

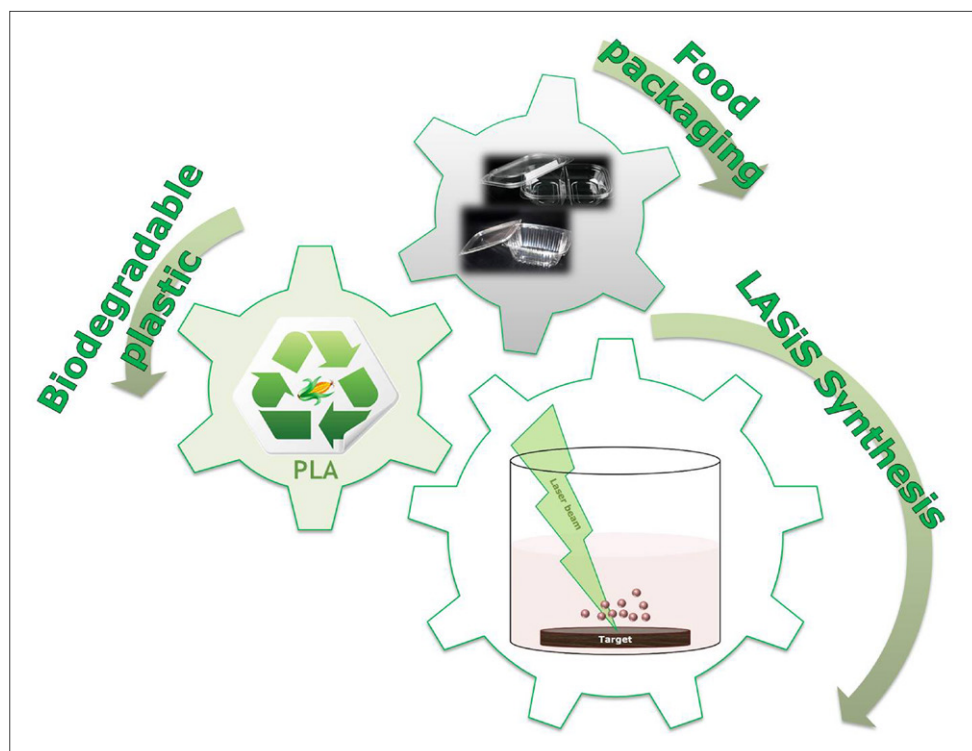


MARIA CHIARA SPORTELLI<sup>1,2</sup>, ANNALISA VOLPE<sup>1,3</sup>, ROSARIA ANNA PICCA<sup>2</sup>, ANTONIO ANCONA<sup>1</sup>, PIETRO MARIO LUGARÀ<sup>1,3</sup>, AMALIA CONTE<sup>4</sup>, MATTEO ALESSANDRO DEL NOBILE<sup>4</sup>, NICOLA CIOFFI<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>ISTITUTO DI FOTONICA E NANOTECNOLOGIE, IFN-CNR, DIPARTIMENTO INTERATENEO DI FISICA "M. MERLIN", UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI "A. MORO"  
<sup>2</sup>DIPARTIMENTO DI CHIMICA, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI "A. MORO"  
<sup>3</sup>DIPARTIMENTO INTERATENEO DI FISICA "M. MERLIN", UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI "ALDO MORO"  
<sup>4</sup>DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, DEGLI ALIMENTI E DELL'AMBIENTE, UNIVERSITÀ DI FOGGIA  
ANTONIO.ANCONA@IFN.CNR.IT  
NICOLA.CIOFFI@UNIBA.IT

# PREPARAZIONE DI NANOANTIMICROBICI ATTRAVERSO LASER ABLATION IN LIQUIDO PER APPLICAZIONE IN IMBALLAGGI ALIMENTARI

*L'ablazione laser in liquido consente la preparazione di nanoparticelle antimicrobiche, che possono essere impiegate per la produzione di materiali compositi polimerici utili nel settore dell'imballaggio alimentare, per ridurre la contaminazione microbica.*

