



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca

in Biologia dei Sistemi

Ciclo XIII — Anno di discussione 2017

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa *Antonella Leone*

***Studio del meccanismo d'azione e dei
parametri strutturali di nuovi materiali
ad azione antimicrobica***

settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/19

Dottoranda

Dott.ssa *Simona Matrella*

Tutor

Chiar.mo Dott. *Giovanni Vigliotta*

In memoria di Pasquale Bruno e sua moglie Carmela

Abstract

Abstract 1

Sommario

Sommario 2

Capitolo I. I polimeri antimicrobici

1.1 I polimeri antimicrobici 3
 1.2 I polimeri biocidi 4
 1.2.1 Polimeri biocidi con composti di ammonio quaternario (CAQ) 5
 1.3 Parametri strutturali che influenzano l'attività antimicrobica dei polimeri biocidi 7
 1.3.1 Carica cationica 8
 1.3.2 Bilancio idrofilico-idrofobico 9
 1.3.3 Architettura polimerica 11
 1.4 Meccanismo d'azione dei polimeri biocidi con CAQ 13
 1.5 Superfici antimicrobiche 18
 1.5.1 Superfici antimicrobiche costituite da polimeri biocidi con CAQ 19
 1.5.2 Meccanismo d'azione delle superfici antimicrobiche costituite da polimeri biocidi con CAQ 21

Capitolo II. Nuovi polimeri antimicrobici a base di PEG(MMA-DMAEMA)_n

2.1 PEG(MMA-DMAEMA)_n: nuove superfici intrinsecamente antimicrobiche 25
 2.2 Le proprietà antimicrobiche dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n dipendono dall'architettura polimerica 26
 2.3 Ruolo dell'architettura polimerica A(BC)₂ nella formazione di legami ad idrogeno tra i gruppi amminici dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n 28
 2.4 Attività antimicrobica dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n 29

Capitolo III. Studio dei parametri strutturali dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n

3.1 Introduzione 32
 3.2 Risultati e Discussione 32
 3.2.1 Nuove superfici antimicrobiche del tipo PEG(MMA-AAEMA)_n 32
 3.2.2 Caratterizzazione dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n contenenti il 40% in mol dei monomeri AAEMA 34
 3.2.3 Studio dell'attività antimicrobica dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n contenenti il 40% in mol dei monomeri AAEMA 35
 3.2.4 Caratterizzazione dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n contenenti il 15% in mol dei monomeri AAEMA 40
 3.2.5 Studio dell'attività antimicrobica dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n contenenti il 15% in mol dei monomeri AAEMA 41

3.2.6 Confronto tra l' attività antimicrobica dei copolimeri con architettura A(BC) ₂ con 40% e 15% in mol dei monomeri AAEMA.....	43
3.2.7 Attività emolitica dei copolimeri con architettura A(BC) ₂ con 40% e 15% in mol dei monomeri AAEMA	45

Capitolo IV. Meccanismo d'azione dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n

4.1 Introduzione.....	48
4.2 Risultati e Discussione	49
4.2 Alterazione della permeabilità della barriera esterna dei batteri E.coli	49
4.2.1 Rilascio di materiale citoplasmatico	52
4.2.2 Saggio dello shock osmotico.....	55
4.3 Studio della cinetica di crescita delle cellule di E. coli trattate con DMAEMA40....	56
4.4 Azione di DMAEMA40 sulla membrana citoplasmatica	60
4.4.1 Interazione tra DMAEMA40 e protoplasti di E.coli	61
4.4.2 Interazione tra DMAEMA40 e liposomi (LUV)	63
4.5 Azione di DMAEMA40 sulla membrana esterna.....	65
4.5.1 Effetto dell'actinomicina D sulle cellule di E.coli trattate con DMAEMA4065	
4.5.2 Interazione tra DMAEMA40 e lipopolisaccaride (LPS)	67

Capitolo V. Conclusioni

5.1 Conclusioni.....	70
----------------------	----

Capitolo VI. Materiali e Metodi

6.1 Materiali.....	72
6.2 Saggi microbiologici	72
6.3 Analisi statistica.....	72
6.4 Test di emolisi	73
6.5 Microscopia a fluorescenza.....	73
6.6 Preparazione cellule per microscopia elettronica a trasmissione	74
6.7 Saggio rilascio di materiale intracellulare.....	74
6.8 Resistenza allo shock osmotico	74
6.9 Curve di crescita.....	75
6.10 Saggio dello studio della riparazione dei danni alla barriera esterna	75
6.11 Protoplasti	76
6.12 Preparazione dei liposomi.....	77
6.13 Saggio di diffusione dell'actinomicina D.....	79
6.14 Saggio del 2-cheto-3-deossiotano(KDO)	79

