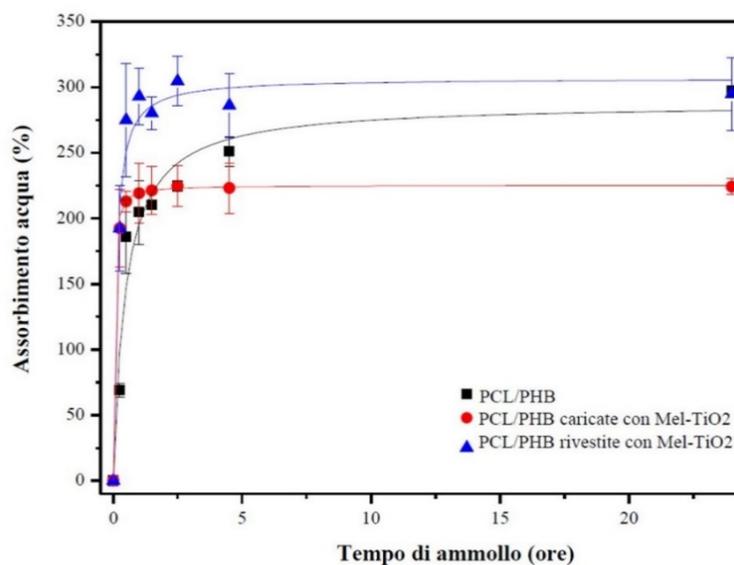


Figura 24: Cinetica di assorbimento dell'acqua di garze di PCL/PHB nude e garze di PCL/PHB modificate con nanoparticelle di TiO_2DHICA .

1.3.15 Test biologici su superfici rivestite di TiO_2DHICA

Necessaria è stata la prova biologica, e al fine di impostare la procedura sperimentale è stata valutata l'adesione batterica sulla superficie di vetrini rivestiti di TiO_2DHICA , ponendo questi ultimi a contatto con sospensioni di cellule batteriche. Nei risultati precedenti abbiamo dimostrato che il contatto tra batteri e nanostrutture di TiO_2DHICA può indurre la morte dei

microrganismi essenzialmente mediata dal danno della membrana citoplasmatica [146]. Questi saggi biologici sono stati eseguiti utilizzando diversi volumi di *buffer* al fine di verificare il volume appropriato da impiegare durante i *test* di adesione su garze. Il numero di batteri che aderiscono al vetrino rivestito con TiO₂DHICA è diminuito con l'aumentare del volume del tampone (Figura 25). Inoltre, il numero dei batteri entrati a contatto con un vetrino nudo non è cambiato nel tempo, suggerendo una scarsa adesione batterica su questa tipologia di materiale. Tuttavia, quando il vetrino è stato rivestito con nanostrutture di TiO₂DHICA, la maggior parte dei batteri ha aderito al vetrino e il numero di questi in soluzione si è ridotto drasticamente. Questo comportamento è stato meglio apprezzato utilizzando un volume totale di 250 µL, poiché dopo 4 ore di incubazione, circa il 60% delle cellule batteriche si trova attaccato al vetrino rivestito di TiO₂DHICA (Figura 25A), mentre l'adesione era inferiore a volumi di 500 µL (Figura 25B) e 1 mL rispettivamente (Figura 25C). Pertanto, un volume totale di 250 µL è stato impiegato per eseguire test di adesione su tutte le superfici indagate.

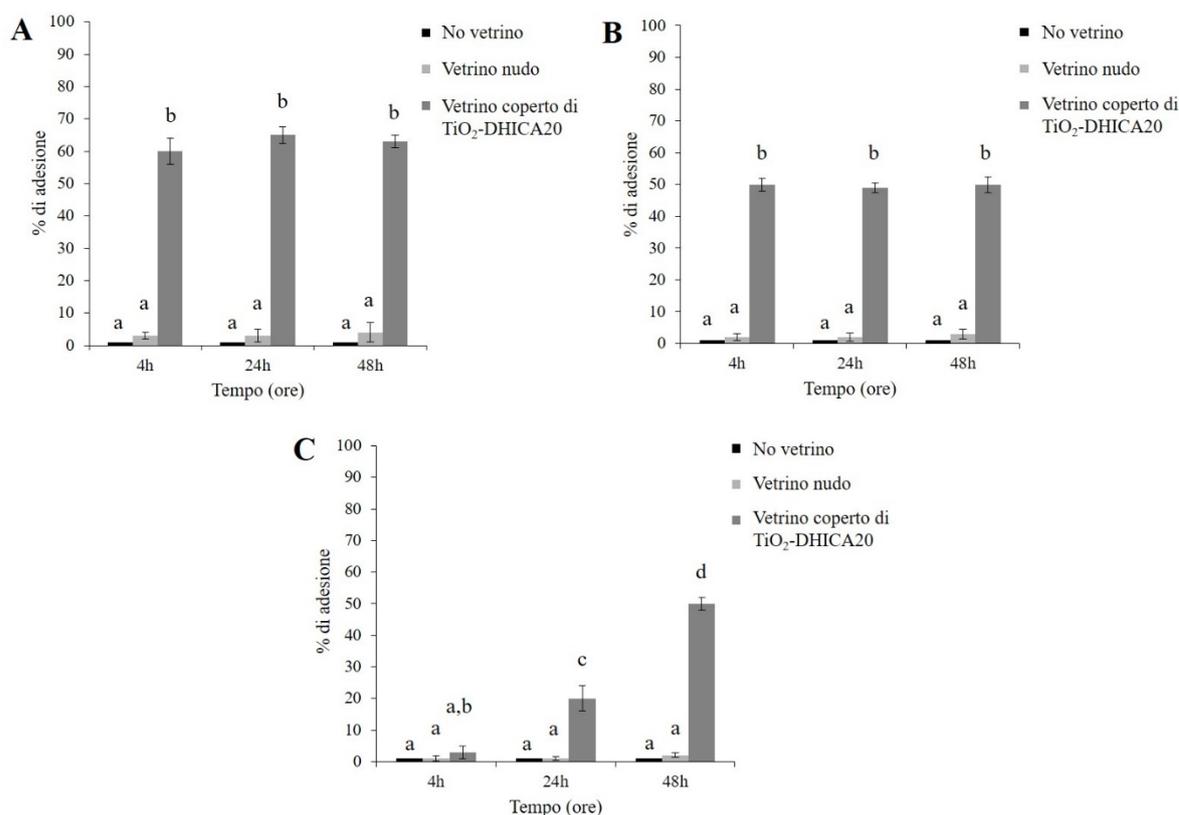


Figura 25: Adesione delle cellule di *E. coli* su vetrini rivestiti di TiO₂DHICA in tempi diversi (4, 24, 48 ore) in 250 µl (pannello A), 500 µl (pannello B) e 1000 µl (pannello C) di PBS. La % di adesione batterica è rappresentata sull'asse y. Ogni barra è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti; i dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) seguita dal *test post-hoc* di *Tukey*. Le barre con la stessa lettera non indicano differenze statisticamente significative. Le barre con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$).

Per confermare l'attività antimicrobica delle superfici ricoperte di TiO₂DHICA e valutare l'interazione tra vetrini rivestiti di nanostrutture e i ceppi batterici, è stato utilizzato il microscopio a fluorescenza. Come mostrato in Figura 26A, le cellule batteriche si ritrovano adese ai vetrini ricoperti di TiO₂DHICA e (Figura 26B) molti di essi appaiono di colore rosso indice dell'ingresso dello ioduro di propidio nelle cellule batteriche danneggiate a causa dell'interazione tra TiO₂DHICA e la membrana batterica. Questi risultati hanno dimostrato, quindi, che l'adesione delle cellule batteriche alla superficie rivestita di TiO₂DHICA induce mortalità batterica [146].

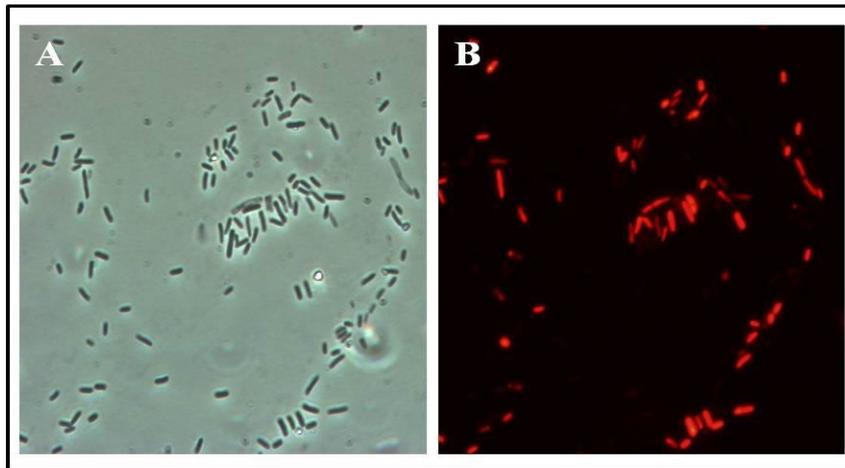


Figura 26: Immagini acquisite in microscopia ottica (pannello A) e a fluorescenza (pannello B) di supporti in vetro ricoperti di TiO₂DHICA incubati con *E. coli DH5α*, in 250 μL di PBS, per 24 ore.

1.3.16 Test biologici su fibre elettrofilate

Confermato l'effetto antimicrobico in seguito all'adesione sul vetrino si è passati alle garze di PCL/PHB. Garze di PCL/PHB nude (controllo negativo), cariche di TiO₂DHICA e rivestite di TiO₂DHICA sono state tagliate in modo da farle aderire perfettamente sul fondo di una piastra a 12 pozzetti. Successivamente, tampone fosfato (250 μL) e cellule batteriche (stessa quantità per ogni campione) sono stati aggiunti nei pozzetti ricoprendo le garze. In seguito a 4, 24 e 48 ore aliquote di batteri sono state raccolte e piastrate. Come mostrato in Figura 27, la garza nuda non influenza le cellule microbiche, poiché il loro numero, paragonabile al controllo (nessuna garza all'interno del pozzetto) rimane costante nel tempo. Le garze rivestite di TiO₂DHICA, invece, mostrano un'elevata capacità di sequestrare le cellule batteriche dalla soluzione poiché il numero di batteri piastrati diminuisce considerevolmente (70% dopo 24 ore). Al contrario, l'interazione batterica con le garze cariche di TiO₂DHICA era significativamente meno efficiente: 45% di adesione cellulare dopo 48 ore. Questi risultati sono coerenti con i *test* eseguiti sul vetrino, evidenziando un'adesione rilevante di batteri su campioni rivestiti. Questa caratteristica potrebbe aiutare a

controllare il livello di patogeni in una lesione cutanea, favorendone così la rigenerazione. In realtà, due fenomeni hanno contribuito all'azione antimicrobica delle nanostrutture ibride TiO₂DHICA: la destabilizzazione della parete cellulare e lo *stress* ossidativo dovuto ai ROS prodotti durante la degradazione della melanina [146]. In particolare, l'interazione batterica e l'adesione agli aggregati submicrometrici delle nanostrutture di TiO₂DHICA è stato un passaggio fondamentale per consentire la destabilizzazione della membrana. Tuttavia, tale passaggio è ridotto nelle garze di PCL/PHB cariche di TiO₂DHICA, probabilmente a causa della bassa esposizione delle nanostrutture che erano incluse all'interno delle fibre.

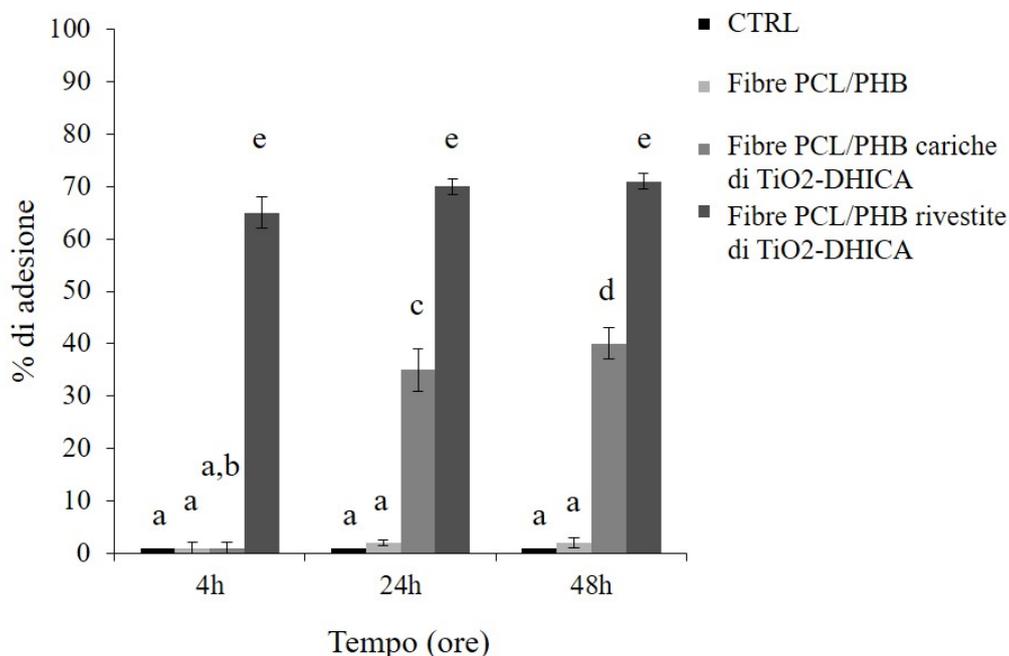


Figura 27: Adesione delle cellule di *Escherichia coli* sulle garze in tempi diversi (4, 24, 48 ore) in 250 μ L di PBS. La % di adesione batterica è rappresentata sull'asse y. Ogni barra è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti; i dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) seguita dal *test post-hoc* di Tukey. Le barre con la stessa lettera non indicano differenze statisticamente significative. Le barre con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$).

1.3.17 Test di citotossicità

Per concludere e favorire una possibile applicazione delle garze in campo biomedico è stato condotto un saggio di citotossicità. I rivestimenti in TiO_2DHICA hanno proprietà antibatteriche [147, 146, 139], tuttavia, per capire se essi agiscono anche sulle cellule eucariotiche, è stato condotto un saggio MTT, come riportato nella sezione dei metodi. Le cellule eucariotiche HaCat sono state coltivate mettendole a contatto con garze di PCL/PHB nude e rivestite di TiO_2DHICA . Come mostrato in Figura 28, non è stato osservato alcun effetto citotossico causato dalle garze nel tempo (4, 24, 48 e 72 ore).

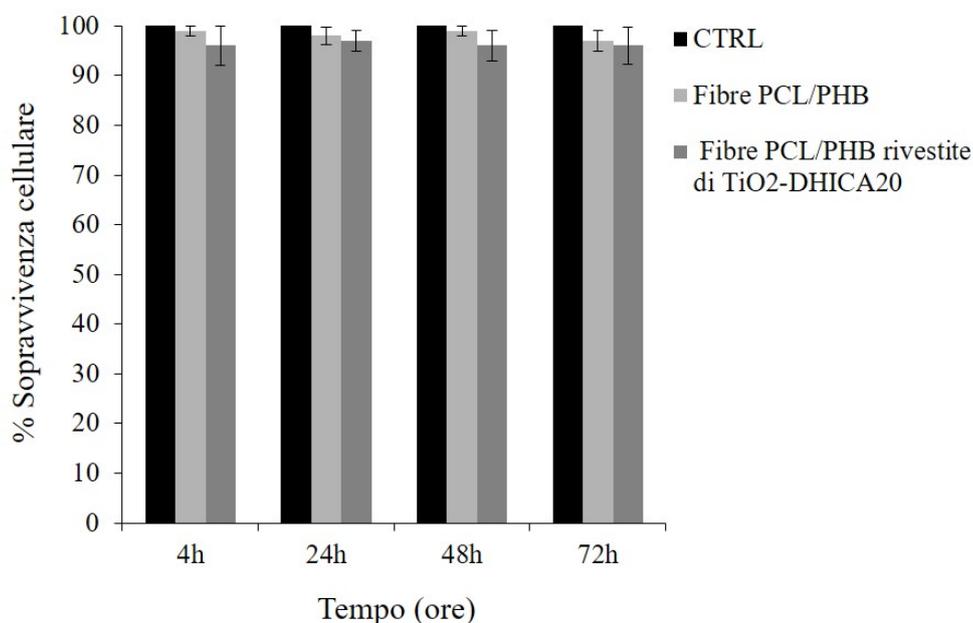


Figura 28: Effetti delle garze nude e rivestite di TiO_2DHICA in tempi diversi (4, 24, 48, 72 ore) sulla vitalità delle cellule HaCat mediante saggio MTT. I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti; le deviazioni *standard* risultano sempre inferiori al 10%.

1.3.18 Caratteristiche chimico-fisiche delle nanostrutture TiO₂DOPA

Proseguendo nel nostro studio abbiamo voluto investigare sulla capacità degli ioni di titanio di interagire con un altro precursore della melanina, la DOPA. La morfologia delle nanostrutture a base di TiO₂DOPA è stata definita da immagini TEM, come mostrato in Figura 29. Il TiO₂ nudo (Figura 29a) mostra strutture simili a bastoncini (dimensioni 3×12 nm), mentre le nanostrutture di TiO₂DOPA (Figura 29b–c) presentano una forma arrotondata di ~10 nm. Non sono state rilevate differenze per i due sistemi TiO₂DOPA_{ti} e TiO₂DOPA_{polym}, per quanto riguarda forma e dimensione, suggerendo che la morfologia dei nanomateriali viene a definirsi durante la sintesi idrotermale e non è influenzata dalla fase *post*-ossidativa. Entrambe le nanostrutture TiO₂DOPA_{ti} e TiO₂DOPA_{polym} hanno mostrato un'area superficiale (150 m²/g), stimata dall'analisi BET, leggermente inferiore a quella osservata per TiO₂ nudo (175-190 m²/g) [103, 148, 101], confermando che il trattamento ossidativo mediante esposizione ad un'atmosfera ossidante (Atmosfera di ossigeno e vapori di ammoniaca) non ha provocato cambiamenti nel carattere poroso delle nanostrutture. La natura della porzione organica è stata studiata anche mediante misurazioni EPR. Gli spettri EPR sperimentali di DOPA-eumelanina e TiO₂DOPA sono riportati in Figura 30, mentre i parametri spettrali calcolati dalla loro analisi sono riassunti nella Tabella 3. Lo spettro DOPA-eumelanina mostra un segnale EPR singolo e approssimativamente simmetrico con una larghezza di riga $\Delta B = 4,8 \pm 0,2$ G con un valore g di 2.0041 ± 0.0003 , che indica una localizzazione preferenziale di elettroni spaiati su atomi di ossigeno come riportato in letteratura per la DOPA-eumelanina sintetica [149, 150]. D'altra parte, lo spettro EPR del campione di TiO₂DOPA ha mostrato un singolo picco più ampio con un fattore g di $2,0035 \pm 0,0003$ (Figura 30A), tipico dei radicali liberi centrati sul carbonio, come

osservato per DHICA e melanine derivate dal DHI [103, 148, 120, 101, 151] e polimeri fenolici [151]. Lo stesso comportamento è stato osservato per tutti i campioni ottenuti prima ($\text{TiO}_2\text{DOPA_ti}$) e dopo il trattamento ossidativo aggiuntivo ($\text{TiO}_2\text{DOPA_polym}$). L'ampiezza degli spettri EPR dei nanoibridi TiO_2DOPA è stata confermata dal maggiore ΔB , pari a $6,9 \pm 0,2$ G rispetto a quello DOPA-eumelanina, come riportato in Tabella 3.