Il campo del *packaging* alimentare si sta notevolmente evolvendo a causa della necessità sempre crescente di limitare l'utilizzo di imballaggi plastici non biodegradabili; inoltre, lo sviluppo di un commercio alimentare diffuso a livello mondiale ha reso necessario il prolungamento della *shelf-life* degli alimenti, al fine di conservarne al meglio le proprietà organolettiche ed evitare la proliferazione di microrganismi pericolosi. Fondamentale per queste applicazioni è il contributo dato dalle nanotecnologie. Per migliorare la qualità degli imballaggi alimentari plastici, molti





studi hanno dimostrato l'efficacia dei processi di dispersione all'interno del *bulk* polimerico o sulla superficie del polimero, di nanoparticelle (NPs) a base di metalli [1]. Alcune ricerche [2, 3] hanno rivelato come la dispersione nell'imballaggio di NPs caratterizzate da una buona attività antimicrobica, riduca e rallenti il deterioramento degli alimenti. Il rame e l'argento sono tra i metalli maggiormente utilizzati nel campo dei nanoantimicrobici, grazie alla loro limitata tossicità ed alla loro bioattività ad ampio spettro [4]. Per la preparazione di NPs antimicrobiche a base di rame (CuNPs) ed argento (AgNPs) si può impiegare la tecnica dell'ablazione laser in liquido (*laser ablation synthesis in solution* - LASiS). Tale metodologia di sintesi presenta il vantaggio, rispetto ad altri metodi di preparazione, di consentire la produzione di colloidali in condizioni *green*, limitando l'ausilio di agenti chimici potenzialmente pericolosi. Nel 1993, Fojtik e collaboratori dimostrarono per la prima volta che l'ablazione laser di un target solido svolta in solventi acquosi od organici portava alla produzione di nanoparticelle del materiale ablato sotto forma di colloidali, e non come deposizione di film o *cluster* su un substrato [5]. Il numero di materiali che possono essere sottoposti a tale processo di ablazione è estremamente elevato; tra questi: metalli nobili, metalli di transizione, ossidi metallici, semiconduttori e materiali organici [6, 7]. Il metodo LASiS può essere applicato ad una combinazione target-liquido quasi illimitata. Inoltre l'utilizzo di impulsi laser cosiddetti "ultrabrevi", ovvero di durata dell'ordine dei pico/femtosecondi, invece di impulsi laser più lunghi del nanosecondo, consente una più efficiente frammentazione ed una minore alterazione della stechiometria delle nanoparticelle nella loro conversione dal materiale *bulk* [8].

Il processo LASiS al femtosecondo utilizzato in questo lavoro, già ottimizzato per la preparazione di CuNPs in ambiente acquoso e stabilizzate da chitosano (CS) [9], è stato recentemente modificato implementando un sistema in flusso che consenta al mezzo di ablazione di fluire in modo dinamico sul target. Questo apparato consente in primo luogo di migliorare la resa del processo di ablazione, riducendo i fenomeni di schermatura del fascio laser sul target indotti dalla presenza del colloidale appena formato. In secondo luogo, esso permette di limitare i processi di frammentazione post-sintesi indotti dal laser sulle NPs presenti in soluzione lun-