<i>Bibliografia</i>

Bibliografia.....I-XIV

Abstract

The increased demand of new and more effective materials able to reduce and prevent microbiological contamination is one of the great challenges of scientific research. In the last decade, the use of antimicrobial polymers has aroused a huge interest in the scientific community because they are effective, safe and able to avoid spreading multidrug-resistant microorganisms. Recently, Dr. Lorella Izzo of the University of Salerno developed a new family of non-leaching antimicrobial copolymers having star-type architecture $A(BC)_n$ ($n = 1, 2, 4$) containing m-PEG (block A), methylmethacrylate (MMA), and nonquaternized 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) (blocks BC). Preliminary studies conducted on this copolymer have shown that their antimicrobial properties depends on the DMAEMA monomers and are strongly related to the topological structure of the composing copolymers.

The first goal of my PhD project was to assess whether the antimicrobial and hemolytic activity of $PEG(MMA-DMAEMA)_n$ was influenced by the change of the three main components of copolymers: balance between charge density (AAEMA) and hydrophobicity (MMA), polymer architecture and variation of the N-substituent groups. To this aim, two new series of insoluble copolymers surfaces $PEG(MMA-AAEMA)_n$ -like were synthesized. They consisted in $A(BC)$, $A(BC)_2$ and $A(BC)_4$ architectures, different ratio between AAEMA/MMA and different N-alkyl substituents of alkyl-aminoethyl methacrylates (AAEMAs: methyl, Me; ethyl, Et; isopropyl, i-Pr; and tert-butyl, t-Bu). We found that the antimicrobial activity of films was dependent on the amount of surface charge density rather than the hydrophobicity and they did not induce any hemolytic activity. The second objective of this project was to investigate the mechanism of action of these antimicrobial surfaces on gram-negative bacteria *Escherichia coli*. It has been shown that the copolymers cause an alteration of bacteria's outer membrane permeability after 30 minutes of treatment, instead the cells died after treatments longer than 60 minutes. However, the bactericidal action of copolymers did not depend by the interaction with intracellular receptor because they directly interact with the cell membranes. Considering that the cationic pedant groups of AAEMA are not long enough to completely penetrate the cell wall, it has been suggested that the copolymers after the electrostatic interaction with bacteria surfaces interact with the LPS molecules causing the loss of stability of the outer membrane and the dead of bacteria. These findings provided enough evidence to speculate the mechanism of action of new antimicrobial surfaces $PEG(MMA-AAEMA)_n$.