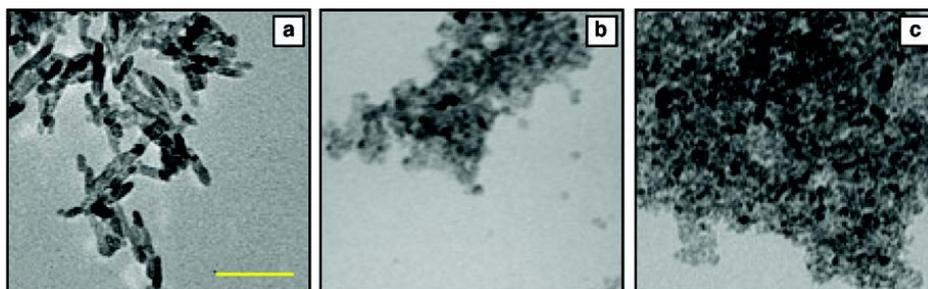


Figura 29: Micrografie TEM di nanoibridi TiO_2 (a), $\text{TiO}_2\text{DOPA_ti}$ (b) e $\text{TiO}_2\text{DOPA_polym}$ (c) (barra della scala 50 nm).

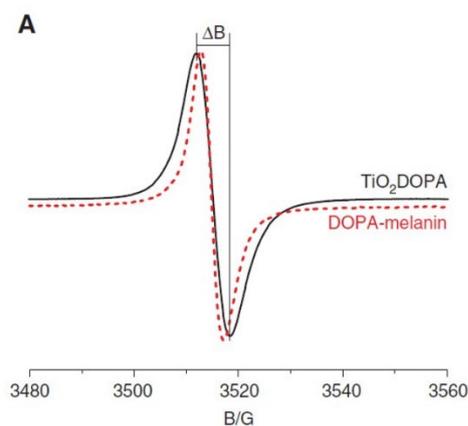


Figura 30: Spettri EPR di DOPA-eumelanina (linea continua) e $\text{TiO}_2\text{DOPA_polym}$ (linea tratteggiata).

	$\Delta B/G (\pm 0.2)$	Lorentzian %	$\text{Spin} \times g^{-1} \times 10^{19} (\leq 10 \%)$
DOPA-melanin	4.8	83 %	2
TiO_2DOPA	6.9	80 %	0.0018

Tabella 3: parametri spettrali EPR per le nanostrutture DOPA-eumelanina e TiO_2DOPA .

Il diverso trend di ΔB , suggerisce una forte eterogeneità nella distribuzione spaziale dei centri paramagnetici dovuta alla presenza di TiO_2 , che influenza il processo di polimerizzazione della DOPA e ostacola la formazione del pigmento. Per fare luce sul meccanismo molecolare relativo all'evoluzione della DOPA in presenza di TiO_2 -sol e guidare la formazione di nanostrutture a base di TiO_2 DOPA, è stata eseguita anche un'analisi spettroscopica con tecniche UV-Vis ed EPR sulle miscele di reagenti utilizzate durante il primo stadio della sintesi dei nanoibridi. I risultati sperimentali corrispondenti sono mostrati in Figura 31. Lo spettro UV-Vis di TiO_2 -sol a $\text{pH} = 1.5$ (Figura 31A, spettro a) ha mostrato un bordo di adsorbimento a circa $\lambda < 400$ nm, nella regione UV, come previsto per un semiconduttore a banda larga [152]. Infatti, non appena la DOPA è stata aggiunta ad acido acetico/ TiO_2 -sol, il sistema si è trasformato in arancione/rosso, dimostrando così l'immediata ossidazione della L-DOPA a dopachinone ($\lambda > 420$ nm) [153, 154]. Inoltre, nessuna nuova banda di assorbimento con un picco a 475 nm apparivano nello spettro a $\text{pH} = 7$ (Figura 31A, spettro c), originati dalla caratteristica transizione elettronica degli stati ossidati colorati di L-DOPA, dopo ciclizzazione intramolecolare. Questi spettri mostrano chiaramente un assorbimento ampio e crescente in tutta la regione visibile come caratteristica del comportamento ottico della melanina.

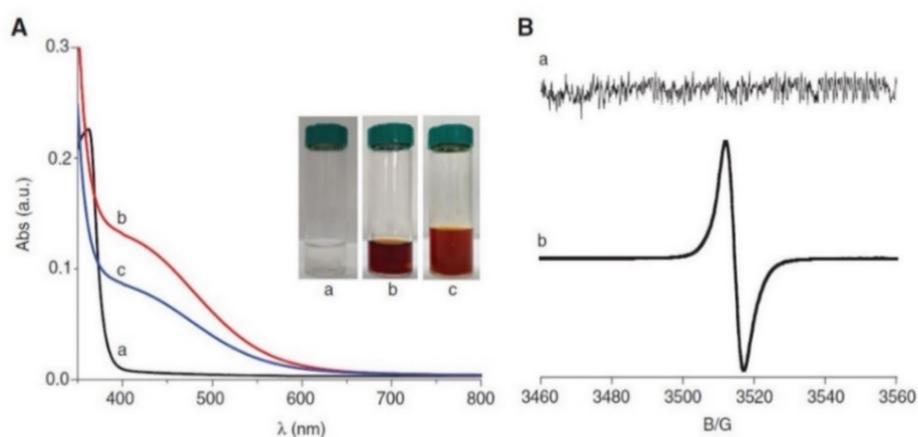


Figura 31: Nel pannello A, spettri UV della miscela di reazione acido acetico/TiO₂-sol a pH = 1,5 prima (a) e dopo (b) l'aggiunta di DOPA e della miscela di reazione acido acetico/TiO₂-sol/DOPA a pH = 7,0 (c). Nel pannello B, gli spettri EPR della miscela di reazione acido acetico/TiO₂-sol/DOPA a pH = 7,0 (a) e DOPA-eumelanina (b).

Questa evidenza ha suggerito che né la ciclizzazione della DOPA né la sua polimerizzazione si verificano ed è stata confermata anche dai risultati EPR (Figura 31B). Infatti, quando il monomero DOPA è stato aggiunto all'acido acetico/TiO₂-sol, non sono comparsi picchi nello spettro, a differenza del segnale approssimativamente simmetrico osservato per DOPA-eumelanina [150]. Queste evidenze sperimentali indicano chiaramente un comportamento diverso del precursore DOPA nell'interazione con TiO₂-sol rispetto a quello osservato nel caso di DHICA [102]. In particolare, la DOPA contiene gruppi catecolici, amminici e carbossilici, che sono in grado di chelare gli ioni Ti (IV). In realtà, studi precedenti hanno dimostrato che il legame di tipo amminoacidico con ioni metallici si verifica certamente in condizioni acide, insieme al complesso catecolato-Ti (IV) [155, 156]. La formazione di entrambi i complessi protegge i gruppi funzionali da ulteriori reazioni, impedendo così sia la intra-ciclizzazione della DOPA che la sua successiva polimerizzazione. Ciò è stato apprezzato solo dopo il trattamento idrotermale che tuttavia porta a oligomeri polifenolici piuttosto che a specie poliindoliche, mostrando una significativa attività antiossidante e una minore efficacia antimicrobica.

1.3.19 Studio dell'attività antimicrobica di nanostrutture TiO₂DOPA

Come per le nanostrutture di TiO₂DHICA anche dei nanosistemi TiO₂DOPA è stata studiata l'attività antimicrobica. Campioni di TiO₂DOPA e TiO₂ (utilizzato come controllo) sono stati utilizzati per le curve dose-risposta riportate in Figura 32, incubando cellule di *E. coli* con diverse concentrazioni di nanostrutture (da 0 a 400 µg/mL) per testarne l'attività.

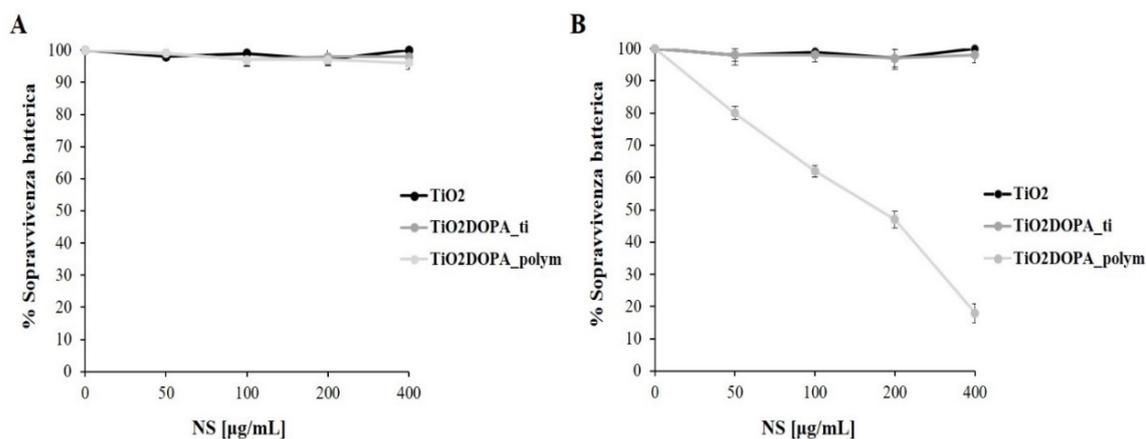


Figura 32: Attività antimicrobica di TiO₂ (cerchi neri), TiO₂DOPA_ti (cerchi grigi) e TiO₂DOPA_polym (cerchi grigi chiari) a diverse concentrazioni (0-400 µg/mL) contro il ceppo di *E. coli DH5a* dopo incubazione di 10 minuti (pannello A) e 4 ore (pannello B). I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti.

A differenza delle nanostrutture TiO₂DHICA che hanno mostrato una forte attività antimicrobica [156, 157, 158], anche dopo 10 min di esposizione ai batteri, TiO₂DOPA_ti non mostra alcuna attività antimicrobica mentre TiO₂DOPA_polym hanno mostrato una leggera attività solo dopo un'esposizione prolungata (Figura 32 pannello B). Questa attività è diminuita lentamente nel corso di diversi giorni di conservazione ed è stata completamente persa dopo 3 settimane (Figura 33).

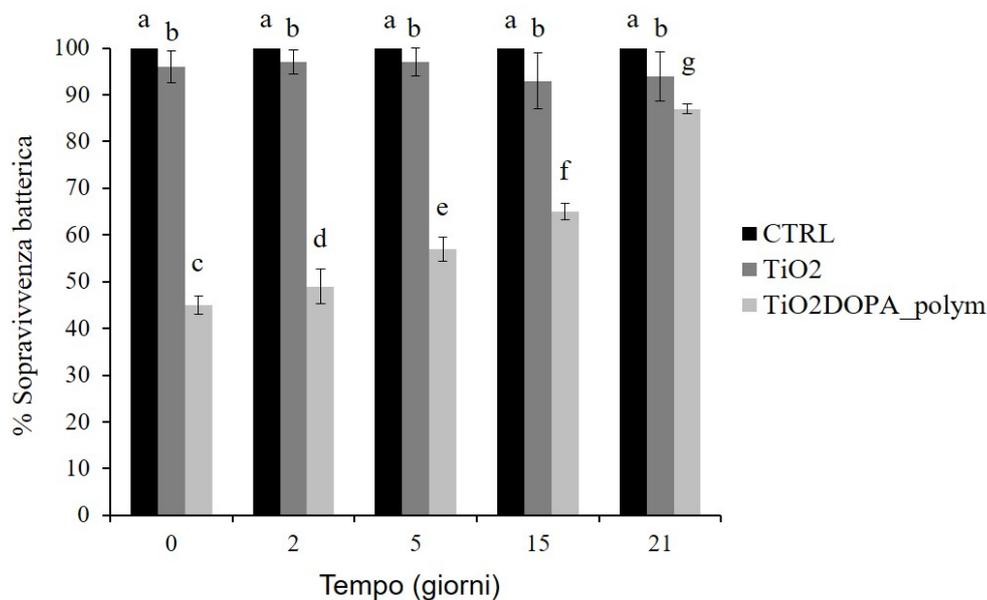


Figura 33: Attività antimicrobica di TiO₂ e TiO₂DOPA_polym conservate per tempi diversi (0-21 giorni) contro *Escherichia coli DH5α*. La % di sopravvivenza batterica è rappresentata sull'asse y. Ogni barra è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti; i dati sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) seguita dal *test post-hoc* di Tukey. Le barre con la stessa lettera non indicano differenze statisticamente significative. Le barre con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$).

Questi risultati hanno aperto la strada all'ipotesi che, a differenza delle nanostrutture a base di DHICA-eumelanina, TiO₂DOPA non potesse essere in grado di colpire le membrane microbiche e mostrare attività litica. In generale, alcuni agenti antimicrobici uccidono le cellule batteriche formando pori nelle membrane, determinando così la fuoriuscita di piccole molecole, come l'ATP, che viene sintetizzato sul lato interno della membrana. Per confermare che le nanostrutture a base di DOPA non erano in grado di danneggiare la membrana batterica e quindi indurre il rilascio di ATP, abbiamo eseguito un doppio test per rilevare la formazione dei pori e la fuoriuscita di ATP sul ceppo batterico di *E. coli*. A questo scopo, il ceppo batterico di *E. coli* è stato trattato con TiO₂, TiO₂DOPA_ti e TiO₂DOPA_polym a una concentrazione fissa di 200µg/mL. Per prima cosa abbiamo valutato la perdita di ATP, riportata in Figura 34, utilizzando il *kit* di determinazione

dell'ATP di *Molecular Probes* e la polimixina B, un potente antibiotico perforante la membrana, come controllo positivo.

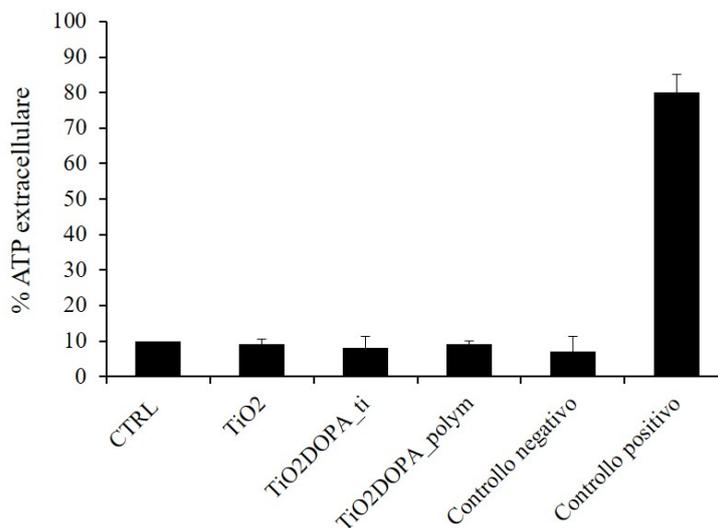


Figura 34: Percentuale di ATP in coltura di *Escherichia coli DH5a* trattata con le nanoparticelle (200 μ g/mL), ampicillina come controllo negativo e polimixina B come controllo positivo. I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti; le deviazioni *standard* risultano sempre inferiori al 5%.

Successivamente, per osservare gli effetti delle NP sull'integrità delle membrane batteriche, sono state utilizzate cellule di *E. coli* e colorate con DAPI, colorante fluorescente per il DNA e ioduro di propidio, un indicatore di rottura della membrana cellulare. I risultati sperimentali non hanno evidenziato la presenza di ATP al di fuori delle cellule microbiche trattate con diversi tipi di nanostrutture (Figura 34) e hanno dimostrato che tutte le membrane batteriche sono intatte (Figura 35), anche per il campione trattato con la quantità di nanostrutture che ha causato la mortalità di oltre il 60% delle cellule batteriche. Queste evidenze hanno confermato che i nanosistemi TiO₂DOPA non svolgono un'azione diretta contro le membrane batteriche.

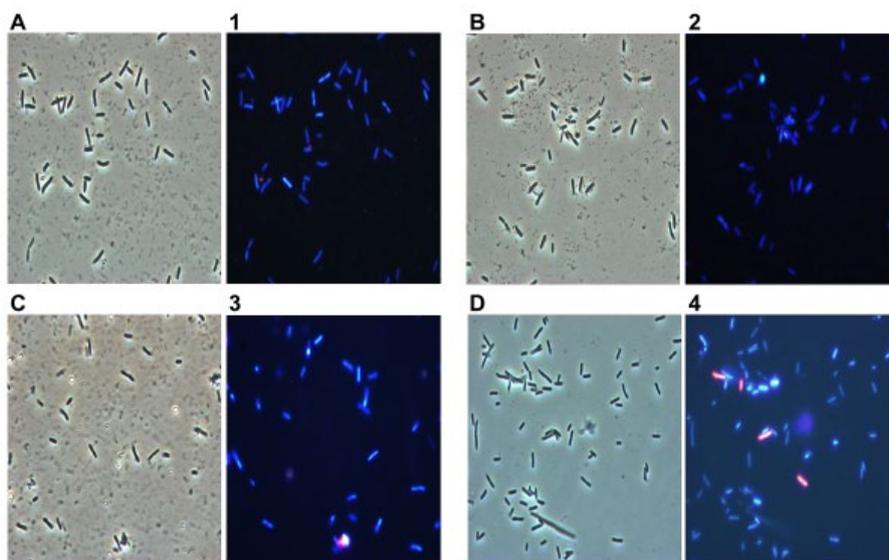


Figura 35: I pannelli mostrano cellule batteriche di *Escherichia coli* osservate in microscopia ottica (lettere) e in microscopia a fluorescenza (numeri) dopo 20 minuti di incubazione con le nanostrutture. Cellule batteriche non trattate (A, 1); cellule trattate con: TiO_2 (B, 2), $\text{TiO}_2\text{DOPA}_{\text{ti}}$ (C, 3) $\text{TiO}_2\text{DOPA}_{\text{polym}}$ (D, 4).

1.3.20 Saggio di eliminazione dei radicali DPPH

Le proprietà antiossidanti delle nanostrutture TiO_2DOPA sono state studiate saggiando lo *scavenging* del DPPH, cioè un radicale libero stabile attualmente utilizzato per valutare la capacità di composti antiossidanti di agire come donatori di idrogeno. La capacità di TiO_2DOPA di eseguire la riduzione di un elettrone del DPPH è stata misurata rispetto alle nanostrutture TiO_2 e alla DOPA nuda. I risultati sono riportati in Tabella 4 e sono espressi come IC50, ovvero la concentrazione del campione in grado di provocare una diminuzione del 50% dell'assorbanza iniziale a 515 nm della soluzione del radicale DPPH. Come mostrato, il valore IC50 di $\text{TiO}_2\text{DOPA}_{\text{ti}}$ era circa il 23% di quello di $\text{TiO}_2\text{DOPA}_{\text{polym}}$, rivelando così una maggiore capacità antiossidante delle nanostrutture non sottoposte al trattamento ossidativo. Il potenziale contributo della componente TiO_2 al potere antiossidante delle strutture ibride è stato trascurabile, come confermato da un valore di IC50 che è circa 220 volte e 50 volte superiore ai valori di $\text{TiO}_2\text{DOPA}_{\text{ti}}$ e $\text{TiO}_2\text{DOPA}_{\text{polym}}$,

rispettivamente. L'attività della DOPA nuda è stata considerata un controllo positivo, infatti il suo valore IC₅₀ era cinque volte inferiore al valore misurato per le nanostrutture ibride a base di TiO₂DOPA.