go il suo cammino ottico. Infine, i metodi di preparazione di nanocolloidali in flusso rappresentano di gran lunga la migliore soluzione per la produzione massiva di materiali che superi la scala di laboratorio per giungere sino a diversi grammi [10]. L'utilizzo di una soluzione quiescente può provocare un forte surriscaldamento locale, con conseguente evaporazione del solvente [11]; tale fenomeno risulta notevolmente abbattuto mediante l'impiego di una cella in flusso. Sulla base di tali presupposti, viene qui proposta una metodologia di sintesi di colloidali mono- e bi-componente a base di Cu, Ag e loro combinazioni; particolare interesse è stato rivolto alla caratterizzazione chimico-morfologica delle NPs prodotte in funzione dei parametri sperimentali. I colloidali antibatterici sono stati miscelati ad acido polilattico (PLA), per la preparazione di imballaggi alimentari compositi e multifunzionali. Appartenente alla famiglia dei poliesteri alifatici, il PLA è una tra le più valide alternative agli imballaggi plastici classici ora in uso [12]. L'acido polilattico, biodegradabile e poco costoso, non è tossico e rientra nel concetto di sviluppo sostenibile, essendo i suoi monomeri prodotti a partire dalla frammentazione di risorse rinnovabili [13, 14]. In linea di principio, la preparazione di un materiale composito Cu/AgNPs-PLA consentirebbe la preparazione di imballaggi altamente biodegradabili, ed in grado di esercitare un'azione antimicrobica ad ampio spettro, grazie all'azione sinergica di entrambi i metalli.

### Apparato per l'ablazione laser

Il setup strumentale utilizzato per la sintesi dei colloidali mono- e bi-componente, sfrutta come sorgente un sistema laser a fibra ottica drogata ad itterbio ad impulsi ultrabrevi prodotto dalla *Active Fiber System GmbH*. Tale sorgente risulta estremamente versatile poiché permette di variare in maniera continua la durata degli impulsi da 650 fs a 20 ps, l'energia degli impulsi fino ad un massimo di 100  $\mu$ J, la potenza media fino a 50 W e la frequenza di ripetizione da 50 KHz a 10 MHz. La  $\lambda$  fondamentale è 1030 nm, ma il sistema dispone anche di generatori di seconda e terza armonica.

Il fascio laser uscente attraversa una lamina a quarto d'onda, che converte la polarizzazione lineare del fascio laser uscente dalla sorgente in luce polarizzata circolarmente, consentendo un assorbimento omogeneo del fascio da parte del target. A questo

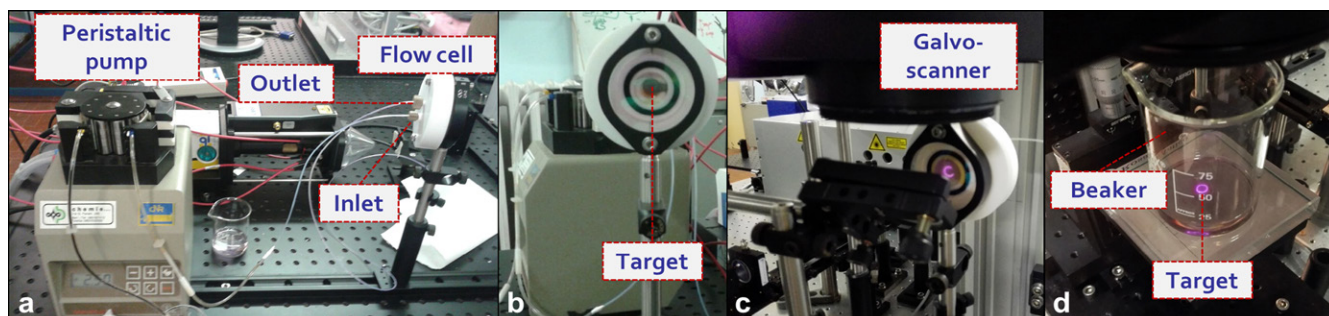


Fig. 1 - Immagini del sistema in flusso utilizzato per la produzione LASiS di Ag/CuNPs (a-c), e dell'apparato utilizzato per la sintesi in soluzione quiescente (d)