Sommaro

Lo sviluppo di materiali che inibiscono e prevengono la contaminazione microbiologica rappresenta una delle grandi sfide della ricerca scientifica. Negli ultimi anni l'impiego dei polimeri antimicrobici ha suscitato un enorme interesse perché efficace, sicuro e soprattutto in grado di evitare la formazione e la diffusione di microrganismi multiresistenti. Recentemente, presso il laboratorio della Dott.ssa Lorella Izzo, del Dipartimento di Chimica e Biologia dell'Università di Salerno, è stata sintetizzata una nuova famiglia di superfici antimicrobiche costituite da copolimeri insolubili in acqua aventi architettura a stella del tipo $A(BC)_n$ con $n = 1, 2, 4$ in cui A rappresenta un blocco a base di mPEG (monometossi poli(etilenglicole)), e BC una catena polimerica random costituita da MMA (metilmetacrilato) e DMAEMA (2-(dimetilammino)etilmetacrilato). L'attività antimicrobica di tali film è legata alla presenza dei monomeri di DMAEMA in quanto, essendo in grado di autoquaternizzarsi in acqua, conferiscono una carica positiva ai copolimeri responsabile dell'interazione elettrostaticamente con la superficie anionica dei batteri. Trattandosi di una recente scoperta e non essendoci in letteratura studi meccanicistici su tali tipologie di superfici antimicrobiche, il primo obiettivo del mio progetto di dottorato è stato quello di valutare se l'attività antimicrobica ed emolitica dei film $PEG(MMA-DMAEMA)_n$ fosse influenzata dalla modifica dei tre principali componenti dei copolimeri ossia: dal bilancio tra densità di carica ed idrofobicità, dall'architettura polimerica e dalla modifica del pendaglio amminico protonabile. Tenendo conto di tali componenti sono state sviluppate due nuove serie di superfici insolubili del tipo $PEG(MMA-AAEMA)_n$ costituite dalle architetture $A(BC)$, $A(BC)_2$ e $A(BC)_4$ con diverso rapporto tra densità di carica (AAEMA) e idrofobicità (MMA) e diverso sostituente sull'atomo di azoto nei monomeri AAEMA (Metile, Etile, *ter* Butile, *iso* propile). È stato dimostrato che l'attività antimicrobica dei copolimeri dipende esclusivamente dalla densità di carica superficiale e non dalla loro componente idrofobica ed inoltre, essi sono biocompatibili in quanto non inducono attività emolitica. Il secondo obiettivo di questo progetto è stato quello di studiare il meccanismo d'azione con il quale tali copolimeri agiscono sulle cellule batteriche. In particolare, è stata studiata l'interazione dei film con il batterio gram negativo *Escherichia coli* dimostrando che, a seguito del contatto con i copolimeri, subisce una significativa alterazione della permeabilità della barriera esterna. I film sono in grado di danneggiare le cellule batteriche già dopo 30 minuti di trattamento ma, tale alterazione, diventa irreversibile e letale soltanto per trattamenti maggiori di 60 minuti. L'azione battericida dei copolimeri, inoltre, non dipende da una risposta cellulare né è mediata da un ruolo attivo della parete batterica in quanto agiscono direttamente sulle membrane cellulari. Tuttavia, essendo costituiti da pendagli non sufficientemente lunghi da poter raggiungere e distruggere la membrana citoplasmatica è stato ipotizzato che i copolimeri, a seguito dell'interazione con la superficie batterica, interagiscono inizialmente con le molecole anioniche di LPS causandone il rilascio e di conseguenza la perdita di stabilità della membrana esterna. Questi risultati hanno fornito prove sufficienti per poter ipotizzare il meccanismo d'azione delle nuove superfici antimicrobiche $PEG(MMA-AAEMA)_n$.

1.1 I polimeri antimicrobici

La contaminazione microbica rappresenta da sempre una delle principali minacce per la salute umana e lo sviluppo sociale (Ventola *et al.*, 2015; Siedenbiedel *et al.*, 2012). La presenza e la permanenza di microrganismi patogeni in diversi settori quali biomedico, farmaceutico, sanitario, alimentare, tessile e di purificazione delle acque, ha di fatto causato molteplici infezioni e malattie (Kenawy *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2014). Inoltre, l'aumento delle malattie associate allo sviluppo di patogeni resistenti agli antibiotici e la facilità con cui si diffondono nell'ambiente ha ulteriormente peggiorato la situazione (Lode 2009; McDonnel and Russel 1999).

Negli anni la diffusione di microrganismi patogeni è stata debellata e/o controllata sterilizzando i materiali con il calore, con radiazioni ionizzanti (Kenawy *et al.*, 2007) oppure con disinfettanti a basso peso molecolare come ipoclorito, sali di argento e specie reattive dell'ossigeno (i.e. perossido di idrogeno; Siedenbiedel *et al.*, 2012).

Tali tecniche hanno un'azione antimicrobica a breve termine in quanto i materiali e le superfici vengono nuovamente contaminate una volta esposte ai microrganismi ed, inoltre, l'utilizzo prolungato e spesso sconsigliato di molti disinfettanti, rivelatisi tossici, ha causato seri danni ambientali e contribuito alla diffusione di nuovi ceppi microbici resistenti (Gould 1999; Boucher *et al.*, 2009; Álvarez-Paino *et al.*, 2015).

Secondo i dati riportati dall'organizzazione mondiale della sanità [OMS – "World Health Organization" (WHO)], e da quelli pubblicati dal rapporto britannico "Review on Antimicrobial Resistance", nel 2050 le infezioni per le quali non avremo farmaci a disposizione potrebbero arrivare a uccidere 10 milioni di persone, una ogni tre secondi.