Campioni	TiO ₂ DOPA_ti	TiO ₂ DOPA_polym	TiO ₂	DOPA
DPPH IC ₅₀	2.34 ± 0.07 µg/mL	9.95 ± 0.15 µg/mL	506 ± 15 µg/mL	0.468 ± 0.003 µg/mL

Tabella 4: Attività di *scavenging* radicale di nanostrutture a base di TiO₂DOPA rispetto alle nanostrutture di TiO₂ e DOPA nuda. I valori per i sistemi ibridi sono normalizzati rispetto al contenuto di fase organica (5% p/p).

1.3.21 Test di citotossicità

Ipotizzando una possibile applicazione topica, è stata valutata la tossicità delle nanostrutture su una linea cellulare di cheratinociti umani mediante saggio MTT secondo la procedura descritta nella sezione dei metodi. Le cellule sono state trattate con TiO₂, TiO₂DOPA_ti e TiO₂DOPA_polym a varie concentrazioni (da 0 a 400 µg/mL) per 24 ore e non è stata apprezzata alcuna tossicità (Figura 36).

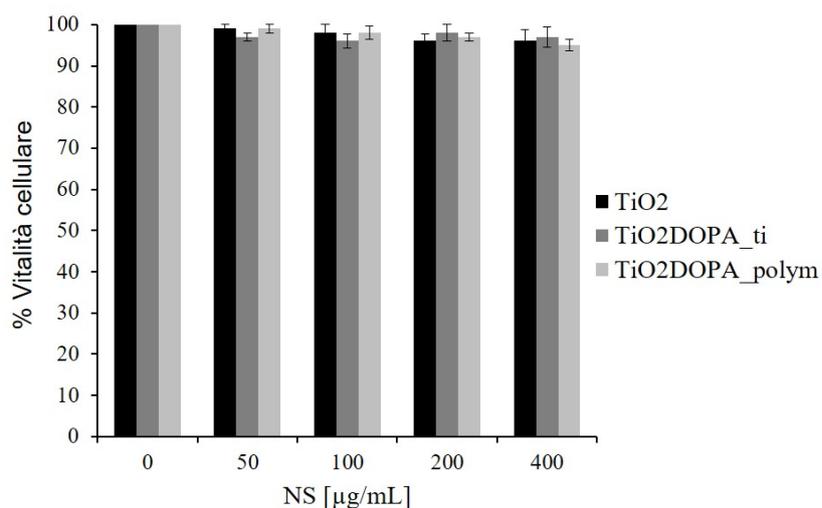


Figura 36: Effetti citotossici di TiO₂, TiO₂DOPA_ti e TiO₂DOPA_polym (0-400µg/mL) su cellule HaCat eseguendo il saggio MTT. I valori sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti; le deviazioni *standard* risultano sempre inferiori al 5%.

1.4 Discussione

Le nanostrutture ibride eco-compatibili e bio-ispirate di TiO_2 -eumelanina sono state recentemente progettate e preparate dal gruppo di Ingegneria dei Biomateriali della Federico II attraverso una metodologia *in situ* basata sulla via idrotermale. Durante il processo di sintesi, le nanoparticelle di TiO_2 promuovono la polimerizzazione ossidativa di DHICA in eumelanina tramite trasferimento di elettroni dalla DHICA al TiO_2 . L'intera indagine chimico-fisica suggerisce che, nelle nanostrutture TiO_2 DHICA_{ti}, la quantità di eumelanina ha il peso maggiore nel determinare le proprietà antimicrobiche del sistema finale. Tutti i TiO_2 DHICA_{polym} mostrano un'attività antimicrobica maggiore rispetto all'eumelanina nuda e, ad eccezione del campione con il contenuto di melanina più basso (5%), le loro prestazioni sono essenzialmente indipendenti sia dalla quantità di melanina che dalle condizioni di irradiazione. Il miglioramento dell'attività antimicrobica negli ibridi TiO_2 DHICA_{polym} potrebbe derivare dall'equilibrio generato dall'aumentata generazione di specie ROS da parte degli ibridi (sia melanina che TiO_2 , grazie all'effetto “antenna” delle eumelanine), e dal parziale spegnimento di questi ROS da parte delle stesse melanine [158], a causa dei gruppi ossidabili residui all'interno del pigmento. La tecnica EPR, infatti, ha permesso di rilevare la presenza di radicali $\bullet\text{OH}$ in sospensioni acquose di DHICA-eumelanina e TiO_2 DHICA_{polym}. Tuttavia, poiché nessuna specie radicalica potrebbe essere apprezzata nelle sospensioni di TiO_2 , la formazione dei ROS è data dalla melanina. Per verificare questa ipotesi, è stato eseguito un *test* di attività antimicrobica a concentrazione fissa di nanoparticelle (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in condizioni di oscurità in cui la produzione di specie $\bullet\text{OH}$ è fortemente ridotta, come mostrato dai dati EPR riportati in Figura 16. Le nanostrutture hanno mostrato un'azione antimicrobica inferiore, come mostrato in Figura 14, rispetto allo stesso esperimento condotto in condizioni di luce. Basandoci su questi dati, la formazione di ROS potrebbe, dunque, spiegare solo in minima parte l'attività antibatterica delle nanostrutture TiO_2 DHICA. Pertanto al fine di delineare

l'esatto meccanismo antimicrobico di TiO₂DHICA, chiarendo tutti i fattori di tossicità contro i batteri *Gram* negativi, i risultati degli esperimenti di marcatura mediante *spin* sono stati confrontati e integrati con osservazioni di microscopia a fluorescenza. Le immagini al microscopio ottico in Figura 19 mostrano l'adesione batterica su aggregati TiO₂DHICA_polym (Figura 19D). Come riportato in letteratura, i precursori melanogenici mostrano un legame elevato e stabile ai lipidi di membrana, mediato dai legami H. Inoltre, studi precedenti rivelano un'ulteriore ossidazione del pigmento eumelanina nelle nanostrutture TiO₂DHICA_polym, con un relativo aumento delle forme carbossiliche quando i nanoibridi TiO₂-eumelanina prodotti dalla sintesi idrotermale sono esposti ai vapori di ammoniaca [103]. La presenza di un numero maggiore di gruppi carbossilici dovrebbe aumentare il numero di legami idrogeno con gruppi di testa lipidica, migliorando così l'affinità e il legame alle membrane batteriche [159]. Questa maggiore interazione con la membrana citoplasmatica si traduce in una destrutturazione della membrana e in una maggiore permeabilità, anche migliorando l'azione dei ROS e producendo in ultima analisi la rottura della membrana. Si prevede che questo meccanismo combinato impedisca ai microbi di sviluppare resistenza agli antibiotici a queste nanostrutture, affrontando così una grave limitazione di altri agenti antimicrobici più convenzionali. L'elevata efficacia biocida di questi sistemi unita all'assenza di qualsiasi effetto citotossico osservato sulle cellule eucariotiche stabilisce il loro enorme potenziale come agenti antimicrobici topici per la cura delle ferite. Ciò ha fornito linee guida strategiche per la progettazione di superfici antimicrobiche a base di melanina. In particolare, ci ha consentito di sviluppare garze di PCL/PHB modificate con nanostrutture di TiO₂DHICA con buona biocompatibilità e comportamento multifunzionale accertato. In realtà, il rivestimento delle suddette garze con nanostrutture di TiO₂DHICA sembrava più promettente dell'incorporazione delle stesse nanostrutture. I sistemi ottenuti hanno mostrato un enorme assorbimento di acqua, necessario

per una buona gestione degli essudati, una rilevante attività antimicrobica e una marcata idrofilia che dovrebbe consentire l'interazione materiale-cellula, promuovendone l'adesione e la proliferazione. Questo studio apre la strada a strategie di progettazione efficaci per lo sviluppo verso biomateriali per la medicazione delle ferite cutanee all'avanguardia. Proseguendo nel nostro studio abbiamo voluto investigare sulla capacità degli ioni di titanio di interagire con un altro precursore della melanina, la DOPA. La tirosina viene prima convertito in DOPA-chinone (DQ) mediante l'azione dell'enzima tirosinasi (Tyr). Dai risultati EPR (Figura 30B) è emerso, infatti, che non si verificano né la ciclizzazione né la polimerizzazione di DOPA. Infatti, quando il monomero DOPA è stato aggiunto all'acido acetico/TiO₂-sol, non sono comparsi picchi nello spettro, a differenza del segnale approssimativamente simmetrico osservato per DOPA-eumelanina [150]. Queste evidenze sperimentali indicano chiaramente un comportamento diverso del precursore della DOPA nell'interazione con TiO₂-sol rispetto a quello osservato nel caso del monomero DHICA [102]. In particolare, DOPA porta il catecolo, gruppi amminici e carbossilici, in grado di chelare gli ioni Ti (IV). In realtà, studi precedenti hanno dimostrato che il legame di tipo amminoacidico con ioni metallici si verifica certamente in condizioni acide, insieme al complesso catecolato-Ti (IV) [155, 156]. La formazione di entrambi i complessi, protegge i gruppi funzionali da ulteriori reazioni, prevenendo così sia la intra-ciclizzazione che la successiva polimerizzazione della DOPA. Ciò è stato apprezzato solo dopo il trattamento idrotermale che tuttavia porta a oligomeri polifenolici piuttosto che a specie poliindoliche, mostrando una significativa attività antiossidante che risulta stabile nel tempo e conservata anche in ambienti ossidativi difficili. Tuttavia, questa diversa chimica rispetto alla DHICA impatta fortemente sull'attività antimicrobica che è attualmente non rilevabile nei nanosistemi ibridi TiO₂DOPA. Questo studio evidenzia il ruolo strategico dei complessi metallici con i precursori della melanina nel dettare i percorsi della via melanogenica,

definendo in ultima analisi le loro funzioni biologiche. Inoltre, svela l'elevato potenziale dell'approccio basato su modelli in ceramica in combinazione con precursori della melanina nel raggiungimento di una messa a punto fine delle nanostrutture di TiO₂-eumelanina e della bioattività chimico-fisica, aprendo ulteriori sviluppi verso biomateriali specificamente ingegnerizzati.

Capitolo 2

2.1 Introduzione

2.1.1 Il polietilene (PE)

Il polietilene è un materiale termoplastico costituito da monomeri di etilene a catene lunghe e lineari ed è considerato uno dei polimeri sintetici più ampiamente prodotti e commercializzati in tutto il mondo [1]. Il PE è stato inventato negli anni '30 e viene utilizzato per fabbricare diversi prodotti, tra cui bottiglie, contenitori e sacchetti di plastica [2, 3]. Esistono diversi tipi di PE con un numero diverso di atomi di carbonio in base alla loro formulazione (C_nH_{2n}). I PE più conosciuti e studiati sono: polietilene ad alta densità (HDPE), HDPE ad altissimo peso molecolare, HDPE ad alto peso molecolare, polietilene lineare a bassa densità, polietilene a bassa densità (LDPE) e polietilene a bassissima densità, come mostrato in Figura 1 [4, 5, 6]. In generale, HDPE e LDPE sono i PE più utilizzati [7]. L'HDPE presenta nella sua struttura pochi rami, che conferiscono forze intermolecolari e resistenza alla trazione, superiore a quella dell'LDPE.

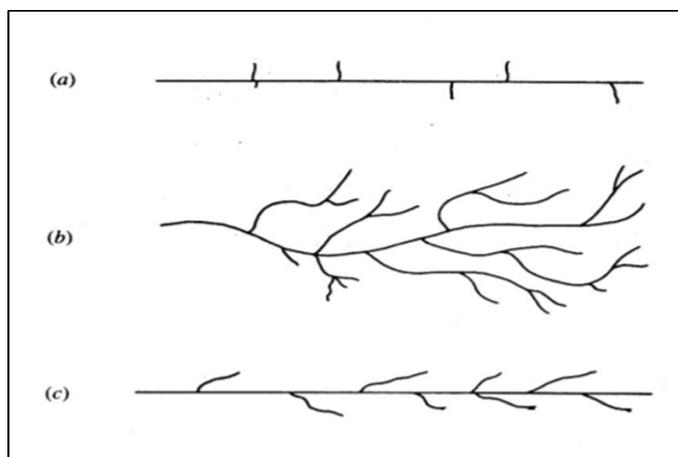


Figura 1: (a) HDPE, (b) LDPE, (c) LLDPE

Inoltre, l'HDPE ha una struttura fisica in grado di resistere a temperature più elevate (120 °C) ed è più duro e opaco [3]. LDPE supporta temperature a 80–95 °C per un breve periodo, essendo considerato non reattivo a temperatura ambiente. Ha una densità di 0,910–0,940

g/cm³ ed è normalmente traslucido, sebbene vi siano variazioni opache; ha una struttura fragile, anche se è flessibile e resistente, con circa il 2% di atomi di carbonio, e molti rami [8]. Konduri e Bogolu [9] hanno riportato cambiamenti nel peso del *film* plastico e parametri meccanici, come la percentuale di allungamento di LDPE e HDPE. Tra tutti i *film* plastici, l'HDPE è altamente suscettibile alla degradazione con una perdita di peso del 33% e una riduzione dell'allungamento del 40% mentre l'LDPE ha mostrato una perdita di peso del 26% e una riduzione dell'allungamento del 34%. Secondo Ojha *et al.* [7], due ceppi di *Penicillium* (*P. oxalicum* NS4 e *P. chrysogenum* NS10) sono stati isolati e identificati per la loro capacità di degradare LDPE e HDPE. Gli autori hanno confrontato l'efficienza di degradazione dei ceppi di *Penicillium* rispetto ai composti LDPE e HDPE nell'arco di 90 giorni e hanno riportato che la percentuale di perdita di peso totale era 24,18%, 43,73%, 55,34% in HDPE e 16,72%, 26,70%, 36,60% in LDPE dopo 30, 60 e 90 giorni di incubazione, rispettivamente. Questi risultati hanno mostrato che la degradazione dell'HDPE era 1,5 volte più efficiente rispetto alla degradazione dell'LDPE.

2.1.2 Degradazione del PE

La degradazione del PE può avvenire per degradazione chimica (umidità e ossigeno), termica (alte temperature) o biologica (microrganismi) [10]. La degradazione è influenzata da diversi fattori come le caratteristiche e la natura del polimero, il tipo di microrganismo utilizzato e il pretrattamento impiegato nel processo [11, 12]. Le caratteristiche fisiche del PE possono essere alterate dall'esposizione alla radiazione ultravioletta (UV) poiché la luce UV rompe i legami del carbonio e dell'idrogeno, rilasciando i radicali liberi e generando PE in molecole più piccole. Inoltre, l'elevata intensità dei raggi UV può accelerare la degradazione della plastica e migliorare la biodegradabilità del PE, e questo processo è necessario per aumentare l'idrofilia del polimero facilitando il legame e la degradazione

batterica [13, 14, 15, 16]. Per quanto riguarda la natura del pretrattamento, [17] hanno riportato che il biorisanamento da *Trichoderma harzianum* e *Chaetomium globosum* era meno efficiente quando si utilizzava PE autoclavato e sterilizzato come unica fonte di carbonio, e la migliore efficienza è stata osservata nel PE trattato con UV. Esistono due modi di biorisanamento (aerobico o anaerobico) poiché i funghi dipendono dalle condizioni aerobiche mentre la degradazione batterica procede in entrambe le condizioni [18, 19]. La biodegradazione aerobica di solito si verifica nel suolo e negli ambienti acquatici, e questo processo si traduce nella produzione di H₂O e CO₂, mentre la biodegradazione anaerobica si verifica nelle discariche e nei sedimenti, e i prodotti finali sono H₂O, CO₂ e metano [20, 21, 22]. La fase iniziale della biodegradazione del PE consiste nell'aderenza dei microrganismi alla sua superficie. L'ossidazione del PE è il primo e il più importante passo verso la biodegradazione. In questo processo, i gruppi carbonilici si formano nella spina dorsale carbonio-idrogeno del PE, che forma un complesso polare [23]. Albertsson AC *et al.*, [24] hanno riportato che il PE diventa biodegradabile attraverso l'uso simultaneo di *Pseudomonas fluoresces*, biosurfattante e sodio dodecil solfato al 10% (p/v) a 60°C per tre mesi e ha avuto un effetto sull'ossidazione del PE (perdita di peso del $7,13 \pm 0,05\%$ e $5,06 \pm 0,05\%$). L'efficienza della biodegradazione del PE può essere aumentata utilizzando *biofilm* o microrganismi più competenti, o anche mediante l'aggiunta di tensioattivi di preossidazione durante il processo di biodegradazione. I pro-ossidanti sono sostanze chimiche in grado di indurre *stress* ossidativo, inibire i sistemi antiossidanti o generare specie reattive dell'ossigeno. Gli studi hanno descritto che i pro-ossidanti vengono aggiunti alla plastica per renderla più vulnerabile alle attività microbiche, quindi questo processo può ridurre l'accumulo a lungo termine di microparticelle nell'ambiente [25, 26]. Di conseguenza, diversi studi hanno dimostrato che i *film* pretrattati con pro-ossidanti hanno una mineralizzazione maggiore rispetto a quelli non trattati. Il PE può diventare suscettibile alla degradazione

microbica mediante l'aggiunta di amido e pro-ossidanti poiché questi sono utilizzati nella produzione di PE biodegradabile, noto anche come bioplastica [10, 27]. L'amido migliora la natura idrofila del PE, quindi i microrganismi possono facilmente degradare quella parte, che può anche essere catalizzata dagli enzimi amilasici. Quando il pro-ossidante viene aggiunto al PE, la degradazione è preceduta dalla fotodegradazione e dalla degradazione chimica [28]. Inoltre, ci sono studi incentrati sulla capacità di biodegradazione dei polimeri da parte di enzimi in grado di convertire i polimeri in oligomeri e monomeri. Le cellule microbiche metabolizzano e assorbono i prodotti scissi enzimaticamente come fonti di carbonio [29, 30]. Il PE biodegradabile è stato sviluppato attraverso l'aggiunta di metalli di transizione (Mn stearato, Cu stearato e Ni stearato), generando un nuovo composto con un peso molecolare inferiore rispetto al PE convenzionale. Successivamente, questo nuovo composto a basso peso molecolare viene esposto all'irradiazione UV. Generalmente, i metalli di transizione sono utilizzati come additivi pro-ossidanti e quindi, attraverso una reazione a catena dei radicali liberi, catalizzano la scissione della catena PE [31, 32, 33, 17, 30]. Alcuni studi hanno dimostrato che la quantità di amido presente in un composto amidaceo può influenzare l'entità e la velocità della sua disintegrazione fisica nell'ambiente. Michael Gould *et al.* [34] hanno analizzato *film* plastici e PE contenenti amido e hanno riferito che quasi l'intera componente dell'amido è stata rimossa dalla pellicola entro 20-30 giorni dai microrganismi e il PE non è stato influenzato dai microrganismi testati dopo 60 giorni di incubazione. Secondo Singh e Sharma [35], la biodegradazione avviene in diverse fasi. Il primo è il bio-deterioramento quando il polimero cambia nelle sue proprietà chimiche e fisiche. Dopo ciò avviene la bio-frammentazione (semplice rottura del polimero per scissione enzimatica) e l'assimilazione (i microrganismi catturano le molecole), e l'ultimo passaggio è la mineralizzazione quando vengono prodotti metaboliti ossidati (CO₂ e H₂O).