punto il fascio viene indirizzato verso uno *shutter* elettromeccanico, che ne permette il bloccaggio e consente di selezionare il tempo di esposizione del target alla radiazione laser. Successivamente il fascio passa attraverso un *beam expander*, composto da due lenti contigue che ne allargano le dimensioni prima di essere convogliato in un *galvo-scanner*, munito di lente telecentrica F-Theta con lunghezza focale di 10 cm. Il *galvo-scanner* consiste di due specchi galvometrici che, ruotando sincronamente, deviano il fascio facendogli percorrere qualsiasi tragitto, impostato tramite un apposito *software*, sul piano focale della lente F-Theta. Per la sintesi LASiS oggetto di questo lavoro, è stato programmato un set di cerchi concentrici sulla superficie del target, con diametro massimo 7 mm e distanziati di 100  $\mu\text{m}$ , percorsi dal fascio ad una velocità impostata di 300 mm/s. Lo *scanner* e lo *shutter* sono collegati ad un computer che permette di sincronizzare al movimento del fascio l'apertura-chiusura dello *shutter*. La sintesi è stata condotta utilizzando una potenza media del laser di 7 W, una frequenza di ripetizione degli impulsi di 100 KHz ed una durata di impulso pari a 650 fs. Il target è posto all'interno di una cella in flusso (*flow cell*), fissata su un supporto mobile (Fig. 1b-c), che permette di traslare la stessa sia lungo la direzione di propagazione del fascio incidente, che lungo la direzione ad essa perpendicolare. Tali traslazioni consentono la messa a fuoco del fascio di radiazione sul target, necessaria per ottenere la massima resa dal processo. La cella in teflon cilindrica (Fig. 1a-b) è chiusa da una finestra con *coating* antiriflesso a 1030 nm, attraverso la quale il fascio giunge sul target. Quest'ultimo viene posizionato alla base della cella su un apposito supporto dotato di linguetta frenante, per evitare che esso si muova con il fluire della soluzione e per gravità. La soluzione di

sintesi viene immessa nella cella e fatta fluire mediante una pompa peristaltica (*Gilson Minipuls 3*), ad una velocità di flusso pari a 1,5 mL/min (Fig. 1a). Per contro, la sintesi in soluzione quiescente prevede il solo posizionamento del target nel fondo di un becher riempito con la soluzione di interesse (Fig. 1d). Il recipiente è quindi posto su una base mobile (Fig. 1d), che consente l'allineamento e la messa a fuoco del fascio sul target.

### Preparazione e caratterizzazione di Cu/AgNPs

Per tutte le sintesi, sono stati utilizzati target ultra-puri di Cu e Ag (99,99%, Goodfellow Ltd.), di diametro pari ad 1 cm e spessore 1 mm. Prima di ogni sintesi, essi sono stati puliti mediante carta abrasiva. Diversi solventi sono stati utilizzati come mezzi di ablazione:

- soluzione acquosa di acido acetico (HAc) 0,1% con CS, alla concentrazione ottimale di 1 g/L [9, 15], in condizioni di flusso;
- acetone.

In quest'ultimo caso è stata preferita in una fase preliminare una condizione quiescente in modo da limitare la contaminazione del colloide da parte delle componenti plastiche del sistema in flusso. I colloidi multi-componente sono stati preparati utilizzando come mezzo di ablazione una soluzione colloidale di CuNPs o AgNPs precedentemente preparata mediante LASiS. Per semplicità di esposizione, verranno da qui in avanti indicati come AgCuNPs quei colloidi bi-componente preparati eseguendo prima l'ablazione di Ag, seguita da quella di Cu nel primo colloide; al contrario saranno nominate CuAgNPs le soluzioni colloidali ablate con ordine inverso dei due target. Le NPs appena preparate sono state caratterizzate morfologicamente mediante microscopia elettronica in trasmissione (TEM) e spettroscopia UV-Vis. Nel primo caso, le sospensioni



colloidali sono state depositate su opportune grigliette porta-campione in rame (Agar scientific, 300 mesh) ed analizzate mediante un microscopio FEI Tecnai Spirit, operante a 120 kV, con filamento  $\text{LaB}_6$ . Per la caratterizzazione spettroscopica è stato utilizzato uno spettrofotometro UV-Vis a doppio raggio (Shimadzu UV-1601). In Fig. 2 sono riportate alcune micrografie TEM ottenute sui colloidi bi-componente. I pannelli a-a' fanno riferimento ad AgCuNPs preparate in condizioni dinamiche, ed in soluzione acquosa acida contenente CS 1 g/L. Si osserva la presenza di una popolazione sferoidale piuttosto fine, monodispersa.