La combinazione di processi fisici, chimici e biologici rende la degradazione più rapida ed efficiente.

2.1.3 Degradazione del PE ad opera di microrganismi

Diversi studi hanno riportato l'importanza della biodegradazione della plastica. Dal 1961, quando Fuhs riportò la capacità di alcuni microrganismi di consumare paraffina come fonte di carbonio, è stato studiato il potenziale di biodegradazione del PE e di altri gruppi di plastiche da parte di diversi microrganismi (batteri e funghi) (Tabella 1) [36]. Tra questi, i generi *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Micrococcus*, *Penicillium*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus* sono i principali biodegradatori.

Microrganismi	Nazione	Fonte	Referenze
<i>Acinetobacter</i> sp.	Polonia	Suolo	[51]
<i>Arthrobacter</i> sp.	India	Suolo	[52,3]
<i>Bacillus</i> sp.	Polonia	Suolo	[51]
<i>Chelatococcus</i> sp.	Korea	Mangime	[53]
<i>Ideonella</i> sp.	Giappone	Suolo	[54]
<i>Flavobacterium</i> sp.	Francia	Suolo	[55]
<i>Micrococcus</i> sp.	India, Polonia	Suolo	[51, 56, 57]
<i>Paenibacillus</i> sp.	Brasile, India, polonia	Suolo	[51, 58, 40]
<i>Proteus</i> sp.	India	Suolo	[56]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Francia, India, Polonia	Suolo	[57, 55, 51, 58]
<i>Ralstonia</i> sp.	Francia	Suolo	[55]
<i>Rhodococcus</i> sp.	Israele	Suolo	[47, 59, 60]
<i>Staphylococcus</i> sp.	India, Polonia	Suolo	[51, 56, 58]
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Francia	Suolo	[55]
<i>Streptomyces</i> sp.	Stati Uniti	Suolo	[2]
<i>Streptococcus</i> sp.	India	Suolo	[56]
<i>Aspergillus</i> sp.	India	Suolo e Acqua	[57, 56, 8, 61, 62, 63]
<i>Chaetomium</i> sp.	India	Suolo	[62]
<i>Fusarium</i> sp.	Svezia	Suolo	[64]
<i>Phanerochaete</i> sp.	Stati Uniti	Suolo	[2]
<i>Penicillium</i> sp.	Giappone, India, Messico	Suolo	[65, 66, 56, 67]
<i>Trichoderma</i> sp.	India	Suolo	[67]
<i>Phanerochaete</i> sp.	Messico	Suolo	[66]

Tabella 1: Lista di microrganismi abili a degradare il PE

Microrganismi in grado di degradare la plastica sono stati rilevati in diverse fonti, come il suolo rizosferico di mangrovie, discariche, acqua di mare e siti di discarica di plastica [37, 38, 39, 40]. La biodegradazione del PE può essere eseguita da ceppi puri, comunità microbiche o consorzi. L'utilizzo di ceppi puri permette di valutare gli effetti della degradazione oltre che di indagare le vie metaboliche. Le comunità o i consorzi microbici sono composti da diversi generi e specie che coesistono in un ambiente. Pertanto, è possibile osservare che i microrganismi possono lavorare insieme per degradare composti complessi in singoli monomeri [41, 18]. I consorzi microbici per la degradazione del PE stanno guadagnando attenzione a causa dei vantaggi rispetto ai ceppi puri, come la loro attività di supporto (ovvero azioni supportate da un membro extra del consorzio che potenzia l'attività dei consorzi microbici), che è più veloce dei ceppi puri [42, 43, 44]. Inoltre, i consorzi microbici hanno dimostrato che una diminuzione della massa polimerica è relativa ad un aumento della popolazione microbica [45]. La fissazione del microrganismo sulla superficie del polimero è il primo passo per la biodegradazione del PE. Successivamente, i microrganismi crescono utilizzando PE come fonte di carbonio e quindi si verifica la degradazione primaria e finale del polimero [46]. Studi hanno dimostrato che l'idrofobicità del polimero è un fattore limitante per il processo di adesione dei microrganismi al PE poiché la maggior parte dei microrganismi ha una superficie idrofila [47, 48]. Yoon *et al.* [49] hanno descritto che i microrganismi sono in grado di utilizzare il PE, così come altri idrocarburi come fonte di carbonio; tuttavia, le reazioni enzimatiche sono limitate dal loro alto peso molecolare. Secondo Sharma e Reddy [50], la tecnica di biorisanamento offre diversi vantaggi, inclusa la completa decomposizione dei composti in molecole non tossiche poiché il processo non comporta il trasferimento di contaminanti in un altro ambiente. Tuttavia, questo processo ha anche i suoi limiti; per esempio, il tempo di trattamento è solitamente più

lungo di quello di altre tecnologie di bonifica e ci sono alcuni composti che non sono biodegradabili, come metalli pesanti, radionuclidi e alcuni composti clorurati.

2.1.4 Biodegradazione del PE: meccanismi enzimatici e molecolari

I metodi enzimatici sono importanti per la degradazione del PE, che può essere misurata mediante l'aggiunta di gruppi funzionali e la perdita di peso. Alcuni enzimi, tra cui la laccasi e la manganese perossidasi (MnP), sono coinvolti nella biodegradazione del PE [67, 68]. Le laccasi, chiamate anche ossidasi di rame blu, hanno rame nella loro struttura e sono coinvolti nell'ossidazione di ammine aromatiche, composti fenolici e nella riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua. Inoltre, le laccasi ossidano anche i composti non fenolici in presenza di composti di piccolo peso molecolare chiamati mediatori *redox* [69, 70]. MnP contiene eme glicosilata, che viene utilizzato nella biodegradazione di diversi composti, come lignina, IPA, PCB, acidi umici e coloranti sintetici. MnP ossida Mn^{2+} a Mn^{3+} in una reazione dipendente da H_2O_2 e gli acidi dicarbossilici chelanti stabilizzano Mn^{3+} [71, 72, 73]. La determinazione della laccasi viene eseguita utilizzando guaiacolo e 2,2'-azino-bis (acido 3 etilbenzotiazolina-6-solfonico) mentre per MnP si utilizza come substrato il perossido di idrogeno (H_2O_2). Ehara *et al.* [68] hanno trattato l'EP con MnP e hanno rilevato alcuni geni coinvolti nella biodegradazione. Yoon *et al.* [49] hanno utilizzato il composto esadecano per studiare il gene che codifica per l'enzima degradante del polietilene a basso peso molecolare e degli alcani. L'enzima alcano idrossilasi catalizza la prima fase della degradazione dell'alcano ed è codificato dal gene *alkB*. Le depolimerasi e le idrolasi sono enzimi extracellulari che agiscono per abbattere i grandi polimeri plastici e ci sono due diversi metodi per attaccare gli enzimi, l'endoattacco e l'ex-attacco. L'endoattacco è la scissione idrolitica che si verifica da qualche parte lungo la catena e l'ex-attacco si verifica alla fine della catena, risultando in piccoli oligomeri o monomeri, che possono essere assimilati dai

batteri [74, 75, 76]. Inoltre, alcuni enzimi, come cutinasi, idrolasi, lipasi ed esterasi, sono significativi nella degradazione del PE [77, 22, 23, 78, 79]. Questi enzimi scindono i legami esteri attraverso un attacco nucleofilo sugli atomi di carbonio carbonile creato da precedenti reazioni di ossidazione [80]. La rottura del PE in molecole più piccole consente un'attività enzimatica che si verifica solo su molecole più piccole e consente il passaggio di frammenti più piccoli attraverso la membrana cellulare [75]. In generale, il metabolismo intracellulare di queste molecole non è stato ancora valutato chiaramente, tuttavia, alcuni studi hanno descritto il metabolismo intracellulare dei gruppi funzionali carbonilici attraverso l'ossidazione e il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA) [75, 41]. Il processo di degradazione del PE include fasi di ossidazione, deidrogenazione e rottura del legame carbonio-carbonio per produrre acido acetico, integrandosi nel ciclo TCA. Piccoli idrocarburi alifatici (fino a 20 atomi di carbonio) possono anche essere trasportati alla cellula batterica prima della degradazione in CO₂, o sfruttati per la biosintesi di altri importanti prodotti del metabolismo cellulare [74].

2.1.5 Scopo della tesi

Il polimero più comune utilizzato nell'industria della plastica è il polietilene, composto da monomeri di etilene (CH₂ = CH₂). Un tipo di polietilene composto principalmente da catene lineari più strette, più denso e con struttura più organizzata è il polietilene ad alta densità. Esso è un polimero sintetico idrofobo e ad alto peso molecolare, per questo motivo difficilmente biodegradabile [82]. Per renderlo biodegradabile, il PE richiede una modifica della sua struttura cristallina, del peso molecolare e delle proprietà meccaniche responsabili della resistenza alla degradazione [83]. Ciò può essere ottenuto migliorando il livello idrofilo di PE e/o riducendo la lunghezza della sua catena polimerica mediante ossidazione rendendolo accessibile alla degradazione microbica [84]. Recentemente,

Bombelli *et al.* [85] hanno descritto la capacità delle larve di *Galleria mellonella* (colloquialmente chiamata verme della cera), di ingerire e degradare il polietilene. Sebbene *G. mellonella* non si nutra attivamente di plastica nel suo ambiente naturale, è un onnipresente parassita degli apiari, dove i bruchi a crescita rapida consumano voracemente i favi [86]. Simile al polietilene, la struttura del favo è ricca di lunghe catene alifatiche [87, 88]. Pertanto, è possibile che la sua ecologia naturale fornisca al bruco un microbiota unico e una serie di adattamenti fisiologici per ricavare energia da substrati tanto complessi [85, 88]. Nella cera il legame idrocarburico più frequente è $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$, come in PE. Sembra probabile, infatti, che il singolo legame CC di questi composti alifatici sia uno degli obiettivi della digestione [88]. Lo scopo del presente studio era quello di isolare nuovi microrganismi dal tratto intestinale di *Galleria mellonella* e identificare i loro potenziali enzimi degradanti polvere di polietilene ad alta densità. Di conseguenza, è stato isolato un ceppo fungino in grado di degradare le particelle microplastiche di HDPE, *Cladosporium halotolerans*.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Isolamento di microrganismi dall'intestino delle larve Galleria mellonella

Le larve di piccole, medie e grandi dimensioni, prelevate da un telaino di cera d'api contaminato, sono state sezionate al fine di estrarne il contenuto intestinale effettuando dapprima un lavaggio in etanolo al 70% per eliminare eventuali microrganismi presenti lungo la superficie esterna. Il materiale intestinale è stato raccolto in *ependorf* per microcentrifuga da 1,5 mL con 0,2 mL di acqua distillata sterile e 0,05% di *Tween80* e omogeneizzato per 1 min, poi sono stati aggiunti 0,8 mL di acqua con 0,05% di *Tween80* a ciascun *ependorf*. Sono state effettuate diluizioni seriali dell'omogenato e strisci su LB *agar* per stimare il numero e la tipologia di ceppi presenti in ciascun campione. Le piastre sono state incubate a 30°C per 48 ore. Successivamente le colonie isolate sono state strisciate su terreno agarizzato in presenza di cera d'api, utilizzata come singola fonte di carbonio, e su terreno agarizzato in presenza di polietilene ad alta densità. Le piastre sono state incubate a 30°C per 7-10 giorni. Una specifica colonia fungina è stata isolata. Le caratteristiche morfologiche sono state determinate mediante esami macroscopici e microscopici [89]. L'identificazione molecolare è stata eseguita presso la *BMR genomics* s.r.l. mediante amplificazione PCR e sequenziamento del DNA codificante per il gene rRNA 5.8S e gli spaziatori trascritti interni fiancheggiati (ITS). *Cladosporium halotolerans* è stato identificato utilizzando il programma BLAST N, poiché la nostra sequenza di rRNA ha mostrato circa il 99% di identità con questa specie fungina.

2.2.2 Analisi della degradazione del polietilene ad alta densità

Il fungo isolato è stato inoculato in *Luria Bertani* agarizzato in presenza e assenza dell'1% di polietilene con densità di $0,955\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. La polvere di polietilene ad alta densità previo

utilizzo è esposta all'irradiazione UV per 24 ore. Il trattamento agli UV rompe i legami del carbonio e dell'idrogeno, rilasciando i radicali liberi e generando molecole di polietilene più piccole. Inoltre, l'elevata intensità dei raggi UV può accelerare la degradazione ad opera dei batteri [13, 14, 15, 16]. Il *test* su piastra è un metodo semiquantitativo semplice per seguire la degradazione del polimero da parte dell'organismo. Dopo l'inoculazione del fungo nel terreno contenente particelle fini di polietilene, lo sviluppo di un alone chiaro intorno alla colonia è indice di biodegradazione del PE [90]. Allo stesso modo, anche la solubilizzazione dell'HDPE nella coltura fungina liquida è indicativa della sua biodegradazione.

2.2.3 Perdita in peso di HDPE e microscopia elettronica a scansione

Al fine di valutare l'utilizzo dell'HDPE, sono state avviate colture di *Cladosporium halotolerans* in assenza o in presenza del polimero. I controlli dell'esperimento erano rappresentati dal solo mezzo di crescita contenente o meno l'1% di HDPE. Dopo 15 giorni tutti i campioni sono stati essiccati e il loro peso è stato registrato. La quantità di polietilene consumata da *Cladosporium halotolerans* è stata calcolata dalla differenza tra i campioni contenenti HDPE e il campione contenente HDPE e fungo. Per la microscopia elettronica a scansione, tutti i campioni composti dal ceppo fungino coltivato sia in assenza che in presenza di polvere di HDPE sono stati tagliati da parti subapicali utilizzando una lama di rasoio affilata, fissata con glutaraldeide al 3% in tampone fosfato (65 mM, pH 7,2-7,4) per 2 ore a temperatura ambiente, *post*-fissato con tetrossido di osmio all'1% nello stesso tampone fosfato per 1,5 ore a temperatura ambiente, e completamente disidratato con etanolo ed essiccato al punto critico. Sia i campioni biologici (contenenti il fungo) che i campioni di sola polvere di HDPE sono stati quindi caricati su tronchetti di alluminio, rivestiti con una sottile pellicola d'oro utilizzando un evaporatore *EdwardE306* e osservati con un FEI

(Hillsboro, OR, USA) *Quanta 200 ESEM* in alto vuoto modalità (P 70 Pa, HV 30 kV, WD10 mm, spot 3.0).

2.2.4 *Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR)*

La degradazione dell'HDPE è stata confermata utilizzando la spettroscopia infrarossa a trasformata di *Fourier*. Le sospensioni di HDPE con e senza *C. halotolerans* sono state preparate disperdendo una quantità uguale di HDPE (1% p/v) in mezzo di coltura cellulare LB 0.1X. Dopo 14 giorni tutti i campioni sono stati congelati a -80 ° C per 16 ore e liofilizzati a -20°C. I campioni sono stati indicati di seguito come HDPE e HDPE + *C. halotolerans*, rispettivamente. L'analisi della trasmittanza nell'infrarosso in trasformata di *Fourier* è stata effettuata utilizzando uno spettrometro *Nexus FTIR* collegato al rivelatore DTGS KBr (bromuro di potassio). Per ogni campione, sono stati preparati tre *pellet* disperdendo 2mg di polveri liofilizzate in 200 mg di KBr. Tutti gli spettri sono stati registrati nell'intervallo 4000-400 cm^{-1} , con un valore di risoluzione di 2 cm^{-1} e KBr come bianco è stato utilizzato. La stessa procedura è stata utilizzata per analizzare crescite di *Cladosporium halotolerans* e HDPE in presenza e assenza di CuSO_4 alla concentrazione di 1 mM.

2.2.5 *Screening della laccasi*

Studi precedenti hanno rivelato il coinvolgimento della laccasi nella degradazione del polietilene [91]. Quindi, è stato effettuato lo *screening* di questo enzima in *C. halotolerans*. Il saggio per valutare la produzione della laccasi è stato eseguito su piastre contenenti la seguente composizione (g/l): 3,0 peptone, 10,0 glucosio, 0,6 KH_2PO_4 , 0,001 ZnSO_4 , 0,4 K_2HPO_4 , 0,0005 FeSO_4 , 0,05 MnSO_4 , 0,5 MgSO_4 , 20 agar (pH 6) supplementato con 0,02% di guaiacolo. *Cladosporium halotolerans* e *Candida albicans*, usato come controllo

negativo, sono stati piastrati e le piastre sono state incubate a 30°C per 7 giorni al buio. L'attività della laccasi è stata visualizzata su piastre contenenti guaiacolo allo 0,02% poiché la laccasi catalizza la polimerizzazione ossidativa del guaiacolo favorendo la formazione di zone bruno-rossastre nel mezzo [92]. Inoltre, è stato precedentemente dimostrato che la produzione di laccasi da parte dei funghi dipende notevolmente dalla composizione del terreno di coltivazione [93], per cui sono stati valutati gli effetti del rame (CuSO₄) e del sodio-dodecilsolfato (SDS), sull'attività laccasica.

2.2.6 Estrazione di proteine da supernatante fungino

Una colonia singola di *Cladosporium halotolerans* è stata inoculata in brodo LB 0,1X in presenza e assenza di HDPE 1% e incubato a 30°C per 15 giorni. Terminato il periodo di incubazione la coltura è stata filtrata con carta da filtro per rimuovere la biomassa. Il surnatante è stato sterilizzato con filtro da 0,22 µm (*Millipore, Bedford, MA, USA*). La concentrazione proteica del surnatante è stata determinata mediante saggio *bradford* (*Bio-Rad*) [94]. In seguito, per rimuovere l'eccesso di sali dovuti al brodo di coltura, è stata effettuata una precipitazione in acido tricloroacetico (TCA), si aggiunge 1 volume di TCA (100%) a 4 volumi di campione di proteine e si incuba per 10 min a 4°C. Il campione viene centrifugato ai massimi giri per 5 minuti, si rimuove il surnatante, lasciando intatto il *pellet* proteico biancastro. Si lava il *pellet* e si lascia asciugare mettendo la provetta in un blocco termico a 95°C per 5-10 minuti per eliminare l'acetone. Il tampone 4X Laemmli (*SIGMA*) è stato aggiunto ai campioni, fatto bollire a 100 ° C per 5 minuti e risolto mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide di sodio dodecil solfato (SDS) (10%) per separare le proteine in base al loro peso molecolare. Successivamente il gel è stato colorato con il blu di *Comassie* (0,1% di blu brillante di *Comassie* in acido acetico 10%).

2.3 Risultati

2.3.1 Isolamento di microrganismi da *Galleria mellonella*

Dopo aver piastrato omogenati gastro-intestinali di diverse larve di *Galleria mellonella*, abbiamo isolato 15 colonie selezionate per la loro capacità di crescita in terreno *Luria Bertani* (LB) contenente cera d'api e su terreno solido contenente polietilene ad alta densità. La scelta di questo terreno di coltura è stata effettuata per permettere la crescita del maggior numero di organismi di origine microbica e fungina. Tra i diversi microrganismi è stata selezionata una colonia fungina in grado di crescere su terreno solido contenente polvere di HDPE come principale fonte di carbonio. La caratterizzazione morfologica del fungo è mostrata nella Figura 2: isolamento di una singola colonia su piastra di agar LB (pannello A) e osservazione al microscopio ottico (pannello B). La sequenza del gene rRNA 5.8S ci ha permesso di classificare l'isolato come *Cladosporium halotolerans* (identità del 99,4%).

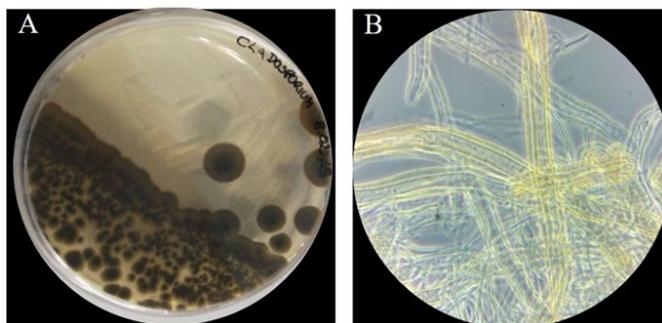


Figura 2: isolamento di una singola colonia su piastra di agar LB (pannello A); osservazione al microscopio ottico (pannello B) del fungo *Cladosporium halotolerans*.

2.3.2 Capacità di *Cladosporium halotolerans* di degradare HDPE

Studi recenti hanno riportato diversi tipi di microrganismi, presenti nell'intestino degli insetti, in grado di degradare la plastica in seguito all'ingestione [95]. Abbiamo isolato un ceppo fungino dall'intestino della larva *Galleria mellonella*, identificato come *C. halotolerans* tramite analisi di sequenziamento del gene RNA 5.8S. In generale, la

biodegradazione di plastiche tipo *film* mediata da batteri richiede un minimo di quattro settimane per essere osservata [96, 97]. In questo studio, invece di un sottile *film* di plastica, abbiamo utilizzato polvere di polietilene ad alta densità preventivamente esposta agli UV e facilitarne la degradazione ad opera di microrganismi. All'interno di un mezzo liquido abbiamo aggiunto l'1% di HDPE, che in assenza del fungo come mostrato in Figura 3 (pannello A) risultato altamente idrofobiche e legate alle pareti della beuta rimanendo separate dal mezzo liquido. Nella stessa Figura, pannello B, è mostrata la crescita di *C. halotolerans* in assenza di polvere di HDPE. Mentre nel pannello C, l'aggiunta di polvere di HDPE alle cellule di *C. halotolerans*, ha determinato un aumento della torbidità del mezzo liquido e una completa solubilizzazione dell'HDPE. Pertanto, la coltura in soluzione liquida suggerisce che *C. halotolerans* media la rapida solubilizzazione della polvere di HDPE e ha invertito la struttura chimica superficiale da idrofobica a idrofila entro 15 giorni.

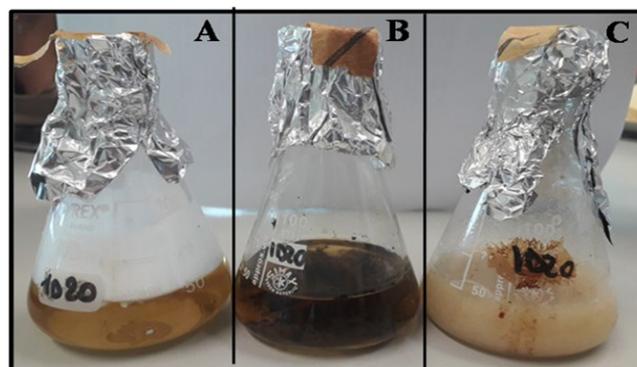


Figura 3: osservazione macroscopica dell'HDPE in presenza e in assenza del fungo *Cladosporium halotolerans*. Pannello A assenza di *Cladosporium halotolerans* e presenza di HDPE, pannello B presenza di *Cladosporium halotolerans* e assenza di HDPE, pannello C presenza di fungo e HDPE.

Analogo risultato è stato ottenuto dal *test* effettuato su piastra, si è miscelata una polvere di polietilene ad alta densità all'1% con il terreno di coltura. Dopo 15 giorni di incubazione come mostrato in Figura 4 pannello A, l'assenza di HDPE permette al fungo di crescere in modo uniforme occupando l'intera superficie della piastra; nella stessa figura pannello B in

presenza di HDPE il fungo cresce formando cerchi concentrici più chiari indice di biodegradazione di HDPE ad opera del microrganismo.

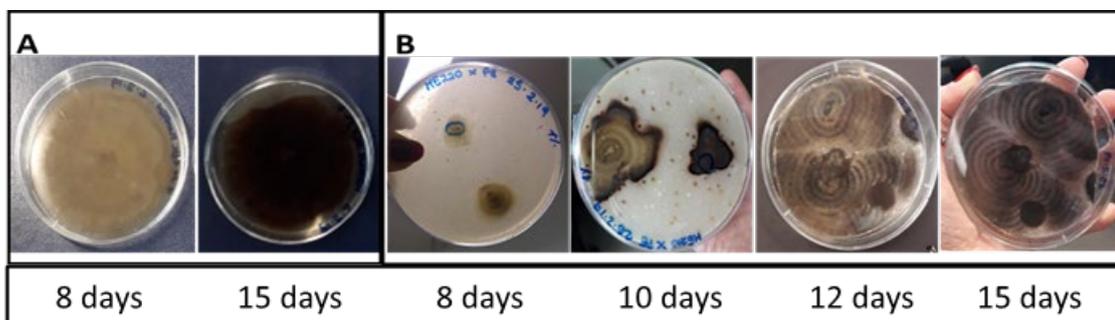


Figura 4: monitoraggio di 15 giorni della crescita di *C. halotolerans* in assenza (pannello A) e in presenza (pannello B) di HDPE. La presenza di zone chiare concentriche attorno la colonia di *Cladosporium* indicano il processo di degradazione dei HDPE.

2.3.3 Evidenza fisiologica e meccanica della degradazione di HDPE

Per valutare la perdita di peso del polietilene, sono state avviate crescite di *C. halotolerans* con e senza microparticelle di HDPE. Come mostrato in tabella 2, il peso secco del campione contenente *C. halotolerans* con HDPE appare ridotto rispetto a quello con solo HDPE (~25 mg). Per spiegare questo risultato, e in accordo con quanto riportato in letteratura [99], possiamo ipotizzare che la degradazione dell'HDPE sia associata alla frammentazione ossidativa della spina dorsale del carbonio della catena polimerica con la produzione associata di specie volatili o gassose che causerebbero la riduzione di peso osservata.

CAMPIONI	PESO SECCO (mg)
LB + HDPE	25 ± 0.8
LB + <i>Cladosporium halotolerans</i> + HDPE	18 ± 0.5

Tabella 2: I campioni sono mostrati a sinistra, il loro peso secco espresso in mg a destra.

Per supportare l'ipotesi che *C. halotolerans* degrada l'HDPE, sono stati eseguiti esperimenti di microscopia elettronica a scansione. Le osservazioni SEM hanno mostrato che la polvere di HDPE è composta da una miscela di piccole particelle (Figura 4a). *C. halotolerans* si sviluppa come uno spesso spago di ife (Figura 4b) che, se coltivato in presenza di polvere di HDPE, avvolge strettamente (Figura 4c, d). Questa osservazione è in accordo con quanto riportato in letteratura riguardo la degradazione meccanica da parte delle ife fungine, che incorporando le particelle di HDPE, contribuiscono alla frammentazione dello stesso.

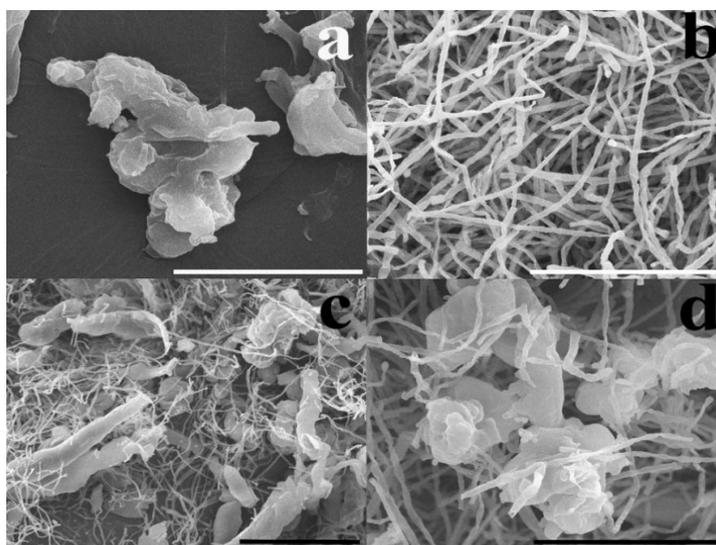


Figura 5: (a) Tipiche particelle di HDPE; b) ife di *Cladosporium halotolerans* cresciuto in assenza di HDPE; (c) fungo cresciuto in presenza di HDPE a ingrandimento inferiore; (d) fungo cresciuto in presenza di HDPE a ingrandimento maggiore. Barre della scala: 50 μ m (a, b, d); 100 μ m (c)

2.3.4 Degradazione dell'HDPE analizzata mediante FTIR

Per validare l'ipotesi secondo cui il fungo utilizza e degrada polietilene ad alta densità, è stata condotta un'analisi FTIR di HDPE e HDPE + *C. halotolerans*. Nella Figura 6 sono stati riportati spettri di ciascun campione. Entrambi i campioni mostrano la tipica banda di assorbimento del polietilene. I picchi a 2920 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} sono stati assegnati alle vibrazioni di allungamento asimmetriche C-H e simmetriche C-H in $-\text{CH}_2-$, rispettivamente. Il picco a 1466 cm^{-1} è stato attribuito a vibrazioni di deformazione C-H in

$-(CH_2)_n-$, mentre il picco a 723 cm^{-1} a vibrazioni oscillanti C–C in $-(CH_2)_n-$ [100]. Inoltre, alcune bande relative al terreno di coltura LB 0.1X erano visibili anche a circa 3500 e 1640 cm^{-1} e attribuite a vibrazioni di stiramento OH e flessione di H_2O . Le bande a 1370 e 1080 cm^{-1} erano correlate allo stretching simmetrico COO e alla vibrazione di flessione CH_3 di lipidi e proteine, rispettivamente [101]. Per valutare possibili variazioni di quantità di HDPE in presenza di *C. halotolerans* il picco principale a 1080 cm^{-1} (freccia in Figura 6) è stato scelto come *standard* interno. In particolare, è stato scelto il rapporto tra l'area del picco nell'intervallo 2920 e 2852 cm^{-1} (picchi principali dell'HDPE) e l'area del picco a 1080 cm^{-1} (picco principale del mezzo di coltura) come parametro per valutare l'evoluzione della quantità di HDPE nel mezzo di coltura. Mantenendo costante l'area del picco a 1080 cm^{-1} , era chiaramente visibile una riduzione dell'intensità delle bande principali di HDPE a 2920 e 2852 cm^{-1} (spettro rosso della Figura 6). Confrontando gli spettri, la diminuzione dell'area integrale delle principali bande dell'HDPE è correlata ad una riduzione della quantità di HDPE di circa il 70% in peso in presenza di *C. halotolerans*.

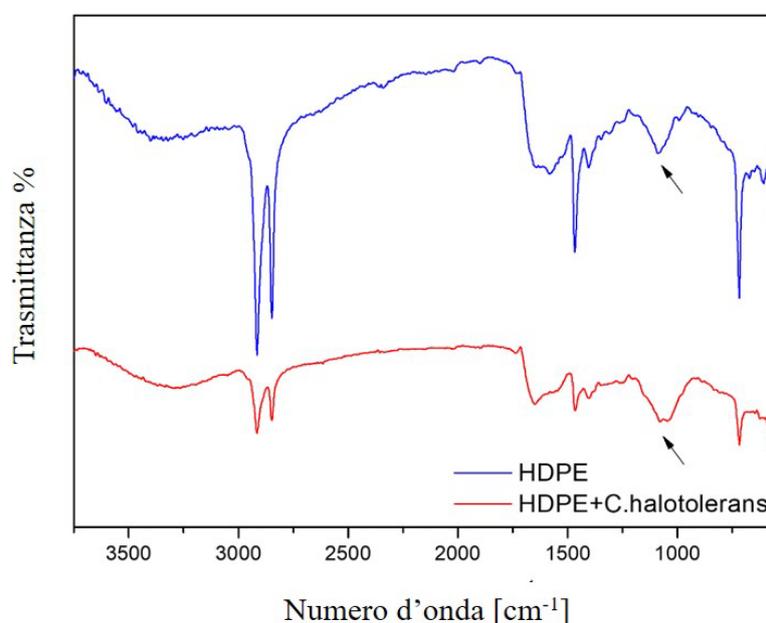


Figura 6: spettri FT-IR di solo HDPE (linea blu) e HDPE con *Cladosporium halotolerans* (linea rossa). La freccetta indica il picco principale a 1080 cm^{-1} scelto come *standard* interno.

2.3.5 Screening di laccasi

Ci siamo, dunque, chiesti quali fossero gli enzimi utilizzati dal fungo per poter degradare e consumare HDPE. In letteratura è noto che alcune specie di funghi sono produttori di laccasi e che questi enzimi sono probabilmente coinvolti nel processo di degradazione del polietilene [91]. Per questo motivo, al fine di verificare se *Cladosporium* fosse un produttore di laccasi, è stato eseguito un semplice *test* di *screening* utilizzando terreno, la cui composizione è descritta nel paragrafo 2.6 della sezione dei metodi, supplementato con 0,02% di guaiacolo. Come mostrato nella Figura 7 pannello A è presente *Candida albicans* in assenza (A1) e presenza di guaiacolo (A2). *Candida albicans* non reagisce con il substrato, confermando l'assenza di attività laccasica, per questo motivo utilizzata come controllo negativo. Il pannello B contiene *Cladosporium halotolerans* in assenza (B1) e presenza di guaiacolo (B2). In B2, dopo un'incubazione al buio di 7 giorni si sviluppa il colore rossastro indice dell'ossidazione del substrato guaiacolo da parte della laccasi.

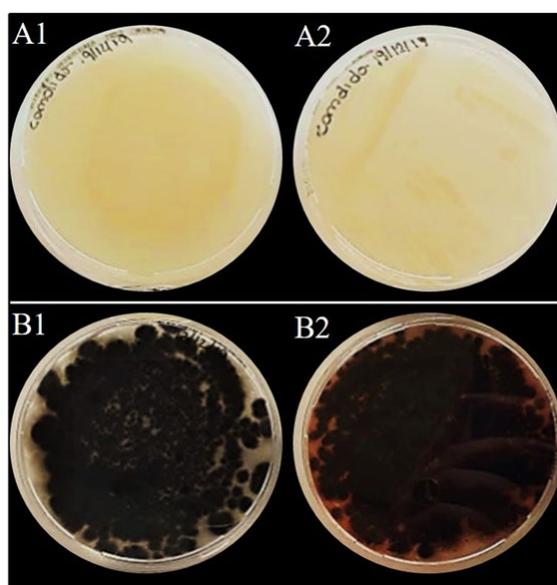


Figura 7: *test* di *screening* della laccasi utilizzando guaiacolo. Il pannello A mostra *Candida albicans* usata come controllo negativo; il pannello B mostra *Cladosporium halotolerans* in assenza (B1) e presenza (B2) del substrato della laccasi.

I nostri esperimenti dimostrano che il meccanismo degradativo dell'HDPE esercitato dal fungo è molto complesso ed è dato, probabilmente, dalla combinazione di un'azione meccanica ed enzimatica. L'azione meccanica è esercitata dalle ife fungine, che sono a stretto contatto con le particelle di HDPE, come mostrato nelle foto al SEM precedentemente, mentre la laccasi secreta dal fungo è responsabile dell'azione enzimatica. La velocità con cui il fungo è in grado di rendere idrofilo l'HDPE e di degradarlo è di fondamentale interesse, solo dopo 12 giorni il microrganismo forma, su terreno solido contenente HDPE, cerchi concentrici e trasparenti, indice della forte capacità degradativa fungina.

2.3.6 Effetto del rame sull'attività laccasica

Per studiare se variazioni dell'attività laccasica fosse collegata a una maggiore o minore degradazione del polietilene ad alta densità da parte di *Cladosporium halotolerans*, abbiamo utilizzato composti noti per indurre variazioni nell'attività di questo enzima. È stato precedentemente dimostrato che la produzione di laccasi da parte dei funghi dipende notevolmente dalla composizione del terreno di coltivazione; per esempio è stato riportato che la fonte di carbonio, il contenuto di azoto, di rame, SDS e i composti induttori fenolici hanno effetti significativi sull'attività della laccasi [93]. Per questo motivo sono stati valutati gli effetti del rame (CuSO_4 1 mM), noto per favorirne un aumento dell'attività [102], e dell'SDS (0,025 mM), noto per ridurne l'attività [103]. Sono state avviate crescite del fungo in presenza e assenza di tali composti a diverse concentrazioni. In seguito, scelta la concentrazione più opportuna, ho ripetuto il saggio di *screening* della laccasi. Dai risultati, dimostrati in Figura 8, è emerso che il CuSO_4 (1 mM) non risulta tossico per *Cladosporium* (pannello C), ne consente la crescita e favorisce la produzione della laccasi che ossida il substrato guaiacolo con conseguente sviluppo di colore rosso (pannello F). Diverso per l'SDS

che, ad una concentrazione non letale per il fungo di 0.05 mM (pannello B), non consente la produzione di colore rosso per mancata ossidazione del guaicolo (pannello E). I pannelli A e D rappresentano *Cladosporium* in assenza di CuSO₄ e SDS.

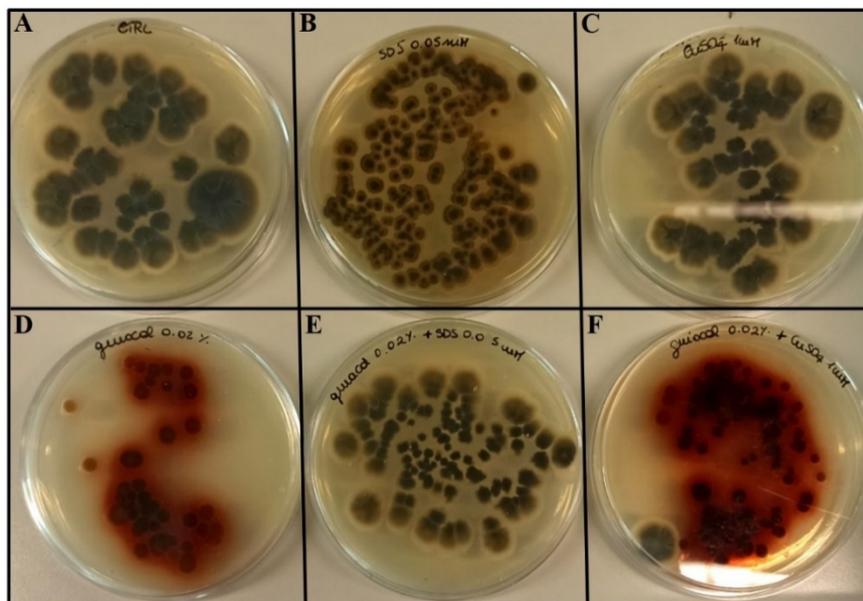


Figura 8: Test di screening della laccasi. I pannelli A, B e C mostrano *Cladosporium* nelle 3 diverse condizioni (controllo, SDS e CuSO₄) in assenza di guaicolo; i pannelli D, E e F mostrano *Cladosporium* nelle 3 diverse condizioni (controllo, SDS e CuSO₄) in presenza del substrato guaicolo.