La presenza di strutture a diverso contrasto è, almeno in parte, attribuibile alla natura bi-componente del colloide. Le immagini TEM di Fig. 2b-b' mostrano invece che le CuAgNPs preparate nelle medesime condizioni risultano moderatamente polidisperse rispetto al primo caso, ma conservano una forma sferica regolare. Tale evidenza può essere spiegata considerando la presenza di effetti di schermatura del fascio laser durante l'ablazione del secondo metallo (Ag) e le difficoltà di focalizzazione del laser sul target, a causa del colore bruno tipico dei colloidi di Cu. È noto, infatti, che una messa a fuoco non corretta del laser sulla superficie del target può inficiare drasticamente il controllo morfologico delle nanostrutture in produzione [16]. Gli ultimi quattro pannelli (Fig. 2c-c' e 2d-d') di Fig. 2 si riferiscono alle sintesi effettuate in condizioni quiescenti ed in acetone. Si nota subito come l'assenza di uno stabilizzante si traduca in una maggiore aggregazione e polidispersione. Strutture sferoidali di diametro superiore ai 50 nm sono affiancate a NPs più piccole. Tali risultati confermano come l'introdu-

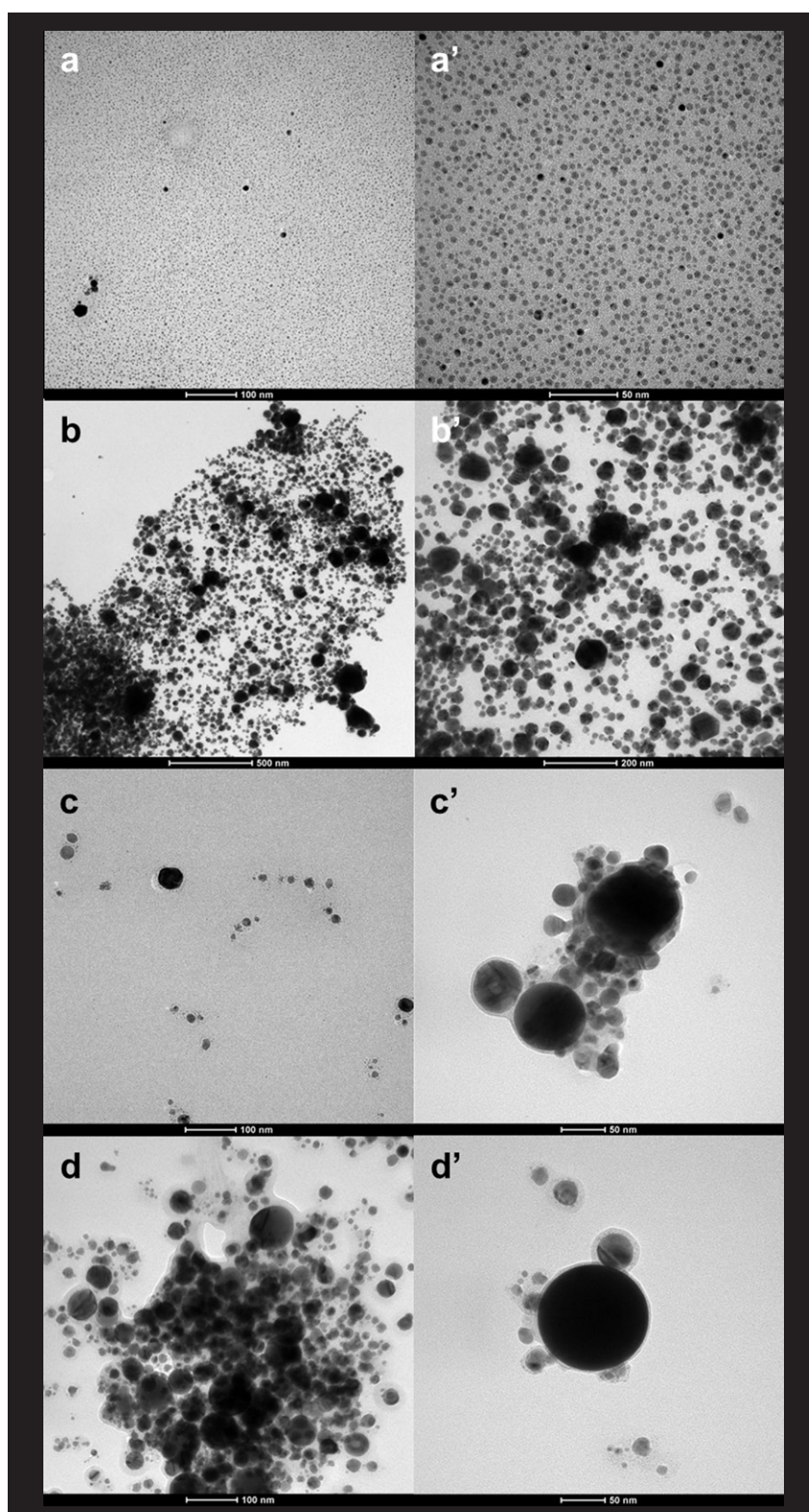


Fig. 2 - Micrografie TEM a diverso ingrandimento dei colloidi preparati mediante LASIS. AgCuNPs, preparate in cella in flusso con CS 1 g/L (a, a'); CuAgNPs, preparate in cella in flusso con CS 1 g/L (b, b'); AgCuNPs, preparate in soluzione quiescente di acetone (c, c'); CuAgNPs, preparate in soluzione quiescente di acetone (d, d')

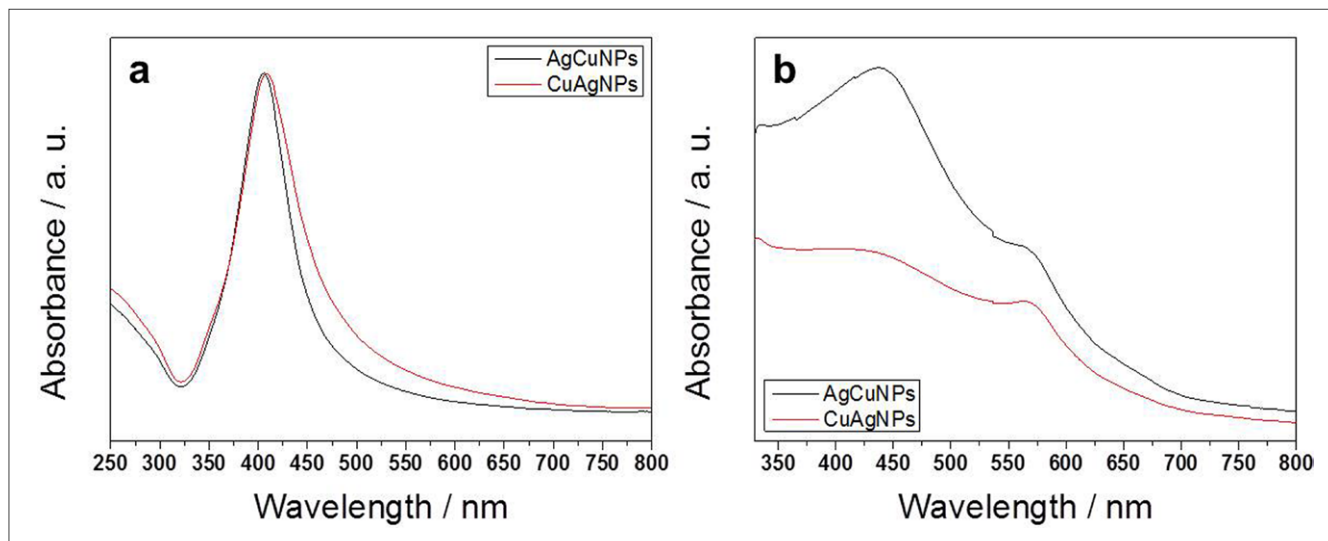


Fig. 3 - Spettri UV-Vis dei colloidi preparati mediante LASiS. AgCuNPs e CuAgNPs preparate in cella in flusso con CS 1 g/L (a); AgCuNPs e CuAgNPs preparate in soluzione quiescente di acetone (b)