A supporto di questi risultati è stata condotta nuovamente l'analisi FTIR su colture di *Cladosporium* con HDPE in presenza e assenza di CuSO₄. Degli spettri ottenuti riportati in Figura 9, è stata valutata un'ulteriore diminuzione dell'area integrale delle bande principali di HDPE (2920 cm⁻¹ 2852 cm⁻¹ 1466 cm⁻¹ 1723 cm⁻¹) di circa l'8% del peso, confermando che il CuSO₄ è un cofattore della laccasi che a sua volta determina un maggiore utilizzo di HDPE da parte di *C. halotolerans*.

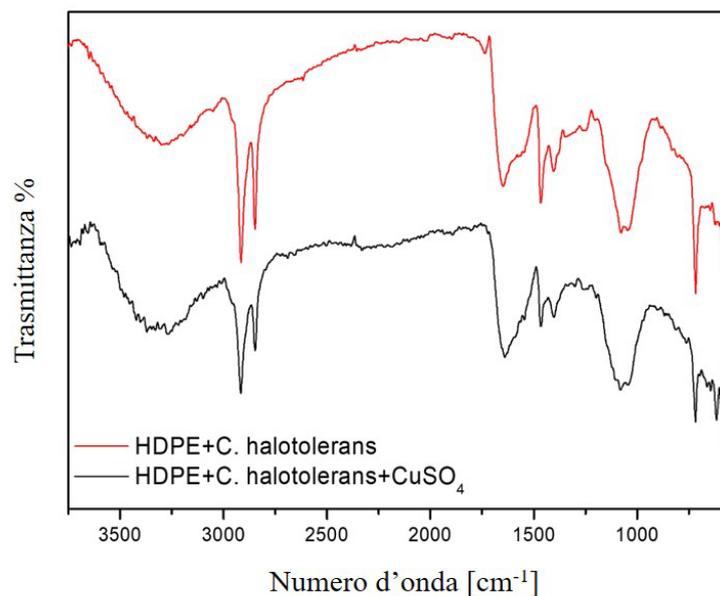


Figura 9: Spettri FT-IR di HDPE con *C. halotolerans* (linea rossa) e HDPE con *C. halotolerans* e CuSO_4 (linea nera). Pannello B: Aree integrali degli spettri FTIR nella regione di $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ di HDPE (blu) e HDPE + *C. halotolerans* senza (rosso) e con (nero) CuSO_4 .

Infine, il confronto dell'area integrale di tutti gli spettri FTIR nella regione $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, (Figura 10), ha mostrato chiaramente la significativa diminuzione di HDPE in presenza di *C. halotolerans*.

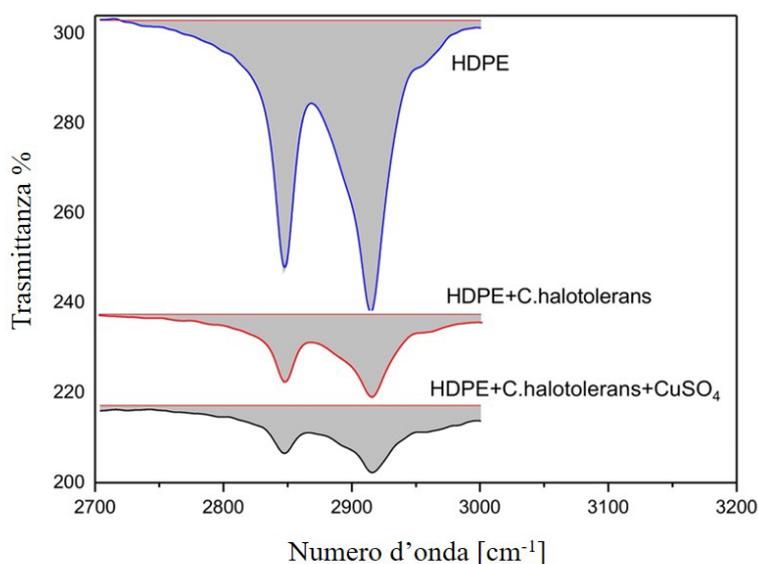


Figura 10: Aree integrali degli spettri FT-IR nella regione di $2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ di HDPE (blu) e HDPE + *C. halotolerans* senza (rosso) e con (nero) CuSO_4 .

2.3.7 Analisi dei surnatanti di *Cladosporium halotolerans*

Al fine di verificare la localizzazione dell'enzima laccasi e per verificare se il trattamento con HDPE di 15 giorni provoca cambiamenti nell'espressione delle proteine secrete nel supernatante dal fungo, è stata eseguita una corsa elettroforetica su *gel* di poliacrilammide in condizioni denaturanti. Per prevenire l'alterazione della migrazione delle proteine dovuta alla presenza dei sali, è stata effettuata una precipitazione in acido tricloroacetico (TCA). In Figura 10 è possibile vedere una banda corrispondente al peso molecolare dell'enzima purificato dalla laccasi solo quando il fungo è cresciuto in presenza di HDPE (*lane 1*). Lo studio dei pattern proteici dei supernatanti del fungo suggerisce la presenza dell'enzima laccasi, ma mostra anche differenze quando è presente HDPE. Ciò è di notevole importanza per studi futuri, volti a capire quali sono queste proteine e in quali percorsi biochimici sono coinvolte.

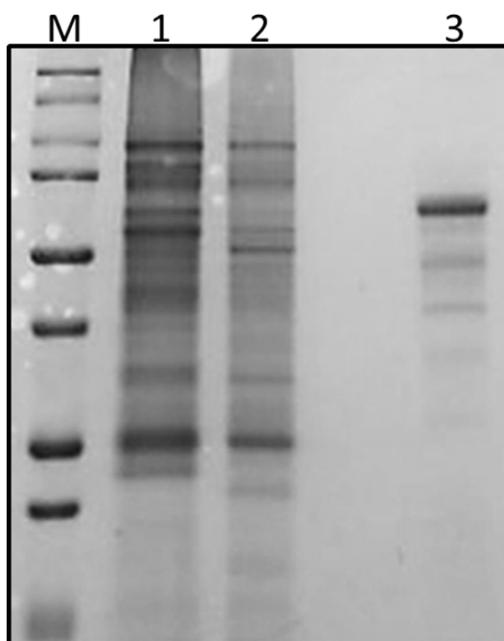


Figura 11: SDS-PAGE di surnatanti ottenuti da *Cladosporium halotolerans* in presenza (*lane 1*) o assenza (*lane 2*) di HDPE, laccasi purificata commerciale (*lane 3*).

2.4 Discussione

L'inquinamento da plastica rappresenta un grande problema per l'umanità. Dal 1961, quando Fuhs riportò la capacità di alcuni microrganismi di consumare paraffina come fonte di carbonio, è stato studiato il potenziale di biodegradazione del PE e di altri gruppi di plastiche ad opera di funghi e batteri [104]. Questo lavoro delinea le caratteristiche di un ceppo fungino, *Cladosporium halotolerans*, isolato dall'intestino della larva della cera *Galleria mellonella*, capaci di degradare polietilene ad alta densità. La cera d'api contiene il 14% di idrocarburi a catena lunga, che sono anche un componente importante del polietilene [105, 106, 107]. È stata studiata, quindi, la capacità del ceppo fungino isolato di degradare HDPE attraverso diversi esperimenti. Una prima analisi in mezzo liquido ha permesso di osservare un cambiamento nella struttura chimica superficiale dell'HDPE, che da idrofobo diventa idrofilo nel giro di 15 giorni [108]. I tempi di degradazione osservati appaiono relativamente brevi e questo aspetto assume una notevole importanza nell'ambito di una possibile applicazione nei processi di biorisanamento [109]. Analogo risultato è stato ottenuto dal *test* effettuato su piastra. Dopo 15 giorni di incubazione, l'assenza di HDPE permette al fungo di crescere in modo uniforme, occupando l'intera superficie della piastra; in presenza di HDPE il fungo cresce formando cerchi concentrici più chiari indicando la biodegradazione del polietilene stesso. Per confermare il risultato, è stata valutata la perdita di peso del polietilene e l'eventuale degradazione meccanica ad opera delle ife fungine mediante analisi SEM [110-111]. In seguito, la frammentazione della catena di carbonio è stata ulteriormente confermata anche dall'analisi FT-IR, dove i picchi di PE 2920 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} appaiono fortemente ridotti (70% in meno) nei campioni in cui era presente *Cladosporium halotolerans*. Dopo aver osservato l'idrofilia acquisita dall'HDPE, la sua perdita di peso e la capacità delle ife del fungo di degradarlo meccanicamente, abbiamo indagato sulla capacità enzimatica del fungo di degradare il polietilene ad alta densità. Dalla letteratura è noto che alcune specie di funghi sono produttori di laccasi e che questi enzimi sono probabilmente coinvolti nel

processo di degradazione del polietilene [18]. Attraverso un *test di screening*, *C. halotolerans* è risultato positivo alla laccasi. Questo enzima è coinvolto nel processo di degradazione e la sua produzione influenza fortemente la quantità di HDPE degradato. Infatti, dall'analisi FT-IR è emerso che il CuSO₄, noto per favorire un aumento dell'attività laccasica, determina una maggiore riduzione dei picchi relativi all'HDPE, rispetto al campione in cui è presente il solo HDPE o il fungo trattato con HDPE in assenza di rame. I nostri esperimenti dimostrano che il meccanismo degradativo dell'HDPE esercitato dal fungo è molto complesso ed è probabilmente la combinazione di un'azione meccanica ed enzimatica. La velocità con cui il fungo è in grado di rendere l'HDPE idrofilo e degradarlo è di fondamentale interesse. Negli ultimi anni sono stati isolati diversi batteri e funghi in grado di fare lo stesso ma in tempi molto più lenti, come indicato nella tabella 1 [112]. Questo aspetto ci porta ad ipotizzare che la cooperazione di diversi meccanismi ed enzimi sia necessaria per il completo processo di degradazione dell'HDPE ad opera di *C. halotolerans*. Lo studio dei surnatanti proteici del fungo suggerisce la presenza dell'enzima laccasi, ma mostra anche differenze nel *pattern* proteico di *Cladosporium halotolerans* quando cresce a contatto con l'HDPE. Ciò è di notevole importanza per studi futuri, volti a capire quali sono le proteine diversamente espresse e in quali percorsi biochimici sono coinvolte. Saranno necessari ulteriori esperimenti per determinare con precisione le vie molecolari alla base di questo complesso processo, al fine di una possibile applicazione di *C. halotolerans* nei processi di biorisanamento.

Bibliografia Capitolo 1

1. Chellat MF, Raguž L, Riedl R. Targeting antibiotic resistance. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016;(March).
2. Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42–51.
3. Breidenstein, E.B., de la Fuente-Nunez, C., Hancock, R.E., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19, 419–426.
4. Lambert, P.A., 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 95 (Suppl. 41), 22–26
5. Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 727–737.
6. Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818–1824.
7. Poole, K., 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 61, 2200–2223.
8. Sun, J., Deng, Z., Yan, A., 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* 453, 254–267.
9. Wright, G.D., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1451–1470.
10. Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr* 4.
11. Fernandez, L., Hancock, R.E., 2012. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 25, 661–681.
12. Arber, W., 2014. Horizontal gene transfer among bacteria and its role in biological evolution. *Life (Basel)* 4, 217–224.
13. Das, T., Sehar, S., Manefield, M., 2013. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ Microbiol Rep* 5, 778–786.
14. Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881–890.
15. Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138.
16. Walters 3rd, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317–323.
17. Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40, 277–283.
18. Chatterjee, M., Anju, C.P., Biswas, L., Anil Kumar, V., Gopi Mohan, C., Biswas, R., 2016.
19. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol* 306, 48–58.
20. Hurley, M.N., Camara, M., Smyth, A.R., 2012. Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 40, 1014–1023.
21. Warnke PH, Terheyden H, Ačil Y, Springer IN, Sherry E, Reynolds M, Russo PAJ, Bredee JP, Podschun R: Tumor smell reduction with antibacterial essential oils. *Cancer* 2004, 100, 879–880.

22. Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R: Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Forsch Komplementmed* 2009, 16, 79–90.
23. Efferth T, Koch E: Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Curr Drug Targ* 2011, 12, 1–11.
24. Radulović NS, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Stojanović NM: Antimicrobial plant metabolites: Structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem* 2013, 20, 932–952.
25. Kalembe D, Kunicka A: Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 2003, 10, 813–829.
26. Carneiro de Barros J, Lucia da Conceição M, Gomes Neto NJ, Vieira da Costa AC, Pinto Siqueira J, Diniz
27. Basílio I, Leite de Souza E: Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT – Food Sci Technol* 2009, 42, 1139–1143.
28. Wendakoon CN, Sakaguchi M: Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Prot* 1995, 58, 280–283.
29. Heydari, M.; Zanfardino, A.; Taleei, A.; Bushehri, A.A.S.; Hadian, J.; Maresca, V.; Sorbo, S.; Napoli, M. Di; Varcamonti, M.; Basile, A.; et al. Effect of heat stress on yield, monoterpene content and antibacterial activity of essential oils of *mentha x piperita* var. *mitcham* and *mentha arvensis* var. *piperascens*. *Molecules* 2018, doi:10.3390/molecules23081903.
30. Napoli, M. Di; Maresca, V.; Varcamonti, M.; Bruno, M.; Badalamenti, N.; Basile, A.; Zanfardino, A. (+)-(E)-Chrysanthenyl acetate: A molecule with interesting biological properties contained in the *Anthemis secundiramea* (asteraceae) flowers. *Appl. Sci.* 2020, doi:10.3390/app10196808.
31. Di Napoli, M.; Varcamonti, M.; Basile, A.; Bruno, M.; Maggi, F.; Zanfardino, A. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of hemlock (*Conium maculatum*, Apiaceae) essential oil. *Nat. Prod. Res.* 2019, doi:10.1080/14786419.2018.1477151.
32. Guérout-Fleury, A.M.; Shazand, K.; Frandsen, N.; Stragier, P. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* 1995, 167, 335–336.
33. Russo, A.; Formisano, C.; Rigano, D.; Cardile, V.; Arnold, N.A.; Senatore, F. Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three lebanese *Salvia* species. *Ind. Crops Prod.* 2016, 83, 492–499.
34. Vetter J. 2004. Poison hemlock (*Conium maculatum* L.). *Food Chem Toxicol.* 42:1373–1382.
35. Panter KE, Keeler RF, Baker D. 1988a. Toxicoses in livestock from the hemlocks (*Conium* and *Cicuta* spp.). *J Anim Sci.* 66:2407–2413.
36. Corsi G, Biasci D. 1998. Secretory structures and localisation of alkaloids in *Conium maculatum* L. (Apiaceae). *Ann Bot.* 81:157–162.
37. Masoudi S, Esmaili A, Khalilzadeh MA, Rustalyan A, Moazami N, Akhgar MR, Aravlpour VM. 2006. Volatile constituents of *Dorema aucheri* Boiss., *Seseli libanotis* (L.) W. D. Koch var. *armeniacum* Bordz. and *Conium maculatum* L. three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. *Flavour Fragr J.* 21:801–804.
38. Radulovic N, Zlatkovic D, Zlatkovic B, Dokovic D, Stojanovic G, Palic R. 2008. Chemical composition of leaf and flower essential oils of *Conium maculatum* from Serbia. *Chem Nat Comp.* 44:390–392.
39. Huang M, Sanchez-Moreiras AM, Abel C, Sohrabi R, Lee S, Gershenzon J, Tholl D. 2012. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist.* 193:997–1008.

40. Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem.* 269:8022–8028.
41. Toke, O., 2005. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* 80, 717–735.
42. Peschel, A., Sahl, H.-G., 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 529–536.
43. Tytler, E.M., Anantharamaiah, G.M., Walker, D.E., Mishra, V.K., Palgunachari, M.N., Segrest, J.P., 1995. Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry* 34, 4393–4401.
44. Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.
45. Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., Hancock, R.E., 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macro-molecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46,605–614.
46. Chung, P.Y., Khanum, R., 2017. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J Microbiol Immunol Infect* 50, 405–410.
47. Hancock, R.E., Haney, E.F., Gill, E.E., 2016. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol* 16, 321–334.
48. Pletzer, D., Coleman, S.R., Hancock, R.E., 2016. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol* 33, 35–40.
49. Gordon, Y.J., Romanowski, E.G., McDermott, A.M., 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res* 30, 505–515.
50. Grassi, L., Di Luca, M., Maisetta, G., Rinaldi, A.C., Esin, S., et al., 2017. Generation of persister cells of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* by chemical treatment and evaluation of their susceptibility to membrane-targeting agents. *Front Microbiol* 8, 1917.
51. Zhou, Y., Peng, Y., 2013. Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Exp Ther Med* 6, 1000–1004.
52. Aoki, W., Ueda, M., 2013. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel)* 6, 1055–1081.
53. Walsh, C.T., O'Brien, R.V., Khosla, C., 2013. Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew. Chem.Int. Ed. Engl.* 52, 7098–7124.
54. Bangalore, N., Travis, J., Onunka, V.C., Pohl, J., Shafer, W.M., 1990. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *J. Biol. Chem.* 265, 13584–13588.
55. Cash, H.L., Whitham, C.V., Behrendt, C.L., Hooper, L.V., 2006. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313, 1126–1130.
56. Bensch, K.W., Raida, M., Magert, H.J., Schulz-Knappe, P., Forssmann, W.G., 1995. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 368, 331–335.
57. Gallo, R.L., Kim, K.J., Bernfield, M., Kozak, C.A., Zanetti, M., Merluzzi, L., Gennaro, R., 1997. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J. Biol. Chem.* 272, 13088–13093.
58. Curtiss LK, Forte TM & Davis PA (1984) Cord blood plasma lipoproteins inhibit mitogen-stimulated lymphocyte proliferation. *J Immunol* 133, 1379–1384.
59. Tenger C & Zhou X (2003) Apolipoprotein E modulates immune activation by acting on the antigen-presenting cell. *Immunology* 109, 392–397.