zione di un apparato di sintesi in configurazione dinamica consente di migliorare notevolmente la qualità morfologica delle strutture prodotte. La caratterizzazione spettroscopica mediante UV-Vis dei medesimi colloidi è riportata in Fig. 3. Per quanto concerne la sintesi in ambiente acquoso, ed in condizioni di flusso, gli spettri risultano lievemente differenti al variare dell'ordine di ablazione dei metalli (Fig. 3a). È evidente la presenza di una banda di risonanza plasmonica superficiale (SPR) attribuibile ad AgNPs, a circa 410 nm [17]. CuNPs sono invece responsabili di code di picco di minore intensità. Le bande SPR hanno una larghezza a mezza altezza differente; è noto come questa caratteristica del picco sia legata alla dispersione dimensionale delle nanoparticelle [18, 19].

Una banda SPR più ampia per i colloidi CuAgNPs di Fig. 2b-b' è in accordo con l'evidenza di una popolazione maggiormente dispersa dal punto di vista dimensionale. La presenza di rame in tali colloidi acquosi è stata confermata da analisi mediante spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS). A scopo esemplificativo, si riportano in Tab. 1 i dati di composizione atomica superficiale di un colloide CuAgNPs preparato in condizioni di flusso ed in presenza di CS come stabilizzante. Quest'ultimo è responsabile della presenza sul campione di tracce di calcio, tipico contaminante di tale sostanza naturale, e di azoto. Carbonio e ossigeno provengono dalla medesima matrice, oltre che dalla inevitabile contaminazione avventizia. Infine si osserva, come

atteso, la presenza di tracce di entrambi i metalli. In Fig. 3b si riportano gli spettri UV-Vis dei colloidi preparati in acetone, in condizioni statiche. In questo caso risultano apprezzabili due picchi plasmonici, a circa 420 nm e 560 nm, attribuibili rispettivamente ad AgNPs e CuNPs [17, 20]. La forma piuttosto broad di tali bande è ascrivibile alla presenza di popolazioni di NPs fortemente polidisperse.

## Conclusioni

In questo lavoro è stata presentata la sintesi mediante ablazione laser in liquido con impulsi ultrabrevi di colloidi bi-componente a base di Cu e Ag, dalle note proprietà antimicrobiche [4]. Tali NPs sono state caratterizzate morfologicamente e spettroscopicamente, al fine di ricercare le condizioni di produzione dei colloidi più vantaggiose sia in termini di controllo morfologico che di resa e pulizia del

Elemento	% Atomica
C	58,0±0,5
N	2,5±0,5
Ca	0,6±0,5
Ag	0,3±0,2
O	38,0±0,5
Cu	0,6±0,2

Tab. 1 - Composizione elementare di superficie dei campioni preparate in cella in flusso con CS 1 g/L. L'errore è stato espresso come il valore massimo associato ad una singola quantificazione (0,2% per rame e argento, 0,5% di altri elementi)