60. Riddell DR, Graham A & Owen JS (1997) Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine: nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J Biol Chem* 272, 89–95.
61. van den Elzen P, Garg S, Leon L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, Dascher CC, Cheng TY, Sacks FM, Illarionov PA et al. (2005) Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* 437, 906–910.
62. Marques MA, Owens PA & Crutcher KA (2004) Progress toward identification of protease activity involved in proteolysis of apolipoprotein E in human brain. *J Mol Neurosci* 24, 73–80.
63. Pane K, Durante L, Crescenzi O, et al. Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. *J Theor Biol.* 2017;419: 254-265.
64. Papareddy P, Kalle M, Kasetty G, Morgelin M, Rydengard V, Albiger B, Lundqvist K, Malmsten M & Schmidtchen A (2010) C-terminal peptides of tissue factor pathway inhibitor are novel host defense molecules. *J Biol Chem* 285, 28387–28398.
65. Andersson E, Rydengard V, Sonesson A, Morgelin M, Bjorck L & Schmidtchen A (2004) Antimicrobial activities of heparin-binding peptides. *Eur J Biochem* 271, 1219–1226.
66. Kok E, Haikonen S, Luoto T, Huhtala H, Goebeler S, Haapasalo H & Karhunen PJ (2009) Apolipoprotein E dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann Neurol* 65, 650–657.
67. Pane K, Sgambati V, Zanfardino A, et al. A new cryptic cationic antimicrobial peptide from human apolipoprotein E with antibacterial activity and immunomodulatory effects on human cells. *FEBS J.* 2016;283(11):2115-2131
68. Gee, K.; Kozlowski, M.; Kumar, A. Tumor necrosis factor- α induces functionally active hyaluronan-adhesive CD44 by activating sialidase through p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 37275–37287.
69. Blanqué, R.; Meakin, C.; Millet, S.; Gardner, C.R. Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: Comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha. *Gen. Pharmacol.* 1996, 27, 973–977
70. Freudenberg, M.A.; Tchaptchet, S.; Keck, S.; Fejer, G.; Huber, M.; Schütze, N.; Beutler, B.; Galanos, C. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: Benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology* 2008, 213, 193–203.
71. Li, P.; Wohland, T.; Ho, B.; Ding, J.L. Perturbation of Lipopolysaccharide (LPS) Micelles by Sushi 3 (S3) antimicrobial peptide. The importance of an intermolecular disulfide bond in S3 dimer for binding, disruption, and neutralization of LPS. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 50150–50156.
72. Bhattacharjya, S.; Domadia, P.N.; Bhunia, A.; Malladi, S.; David, S.A. High-resolution solution structure of a designed peptide bound to lipopolysaccharide: transferred nuclear overhauser effects, micelle selectivity, and anti-endotoxic activity. *Biochemistry* 2007, 46, 5864–5874.
73. Fakhry S, Manzo N, D'Apuzzo E, Pietrini L, Sorrentini I, Ricca E, De Felice M, Baccigalupi L, 2009. Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Res Microbiol.* 160(10): 817-23.
74. Enan G, el-Essawy AA, Uyttendaele M, Debevere J, 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *Int J Food Microbiol.* Jul;30(3):189-215.
75. Zanfardino, A, Criscuolo G, Di Luccia B, Pizzo E, Ciavatta M.L, Notomista E, Carpentieri A, Pezzella A, Varcamonti M, 2017. Identification of a new small bioactive peptide from *Lactobacillus gasseri* supernatant. *Beneficial Microbes* Volume 8, Issue 1, Pages 133-141

76. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol* 9, 1050–1074.
77. Salata, O., 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology* 2, 3.
78. Ranghar S. Nanoparticle-based drug delivery systems: promising approaches against infections. *Braz Arch Biol Techn.* 2012;57: 209–222.
79. Qi G, Li L, Yu F, Wang H. Vancomycin-modified mesoporous silica nanoparticles for selective recognition and killing of pathogenic gram-positive bacteria over macrophage-like cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 201
80. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(3 pt A):427–443.3;5(21):10874–10881.
81. Gurunathan S, Han JW, Dayem AA, Eppakayala V, Kim JH. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7:5901–5914.
82. Nagy A, Harrison A, Sabbani S, Munson RS Jr, Dutta PK, Waldman WJ. Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *Int J Nanomedicine.* 2011;6: 1833–1852.
83. Leung YH, Ng AM, Xu X, et al. Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small.* 2014;10(6):1171–1183.
84. Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA, Åberg C. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J Am Chem Soc.* 2013;135(4):1438–1444.
85. Sarwar A, Katas H, Samsudin SN, Zin NM. Regioselective sequential modification of chitosan via azide-alkyne click reaction: synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan derivatives and nanoparticles. *PLoS One.* 2015;10(4): e0123084.
86. Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(6):1847–1868.
87. Xia W, Grandfield K, Hoess A, Ballo A, Cai Y, Engqvist H. Mesoporous titanium dioxide coating for metallic implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012;100(1):82–93.
88. Yu C, Hu ZQ, Peng RY. Effects and mechanisms of a microcurrent dressing on skin wound healing: a review. *Mil Med Res.* 2014; 1:24.
89. S. Satyro, R. Marotta, L. Clarizia, I. Di Somma, G. Vitiello, M. Dezotti, G. Pinto, R.F. Dantas, R. Andreozzi, Removal of EDDS and copper from waters by TiO₂ photocatalysis under simulated UV–solar conditions, *Chem. Eng. J.* 251 (2014) 257–268.
90. M.A. Henderson, A surface science perspective on TiO₂ photocatalysis, *Surf. Sci. Rep.* 66 (2011) 185–297.
91. M. Pelaez, N.T. Nolan, S.C. Pillai, M.K. Seery, P. Falaras, A.G. Kontos, P.S.M. Dunlop, J.W.J. Hamilton, J.A. Byrne, K. O'Shea, M.H. Entezari, D.D. Dionysiou, A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications, *Appl. Catal. B Environ.* 125 (2012) 331–349.
92. P. Meredith, T. Sarna, The physical and chemical properties of eumelanin, *Pigment Cell Res.* 19 (2006) 572–594.
93. G. Prota, *Melanins and Melanogenesis*, Academic Press, San Diego, CA, 1992.

94. J. J. Nordlund, R. E. Boissy, V. J. Hearing, R. A. King, W. S. Oetting and J. P. Ortonne, *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*, Blackwell Publishing, Malden, MA, 2006, vol. 2.
95. J. D. Nosanchuk, A. L. Rosas and A. Casadevall, *J. Immunol.*, 1998, 160, 6026–6031.
96. N. Avramidis, A. Kourounakis, L. Hadjipetrou and V. Senchuk, *Arzneim. Forsch.*, 1998, 48, 764–771.
97. P. Meredith and J. Riesz, *Photochem. Photobiol.*, 2004, 79, 211–216.
98. J. A. Mackintosh, *J. Theor. Biol.*, 2001, 211, 101–113.
99. P. Zhao, J. Li, Y. Wang and H. Jiang, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, 37, 952–959.
100. M. D'Ischia, K. Wakamatsu, A. Napolitano, S. Briganti, J. C. Garcia-Borron, D. Kovacs, P. Meredith, A. Pezzella, M. Picardo, T. Sarna and J. D. I. Simon, *Pigm. Cell Melanoma Res.*, 2013, 26, 616–633.
101. G. Vitiello, A. Pezzella, A. Zanfardino, M. Varcamonti, B. Silvestri, A. Costantini, F. Branda and G. Luciani, *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 2808–2815.
102. G. Vitiello, A. Pezzella, V. Calcagno, B. Silvestri, L. Raiola, G. D'Errico, A. Costantini, F. Branda and G. Luciani, *J. Phys. Chem. C*, 2016, 120, 6262–6268.
103. G. Vitiello, A. Pezzella, A. Zanfardino, B. Silvestri, P. Giudicianni, A. Costantini, F. Branda and G. Luciani, *Mater. Sci. Eng., C*, 2017, 75, 454–462.
104. H. Liu, X. Qu, E. Kim, M. Lei, K. Dai, X. Tan, M. Xu, J. Li, Y. Liu, X. Shi, P. Li, G. F. Payn and C. Liu, *Biomaterials*, 2018, 162, 109–122.
105. H. L. Su, C. C. Chou, D. J. Hung, S. H. Lin, I. C. Pao, J. H. Lin, F. L. Huang, R. X. Dong and J. J. Lin, *Biomaterials*, 2009, 30, 5979–5987.
106. H. Van Acker and T. Coenye, *Trends Microbiol.*, 2017, 25, 456–466.
107. A. Keirouz, M. Chung, J. Kwon, G. Fortunato, N. Radacsi, 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. (2020) 1–32. <https://doi.org/10.1002/wnan.1626>.
108. N. Thadavirul, P. Pavasant, P. Supaphol, Fabrication and Evaluation of Polycaprolactone–Poly(hydroxybutyrate) or Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Dual-Leached Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications, *Macromol. Mater. Eng.* 302 (2017) 1–17.
109. F. De Cesare, F. Pietrini, M. Zacchini, G.S. Mugnozza, A. Macagnano, Catechol-loading nanofibrous membranes for eco-friendly iron nutrition of plants, *Nanomaterials*. 9 (2019) 1–20. <https://doi.org/10.3390/nano9091315>.
110. S. Ravichandran, J. Radhakrishnan, P. Jayabal, G.D. Venkatasubbu, Antibacterial screening studies of electrospun Polycaprolactone nano fibrous mat containing Clerodendrum phlomidis leaves extract, *Appl. Surf. Sci.* 484 (2019) 676–687.
111. P. Sawadkar, J. Mohanakrishnan, P. Rajasekar, B. Rahmani, N. Kohli, L. Bozec, E. García-Gareta, A Synergistic Relationship between Polycaprolactone and Natural Polymers Enhances the Physical Properties and Biological Activity of Scaffolds, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 12 (2020) 13587–13597. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19715>.
112. K. Ghosal, C. Agatemor, Z. Špitálsky, S. Thomas, E. Kny, Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites, *Chem. Eng. J.* 358 (2019) 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.117>.
113. F. De Cesare, E. Di Mattia, E. Zussman, A. Macagnano, A study on the dependence of bacteria adhesion on the polymer nanofibre diameter, *Environ. Sci. Nano*. 6 (2019) 778–797.

114. F. De Cesare, E. Di Mattia, E. Zussman, A. Macagnano, A 3D Soil-Like Nanostructured Fabric For The Development Of Bacterial Biofilms For Agricultural And Environmental Uses, *Environ. Sci. Nano.* (2020).
115. M. Zare-Gachi, H. Daemi, J. Mohammadi, P. Baei, F. Bazgir, S. Hosseini-Salekdeh, H. Baharvand, Improving anti-hemolytic, antibacterial and wound healing properties of alginate fibrous wound dressings by exchanging counter-cation for infected full-thickness skin wounds, *Mater. Sci. Eng. C.* 107 (2020) 110321.
116. Yang, J.; Webb, A.R.; Ameer, G.A. Novel Citric Acid-Based Biodegradable Elastomers for Tissue Engineering. *Adv. Mater.* 2004, 16, 511–516. [CrossRef]
117. Su, L.-C.; Xie, Z.; Zhang, Y.; Nguyen, K.T.; Yang, J. Study on the Antimicrobial Properties of Citrate-Based Biodegradable Polymers. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2014, 2, 23.
118. R. Edge, *Pigm. Cell Res.*, 2006, 19, 443–450.
119. B. Jiang, H. Yin and T. Jiang, *Mater. Chem. Phys.*, 2006, 98, 231–235.
120. A. Pezzella, L. Capelli, A. Costantini, G. Luciani, F. Tescione, B. Silvestri, G. Vitiello and F. Branda, *Mater. Sci. Eng., C*, 2013, 33, 347–355.
121. G. Oskam, A. Nellore, R. Lee Penn and P. C. Searson, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 1734–1738.
122. A. Pezzella, D. Vogna, G. Prota, Atropoisomeric melanin intermediates by oxidation of the melanogenic precursor 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid under biomimetic conditions, *Tetrahedron* 58 (2002) 3681–3687.
123. A. Pezzella, M. D'Ischia, A. Napolitano, A. Palumbo, G. Prota. *Tetrahedron* 53, 8281 (1997).
124. A. B. Muñoz-García, F. Sannino, G. Vitiello, D. Pirozzi, L. Minieri, A. Aronne, P. Pernice, M. Pavone, G. D'Errico. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 21662 (2015).
125. J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini-Sarmadi and S. P. Wolff, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 17–21.
126. A. Zanfardino, O. F. Restaino, E. Notomista, D. Cimini, C. Schiraldi, M. De Rosa, M. De Felice, M. Varcamonti. *Microb. Cell Fact.* 9, 34 (2010).
127. A. Zanfardino, A. Bosso, G. Gallo, V. Pistorio, M. Di Napoli, R. Gaglione, E. Dell'Olmo, M. Varcamonti, E. Notomista, A. Arciello, E. Pizzo. *J. Pept. Sci.* 24, 3095 (2018).
128. S. N. Kharat, V. D. Mendhulkar. *Mater. Sci. Eng. C* 62, 719 (2016).
129. P. Di Donato, V. Taurisano, G. Tommonaro, V. Pasquale, J. Silván Jiménez, S. de Pascual-Teresa, A. Poli, B. Nicolaus. *Waste Biomass Valori.* 9, 1567 (2018).
130. M. D. Seo, T. J. Kang, C. H. Lee, A. Y. Lee and M. Noh, *Biomol. Ther.*, 2012, 20, 171–176.
131. A. Napolitano, A. Pezzella, New pyrrole acids by oxidative degradation of eumelanins with hydrogen peroxide. Further hints to the mechanism of pigment breakdown, *Tetrahedron* 52 (1996) 8775–8780.
132. L. Panzella, G. Gentile, G. D'Errico, N.F. Della Vecchia, M.E. Errico, A. Napolitano, C. Carfagna, M. d'Ischia, Atypical structural and π -electron features of a melanin polymer that lead to superior free-radical-scavenging properties, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 12684–12687.
133. N.F. Della Vecchia, A. Luchini, A. Napolitano, G. D'Errico, G. Vitiello, N. Szekely, M. D'Ischia, L. Paduano, Tris buffer modulates polydopamine growth, aggregation, and paramagnetic properties, *Langmuir* 30 (2014) 9811–9818.
134. Z. Wang, W. Ma, C. Chen, H. Ji and J. Zhao, *Chem. Eng. J.*, 2011, 170, 353–362.
135. D. Spasiano, R. Marotta, I. Gargano, I. Di Somma, G. Vitiello, G. D'Errico and R. Andreozzi, *Chem. Eng. J.*, 2014, 249, 130–142.
136. G. D'Errico, A. Silipo, G. Mangiapia, A. Molinaro, L. Paduano and R. Lanzetta, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, 2314–2322.

137. G. D'Errico, A. Silipo, G. Mangiapia, G. Vitiello, A. Radulescu, A. Molinaro, R. Lanzetta and L. Paduano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 13574–13585.
138. C.J. Angamma, S.H. Jayaram, Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology, *IEEE Trans. Ind. Appl.* 47 (2011) 1109–1117.
139. P. Mistry, R. Chhabra, S. Muke, S. Sathaye, R. Jain, P. Dandekar, Fabrication and characterization of starch-TPU based nanofibers for wound healing applications, *Mater. Sci. Eng. C.* (2020) 111316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111316>.
140. S. Rajendran, *Advanced textiles for wound care*, 2018.
141. Z. Fan, P. Cheng, G. Yin, Z. Wang, J. Han, In situ forming oxidized salectan/gelatin injectable hydrogels for vancomycin delivery and 3D cell culture, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 31 (2020) 762–780. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1717739>.
142. L. Wu, H. Li, S. Li, X. Li, X. Yuan, X. Li, Y. Zhang, Composite fibrous membranes of PLGA and chitosan prepared by coelectrospinning and coaxial electrospinning, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 92 (2010) 563–574. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32393>.
143. D. Mondal, M. Griffith, S.S. Venkatraman, Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 65 (2016) 255–265. <https://doi.org/10.1080/00914037.2015.1103241>.
144. J. He, Y. Liang, M. Shi, B. Guo, Anti-oxidant electroactive and antibacterial nanofibrous wound dressings based on poly(ϵ -caprolactone) /quaternized chitosan-graft-polyaniline for full-thickness skin wound healing, *Chem. Eng. J.* 385 (2020) 123464.
145. A.A. Shitole, P. Raut, P. Giram, P. Rade, A. Khandwekar, B. Garnaik, N. Sharma, Poly (vinylpyrrolidone)- iodine engineered poly (ϵ -caprolactone) nanofibers as potential wound dressing materials, *Mater. Sci. Eng. C.* 110 (2020) 110731.
146. G. Vitiello, A. Zanfardino, O. Tammara, M. Di Napoli, M.F. Caso, A. Pezzella, M. Varcamonti, B. Silvestri, G. D'Errico, A. Costantini, G. Luciani, Bioinspired hybrid eumelanin-TiO₂ antimicrobial nanostructures: the key role of organo-inorganic frameworks in tuning eumelanin's biocide action mechanism through membrane interaction, *RSC Adv.* 8 (2018) 28275–28283. <https://doi.org/10.1039/c8ra04315a>.
147. G. Vitiello, P. Melone, B. Silvestri, A. Pezzella, P. Di Donato, G. D'Errico, M. Di Napoli, A. Zanfardino, M. Varcamonti, G. Luciani, Titanium based complexes with melanin precursors as a tool for directing melanogenic pathways, *Pure Appl. Chem.* (2019).
148. G. Vitiello, A. Zanfardino, O. Tammara, M. Di Napoli, M. F. Caso, A. Pezzella, M. Varcamonti, B. Silvestri, G. D'Errico, A. Costantini, G. Luciani. *RSC Adv.* 8, 28275 (2018).
149. L. Najder-Kozdrowska, B. Pilawa, E. Buszman, D. Wrześniok, A. B. Więckowski. *Spectroscopy* 25, 197 (2011).
150. M. Zdybel, E. Chodurek, B. Pilawa. *Appl. Magn. Res.* 40, 113 (2011).
151. L. Panzella, G. D'Errico, G. Vitiello, M. Perfetti, M. L. Alfieri, A. Napolitano, M. D'Ischia. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 9426 (2018).
152. K. M. Reddy, S. V. Manorama, A. R. Reddy. *Mater. Chem. Phys.* 78, 239 (2002).
153. M. Dai, T. Huang, L. Chao, Y. Tan, C. Chen, W. Mengb, Q. Xie. *RSC Adv.* 6, 17016 (2016).
154. Z. Guo, K. Ni, D. Wei, Y. Ren. *RSC Adv.* 5, 37377 (2015).
155. S. Mansoor. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 2, 640 (2010).
156. T. J. Park, J. S. Kim, T. K. Kim, H. M. Park, S. S. Choi, Y. Kim. *Bull. Korean Chem. Soc.* 29, 2459 (2008).
157. L. Korosi, D. Domotor, S. Beke, M. Prato, A. Scarpellini, K. Meczker, G. Schneider, T. Kovacs, A. Kovacs, S. Papp, Antibacterial activity of nanocrystalline TiO₂ (B) on multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strains, *Sci. Adv. Mater.* 5 (2013) 1184–119

158. B.B. Adhyaru, N.G. Akhmedov, A.R. Katritzky, C.R. Bowers, Solid-state cross-polarization magic angle spinning ¹³C and ¹⁵N NMR characterization of Sepia melanin, Sepia melanin free acid and Human hair melanin in comparison with several model compounds, Magn. Reson. Chem. 41 (2003) 466–474.
159. A. Orłowski, M. Grzybek, A. Bunker, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, P. T. M'annist'ö and T. R'og, J. Neurochem., 2012, 122, 681–690.

Bibliografia Capitolo 2

1. Gajendiran A, Krishnamoorthy S, Abraham J (2016) Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. 3 Biotech 6:52. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0394-x>
2. Byuntae L, Anthony LP, Alfred F, Theodore BB (1991) Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerocheate* and *Streptomyces* species. Appl Environ Microbiol 57:678–688
3. Balasubramanian V, Natarajan K, Hemambika B, Ramesh N, Sumathi CS, Kottaimuthu R, Rajesh Kannan V (2010) High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. Lett Appl Microbiol 51:205–211. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02883.x>
4. Klyosov A (2007) Wood-plastic composites. Wiley, Hoboken
5. Usha R, Sangeetha T, Palaniswamy M (2011) Screening of polyethylene degrading microorganisms from garbage soil. Libyan Agric Res Cent J Int 2:200–204
6. Khanam PN, AlMaadeed MAA (2015) Processing and characterization of polyethylene-based composites. Adv Manuf Polym Compos Sci 1:63–79. <https://doi.org/10.1179/2055035915y.0000000002>
7. Ojha N, Pradhan N, Singh S, Barla A, Shrivastava A, Khatua P, Rai V (2017) Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. Sci Rep 7:39515. <https://doi.org/10.1038/srep39515>
8. Pramila R, Ramesh KV (2011a) Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water—a SEM analysis. Afr J Microbiol Res 5:5013–5018. <https://doi.org/10.5897/AJMR11670>
9. Konduri MKR, Bogolu VR (2014) Comparative degradation of LDPE, HDPE and HMHDPE under different soil conditions. Life science global. J Res Updates Polym Sci 3:178–183
10. Muthukumar A, Veerappapillai S (2015) Biodegradation of plastics: a brief review. Int J Pharm Sci Rev Res 31:204–209
11. Arutchelvi J, Sudhakar M, Arkatkar A, Doble M, Bhaduri S (2008) Biodegradation of polyethylene and polypropylene. Indian J Biotechnol 7:9–22
12. Sen SK, Raut S (2015) Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): a review. J Environ Chem Eng 3:462–473. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>
13. Kamal MR, Huang B (1992) Natural and artificial weathering of polymers. In: Hamid SH, Ami MB, Maadhan AG Handbook of polymer degradation. Marcel Dekker, New York, p 127–168
14. Tokiwa Y, Calabia B, Ugwu C, Aiba S (2009) Biodegradability of plastics. Int J Mol Sci 10:3722. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>

15. Arkatkar A, Juwarkar AA, Bhaduri S, Uppara PV, Doble M (2010) Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface. *Int Biodeterior Biodegrad* 64:530–536. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.002>
16. Minh LD, Chinh NT, Giang LD, Le TC, Quyen DTK, Hoang T (2018) Prediction of service half-life time of high density polyethylene/ organo-modified calcium carbonate composite exposed naturally at Dong Hoi-Quang Binh. *Vietnam J Chem* 56:767–772. <https://doi.org/10.1002/vjch.201800085>
17. Trivedi P, Hasan A, Akhtar S, Siddiqui MH, Sayeed U, Khan MKA (2016) Role of microbes in degradation of synthetic plastics and manufacture of bioplastics. *J Chem Pharm Res* 8:211–216
18. Sowmya HV, Ramalingappa B, Nayanashree G, Thippeswamy B, Krishnappa M (2015) Polyethylene degradation by fungal consortium. *Int J Environ Res* 9:823–830. <https://doi.org/10.22059/IJER.2015.969>
19. Chandra R, Rustgi R (1997) Biodegradation of maleated linear lowdensity polyethylene and starch blends. *Polym Degrad Stab* 56:185–202. [doi.org/10.1016/S0141-3910\(96\)00212-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(96)00212-1)
20. Kumar S, Panda AK, Singha RK (2011) A review on tertiary recycling of high-density polyethylene to fuel. *Resour Conserv Recy* 55:893–910. doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.05.005
21. Revie RW (2000) *Uhlig corrosion handbook*, 2nd edn. New York, Wiley
22. Sangale MK, Shahnawaz M, Ade AB (2012a) A review on biodegradation of polythene: the microbial approach. *J Bioremediat Biodegrad* 3:1–9. [//doi.org/10.4172/2155-6199.1000164](https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000164)
23. Sangale MK, Shahnawaz M, Ade AB (2012b) A review on biodegradation of polythene: the microbial approach. *J Bioremediat Biodegrad* 3:164. doi.org/10.4172/2155-6199.1000164
24. Albertsson AC, Andersson SO, Karlsson S (1987) The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polym Degrad Stab* 18:73–87. [https://doi.org/10.1016/01413910\(87\)90084-X](https://doi.org/10.1016/01413910(87)90084-X)
25. Mukherjee S, RoyChaudhuri U, Kundu PP (2018) Biodegradation of polyethylene via complete solubilization by the action of *Pseudomonas fluorescens*, biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* and anionic surfactant. *J Chem Technol Biotechnol* 93:1300–1311. <https://doi.org/10.1002/jctb.548>
26. Fontanella S, Bonhomme S, Koutny M, Husarova L, Brusson J-M, Courdavault J-P, Pitteri S, Samuel G, Pichon G, Lemaire J, Delort A-M (2010) Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polym Degrad Stab* 95:1011–1021. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegrastab.2010.03.009>
27. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K (2014) Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res Int* 2014:761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
28. Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008b) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol Adv* 26:246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
29. Vasile C (1993) Degradation and decomposition. In: *Handbook of polyolefins synthesis and properties*. Marcel Dekker Inc, New York, p 479–506. <https://doi.org/10.1002/adma.19950070320>
30. Gnanavel G, Marimuthu T, Mohana Jeya Valli MJV (2016) Biodegradation of oxo polyethylene: an approach using soil compost degraders. *Int J Adv Sci Eng Inf Technol* 7:140–144
31. Vroman I, Tighzert L (2009) Biodegradable polymers. *Materials* 2:307–344. <https://doi.org/10.3390/ma2020307>

32. European Bioplastic (2018) Bioplastics market data: global production capacities of bioplastics 2018–2023. Report. https://www.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2016/02/Report_Bioplastics-Market-Data_2018.pdf. Accessed 18 Nov 2019
33. Mohan SK, Suresh B (2015) Studies on biodegradation of plastics by *Aspergillus* sp. isolated from dye effluent enriched soil. *Indo Am J Pharm Sci* 2:12
34. Michael Gould J, Gordon SH, Dexter LB, Swanson CL (1990) Biodegradation of starch-containing plastics. *Agric Synth Polym* 7:65–75
35. Singh B, Sharma N (2008) Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym Degrad Stab* 93:561–584. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>
36. Fuhs GW (1961) Der mikrobielle Abbau von Kohlenwasserstoffen. *Arch Mikrobiol* 39:374–422
37. Rutkowska M, Heimowska A, Krasowska K, Janik H (2002) Biodegradability of polyethylene starch blends in sea water. *Pol J Environ Stud* 11:267–274
38. Kale SK, Deshmukh AG, Dudhare MS, Patil VB (2015) Microbial degradation of plastic: a review. *J Biochem Technol* 6:952–961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071720>
39. Pathak VM, Navneet (2017) Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresour Bioprocess* 4:15. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>
40. Bardaji DKR, Furlan JPR, Stehling EG (2019) Isolation of a polyethylene degrading *Paenibacillus* sp. from a landfill in Brazil. *Arch Microbiol* 201:699–704. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01637-9>
41. Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson MR (2014) Microbial degradation and deterioration of polyethylene: a review. *Int Biodeterior Biodegrad* 88:83–89. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>
42. Anwar MS, Negi H, Zaidi MGH, Gupta S, Goel R (2013) Biodeterioration studies of thermoplastics in nature using indigenous bacterial consortia. *Braz Arch Biol Technol* 56:475–484. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300016>
43. Skariyachan S, Manjunatha V, Sultana S, Jois C, Bai V, Vasist K (2016) Novel bacterial consortia isolated from plastic garbage processing areas demonstrated enhanced degradation for low density polyethylene. *Environ Sci Pollut Res* 23:18307. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7000-y>
44. Ben Said S, Or D (2017) Synthetic microbial ecology: engineering habitats for modular consortia. *Front Microbiol* 8:1125. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01125>
45. Roy PK, Titus S, Surekha P, Tulsii E, Deshmukh C, Rajagopal C (2008) Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polym Degrad Stab* 93:1917–1922. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.07.016>
46. Gnanavel GVP, Valli MJ, Thirumarimurugan M (2012) A review of biodegradation of plastics waste. *Int J Pharm Chem Sci* 1:670–673. <https://doi.org/10.1080/07388550500346359>
47. Orr II, Hadar Y, Sivan A (2004) Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:97–104. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1584-8>
48. Tribedi P, Sil AK (2013) Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. *Environ Sci Pollut Res Int* 20:4146–4153. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1378-y>
49. Yoon MG, Jeon HJ, Kim MN (2012) Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and alkB cloned recombinant cell. *J Bioremediat Biodegrad* 3:145. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000145>
50. Sharma HD, Reddy KR (2004) *Geoenvironmental engineering*. Wiley, Hoboken

51. Nowak B, Pajak J, Drozd-Bratkowicz M, Rymarz G (2011) Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:757–767. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.007>
52. Satlewal A, Soni R, Zaidi M, Shouche Y, Goel R (2008) Comparative biodegradation of HDPE and LDPE using an indigenously developed microbial consortium. *J Microbiol Biotechnol* 18:477–482
53. Jeon HJ, Kim MN (2013) Isolation of a thermophilic bacterium capable of low-molecular-weight polyethylene degradation. *Biodegradation* 24:89–98. doi.org/10.1007/s10532-012-9560-y
54. Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, Toyohara K, Miyamoto K, Kimura Y, Oda K (2016) A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science* 351:1196–1199. <https://doi.org/10.1126/science.1256359>
55. Koutny M, Amato P, Muchova M, Ruzicka J, Delort A-M (2009) Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives. *Int Biodeterior Biodegrad* 63:354–357. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.11.003>
56. Priyanka N, Archana T (2011) Biodegradability of polythene and plastic by the help of microorganism: a way for brighter future. *J Environ Anal Toxicol* 1:111. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000111>
57. Kathiresan K (2003) Polythene and plastic degrading microbes from mangrove soil. *Rev Biol Trop* 51:629–633
58. Singh G, Singh KA, Bhatt K (2016) Biodegradation of polyethenes by bacteria isolated from soil. *Int J Res Dev Pharm Life Sci* 5:2056–2062°
59. Sivan A, Szanto M, Pavlov V (2006) Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:346–352. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0259-4>
60. Santo M, Weitsman R, Sivan A (2012) The role of the copper-binding enzyme—laccase—in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *Int Biodeterior Biodegrad* 208:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.001>
61. Pramila R, Ramesh KV (2011b) Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from municipal landfill area. *J Microbiol Biotechnol Res* 1:131–136
62. Sowmya HV, Ramalingappa M, Krishnappa M (2012) Degradation of polyethylene by *Chaetomium* sp. and *Aspergillus flavus*. *Int J Recent Sci Res* 3:513–517
63. Jung HW, Yang MK, Su RC (2018) Purification, characterization, and gene cloning of an *Aspergillus fumigatus* polyhydroxybutyrate depolymerase used for degradation of polyhydroxybutyrate, polyethylene succinate, and polybutylene succinate. *Polym Degrad Stab* 154:186–194. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.06.002>
64. Karlsson S, Ljungquist O, Albertsson A (1988) Biodegradation of polyethylene and the influence of surfactants. *Polym Degrad Stab* 21:237–250
65. Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y, Saiganji A, Tania Y (2001) Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polym Degrad Stab* 72:323–327. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00027-1)
66. Manzur A, Limón-González M, Favela-Torres E (2004) Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi. *J Appl Polym Sci* 92:265–271. <https://doi.org/10.1002/app.13644>
67. Masó M, Garcés E, Pagès F, Camp J (2003) Drifting plastic debris as a potential vector for harmful algal bloom (HAB) species. *Sci Mar* 67:107–111. <https://doi.org/10.3989/scimar.2003.67n1107>

68. Sowmya HV, Ramalingappa B, Krishnappa M, Thippeswamy B (2014) Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR and NMR analyses. *Environ Monit Assess* 186:6577–6586. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3875-6>
69. Ehara K, Iiyoshi Y, Nishida YTT (2000) Polyethylene degradation by manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *J Wood Sci* 46:180–183. <https://doi.org/10.1007/BF00777369>
70. Thurston CF (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19–26
71. Desai SS, Nityanand C (2011) Microbial laccases and their application. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci* 3:98–124. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.98.124>
72. Hilden L, Johansson G, Pettersson G, Li J, Ljungquist P, Henrikson G (2000) Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? *FEBS Lett* 477:79–83. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01757-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01757-9)
73. Gold MH, Youngs HL, Sollewijn Gelpke MD (2000) Manganese peroxidase. In: Sigel A, Sigel H (eds) *Metal ions in biological systems*. Marcel Dekker, New York, p 559–586
74. de Oliveira PL, Duarte MCT, Ponezi AN, Durrant LR (2009) Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. *Braz J Microbiol* 40:818–826. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400012>
75. Lenz RW (1993) Biodegradable polymers. In: Langer RS, Peppas NA (eds) *Biopolymers I*, vol 107. Springer, Berlin, p 1–40
76. Shah AA, Hasan F, Akhter JI, Hameed A, Ahmed S (2008a) Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil. *Ann Microbiol* 58:381. <https://doi.org/10.1007/BF03175532>
77. Wilkes RA, Aristilde L (2017) Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *J Appl Microbiol* 123:582–593. <https://doi.org/10.1111/jam.13472>
78. Ruiz C, Main T, Hilliard NP, Howard GT (1999) Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeterior Biodegrad* 43:43–47
79. Novotný C, Erbanová P, Sezimová H, Malachová K, Rybková Z, Malinová L, Prokopová I, Brozek J (2015) Biodegradation of aromatic-aliphatic copolyesters and polyesteramides by esterase activity-producing microorganisms. *Int Biodeterior Biodegrad* 97:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.10.010>
80. Mohan AJ, Sekhar VC, Bhaskar T, Nampoothiri KM (2016) Microbial assisted shigh impact polystyrene (HIPS) degradation. *Bioresour Technol* 213:204–207. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.021>
81. Devi RS, Kannan VR, Natarajan K, Nivas D, Kannan K, Chandru S, Antony AR (2016) The role of microbes in plastic degradation. In: Chandra R (ed) *Environmental Waste Management*. CRC Press, United States, pp 341–370
82. Krupp LR, Jewell WJ (1992). Biodegradability of modified plastic films in controlled biological environments. *Environ. Technol.* 26: 193-198. <https://doi.org/10.1021/es00025a024>.
83. Albertsson AC, Barenstedt C, Karlsson S (1994). Degradation of enhanced environmentally degradable polyethylene in biological aqueous media: mechanisms during the first stages. *J. Appl. Polym. Sci.* 51: 1097-1105. <https://doi.org/10.1002/app.1994.070510616>.
84. Bikiaris D, Aburto J, Alric I, Borredon E, Botev M, Betchev C (1999). Mechanical properties and biodegradability of LDPE blends with fatty-acid esters of amylose and starch. *J. Appl. Polymer Sci.*, 71: 1089–7100. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990214\)71:7<1089::AID-APP7>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990214)71:7<1089::AID-APP7>3.0.CO;2-I)

85. Bombelli P, Howe CJ, Bertocchini F. 2017 Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Curr. Biol.* 27, 292–293. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.060>.
86. Kwadha CA, Ong'amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT. 2017 The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects* 8, 61. <https://doi.org/10.3390/insects8020061>.
87. Dadd RH. 1966 Beeswax in the nutrition of the wax moth, *Galleria mellonella* (L.). *J. Insect Physiol.* 12, 1479–1492. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(66\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(66)90038-2).
88. Kong HG et al. 2019 The *Galleria mellonella* hologenome supports microbiota-independent metabolism of long-chain hydrocarbon beeswax. *Cell Rep.* 26, 2451–2464. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.018>.
89. Watanabe T (2002) Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. CRC PRESS. <https://doi.org/10.1201/9781420040821>
90. Nishida, H. e Tokiwa, Y. (1993). Distribution of poly (β - Hydroxybutyrate) and poly (ϵ -caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1, 227–233. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-2>.
91. Viswanath, B., Chandra, MS, Pallavi, H. e Reddy, BR (2008). Screening and assessment of laccase producing from different environmental samples. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1129–1133.
92. Coll PM, Abalos JMF, Villanueva JR, Santamaria R, Perez P (1993). Purification and characterization Phenoloxidase (Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2607-2613. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.8.2607-2613.1993>.
93. Rogalski J1, Wojtas-Wasilewska M, Apalovic R, Leonowicz A. Affinity chromatography as a rapid and convenient method for purification of fungal laccases. *Biotechnol Bioeng.* ; 37 (8): 770-7. <https://doi.org/10.1002/bit.260370812>.
94. Zanfardino, A.; Criscuolo, G.; Di Luccia, B.; Pizzo, E.; Ciavatta, ML; Notomista, E.; Carpentieri, A.; Pezzella, A.; Varcamonti, M. Identification of a new small bioactive peptide from *Lactobacillus gasseri* supernatant. *Benef. Microbes.* <https://doi.org/10.3920/BM2016.0098>.
95. Sedacca, M., 2017. Plastic-eating worms larvae that consume and degrade polyethylene could inspire new industrial tools. *Sci. Am.* 317, 21. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0817-21>
96. Yang, J., Yang, Y., Wu, WM, Zhao, J., Jiang, L., 2014. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environ. Sci. Technol.* 48, 13776–13784. <https://doi.org/10.1021/es504038a>.
97. Yang, Y., Yang, J., Wu, WM, Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., Jiang, L., 2015. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 2. Role of gut microorganisms. *Environ Sci Technol* 49, 12087–12093. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02663>.
98. Merina Paul Das and Santosh Kumar. An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens* 3 *Biotech* (2015) 5:81–86 DOI 10.1007/s13205-014-0205-1
99. Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S., 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol Adv* 26: 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>.
100. Gulmine, J. V., Janissek, P. R., Heise, H. M., & Akcelrud, L. (2002). Polyethylene characterization by FTIR. *Polymer testing*, 21(5), 557-563. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00124-6).

101. Aksoy, C., & Severcan, F. (2012). Role of vibrational spectroscopy in stem cell research. *Spectroscopy: An International Journal*, 27. <https://doi.org/10.1155/2012/513286>.
102. Ola M. Gomaa, Osama A. Momtaz (2015). Copper induction and differential expression of laccase in *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 1, 285-292 (2015) ISSN 1678-4405. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246120120118>
103. Vijaykumar M. Halaburgia, Sujata Sharmab, M. Sinhab, Tej P. Singhb, Timmanagouda B. Karegoudara. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry* 46 ; 1146–1152. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.002>.
104. Nur Aina Adlan, Suriana Sabri, Malihe Masomian, Mohd Shukuri Mohamad Ali and Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman. Biodegradation of Paraffin Wax in Malaysian Crude Oil Mediated by Degradative Enzymes *Front. Microbiol.*, 08 September 2020 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.565608> Microbial
105. Downs, C.T., van Dyk, R.J., and Iji, P. (2002). Wax digestion by the lesser honeyguide *Indicator minor*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133, 125–134.
106. Gary, J.B., Arthur, J.C., and Stephen, R. (1980). Biosynthesis of wax in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Insect Biochem.* 10, 313–321.
107. Tulloch, A.P. (1980). Beeswax-composition and analysis. *Bee World* 61, 47–62.
108. Junqing Zhang, Danling Gao, Quanhao Li, Yixuan Zhao, Li Li, Hanfeng Lin, Qirui Bi, Yucheng Zhao. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of The Total Environment* Volume 704, 135931. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135931>.
109. Sangale MK, Shahnawaz M, Ade AB. A Review on Biodegradation of Polyethylene : The Microbial Approach. *Bioremediation & Biodegradation*, 2012; 3: <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000164>
110. Benson, A.A., Patton, J.S., and Field, C.E. (1975). Wax digestion in a Crown-of-Thorns starfish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 52, 339–340.
111. Khan, S., et al., Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution* <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>.
112. P. Frey-Klett, P. Burlinson, A. Deveau, M. Barret, M. Tarkka, and A. Sarniguet Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Dec; 75(4): 583–609. doi: 10.1128/MMBR.00020-11