processo LASiS. L'impiego di un sistema controllato per il transito del mezzo di ablazione comporta un migliore controllo chimico-morfologico sulle nanostrutture prodotte: è attualmente in corso la messa a punto di un set-up sperimentale in flusso di paragonabile riproducibilità per la preparazione di Ag/CuNPs in ambiente organico. La scelta di tale tipo di solvente è resa pressoché obbligatoria dalla necessità di disperdere tali colloidali in soluzioni polimeriche per lo sviluppo di imballaggi alimentari plastici biodegradabili e bioattivi. Alcuni esperimenti preliminari condotti su film compositi CuNPs-PLA hanno mostrato come questi ultimi siano in grado di fornire un rilascio controllato e duraturo di ioni antibatterici ( $\text{Cu}^{2+}$ ) in concentrazioni non pericolose per l'essere umano e tali da garantire il controllo della proliferazione batterica. Tali test sono stati condotti sia in vitro, su specifici microrganismi di deterioramento alimentare, che in vivo, mediante rilascio degli ioni attivi nel liquido di governo di fiordilatte confezionato in vaschetta [3]. Alcuni esperimenti preliminari condotti su film compositi Ag/CuNPs-PLA hanno mostrato come questi ultimi siano in grado di fornire un rilascio controllato e duraturo di ioni antibatterici ( $\text{Ag}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) in soluzione fisiologica, in concentrazioni non pericolose per l'essere umano. Questi risultati lasciano intuire che si possano mettere a punto nuovi imballaggi, contenenti Ag/CuNPs, che potranno ridurre la contaminazione microbica superficiale degli alimenti, ritardandone il deterioramento, estendendone la shelf-life e preservandone le caratteristiche organolettiche. Inoltre, l'utilizzo di un polimero disperdente economico e biodegradabile quale il PLA, e di NPs sintetizzate in assenza di sostanze tossiche rende tali imballaggi eco-friendly.

### Ringraziamenti

Si ringrazia la Fondazione Cassa di Risparmio di Puglia per il finanziamento del progetto "Preparazione di nanoantimicrobici attraverso Laser Ablation in liquido per applicazione in imballaggi alimentari".

### BIBLIOGRAFIA

- [1] J.-Y. Huang, X. Li, W. Zhou, *Trends in Food Science & Technology*, 2015, **45**, 187.
- [2] M.C. Sportelli, R.A. Picca, N. Cioffi, in *Novel Antimicrobial Agents and Strategies*, D.A. Phoenix et al. (Eds.), Wiley-VCH Verlag

- GmbH & Co. KGaA, 2014, pp. 181-218.
- [3] A. Conte et al., *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, **19**, 158.
- [4] M.C. Sportelli, R.A. Picca, N. Cioffi, *Trends Anal. Chem.*, 2016, **84** (part A), 131.
- [5] A. Fojtik, A. Henglein, *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, 1993, **97**, 252.
- [6] G. Yang, *Laser Ablation in Liquids: Principles and Applications in the Preparation of Nanomaterials*, Taylor & Francis (CRC Press), Stanford, 2012.
- [7] V. Amendola, M. Meneghetti, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, **11**, 3805.
- [8] J. Koch et al., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 267.
- [9] A. Ancona et al., *Mat. Lett.*, 2014, **136**, 397.
- [10] R. Streubel et al., *Optics Letters*, 2016, **41**, 1486.
- [11] S. Barcikowski et al., *Applied Physics Letters*, 2007, **91**, 83113.
- [12] N. Peelman et al., *Trends in Food Science & Technology*, 2013, **32**, 128.
- [13] H. Tsuji, in *Bio-Based Plastics*, S. Kabasci (Ed.), John Wiley & Sons Ltd., 2013, pp. 171-239.
- [14] R.E. Drumright et al., *Adv. Mater.*, 2000, **12**, 1841.0
- [15] M.C. Sportelli et al., *Symposium RR - Solution Syntheses of Inorganic Functional/Multifunctional Materials*, 2015, 1804.
- [16] J.-P. Sylvestre et al., *Appl. Phys. A*, 2005, **80**, 753.
- [17] V. Amendola et al., *Plasmonics*, 2010, **5**, 85.
- [18] W. Haiss et al., *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 4215.
- [19] J.A. Creighton, D.G. Eadon, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1991, **87**, 3881.
- [20] M. Usman et al., *Molecules*, 2012, **17**, 14928.

### Laser Ablation Synthesis in Solution of Nanoantimicrobials for Food Packaging Applications

Antimicrobial nanoparticles synthesized by laser ablation in liquids can be used for the production of composite materials for bioactive food packaging, reducing microbial contamination.