Tale scenario apocalittico però, potrebbe essere evitato attuando strategie come la sintesi di polimeri con attività antimicrobica. Infatti, grandi sono stati e sono gli sforzi compiuti dalla ricerca scientifica volti a sviluppare nuovi materiali non solo antimicrobici ma anche in grado di contrastare lo sviluppo di resistenza nei microrganismi. L'impiego dei polimeri antimicrobici ha suscitato un enorme interesse nella comunità scientifica perché efficace e sicuro e soprattutto in grado di evitare la formazione e la diffusione di microrganismi multiresistenti (Santos *et al.*, 2016)

I polimeri antimicrobici sono materiali costituiti da gruppi funzionali, sia naturali che sintetici, incorporati all'interno di matrici polimeriche oppure rilasciate nell'ambiente in grado di uccidere e/o inibire la crescita dei microrganismi sulle superfici e nell'ambiente circostante (Jain *et al.*, 2014). L'utilizzo dei polimeri come agenti antimicrobici presenta notevoli vantaggi in quanto le molecole polimeriche possono essere facilmente modificate, sono stabili e non volatili, molte non permeano attraverso la pelle e la loro attività antibatterica risulta incrementata e prolungata nel tempo (Xue and Xiao *et al.*, 2015; Kenawy *et al.*, 2007).

I polimeri vengono convenzionalmente raggruppati in tre categorie: (i) polimeri biocidi, (ii) biocidi polimerici e (iii) polimeri che rilasciano biocidi (Fig. 1; Barzic *et al.*, 2015).

I primi sono polimeri costituiti da policationi, sia naturali che sintetici, in grado di esercitare un'innata azione antimicrobica interagendo con le membrane cellulari anioniche dei microrganismi (Kenawy *et al.*, 2014). I biocidi polimerici sono preparati, invece, attaccando ai polimeri unità ripetute di gruppi bioattivi (come ad esempio gli antibiotici) che conferiscono antimicrobicITÀ all'intera macromolecola (Barzic *et al.*,

2015). Infine i polimeri che rilasciano biocidi sono costituiti da matrici polimeriche caricate con molecole biocide e hanno essenzialmente la funzione di veicolo o supporto (Li *et al.*, 2016).

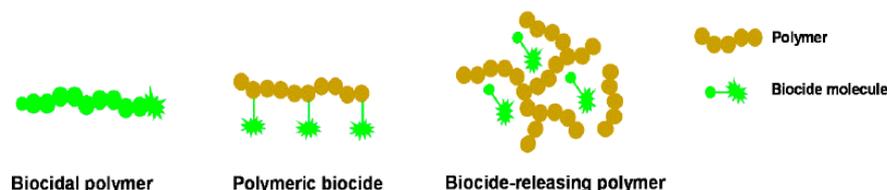


Figura 1- Rappresentazione dei diversi tipi di sistemi polimerici antimicrobici (Barzic *et al.*, 2015)

Indipendentemente dal tipo di sistema polimerico adottato, per poter essere utilizzati come alternativa a tutti gli antimicrobici, antibiotici compresi, i polimeri devono soddisfare diverse importanti caratteristiche quali: la non tossicità, una sintesi facile ed economica, una stabilità per lunghi tempi di utilizzo, un'azione antimicrobica ad ampio spettro e dopo brevi tempi di contatto (Kenawy *et al.*, 2007).

Le tre tipologie di sistemi polimerici sviluppati negli ultimi decenni, in generale, rispecchiano queste caratteristiche. L'impiego dei polimeri biocidi risulta essere, però, maggiormente vantaggioso ed ecosostenibile rispetto agli altri. Questi ultimi, infatti, avendo un meccanismo antimicrobico dipendente dalle caratteristiche strutturali delle macromolecole possono essere facilmente modificabili e soprattutto possono essere impiegati per la sintesi di superfici permanentemente antimicrobiche che non disperdono biocidi nell'ambiente.

1.2 I polimeri biocidi

Il termine polimeri biocidi si riferisce essenzialmente a polimeri costituiti da gruppi cationici che hanno un'intrinseca attività antimicrobica (Santos *et al.*, 2006). Gli unici due polimeri biocidi naturali, sino ad oggi conosciuti, sono il chitosano e la poli- ϵ -lisina (Sayed *et al.*, 2015). Il chitosano è un polisaccaride cationico di origine animale ottenuto dalla deacetilazione della chitina mentre, la poli- ϵ -lisina, è un omopolipeptide dell'amminoacido lisina prodotto per fermentazione batterica dal microorganismo *Streptomyces albulus* (Elsabee *et al.*, 2013; Sayed *et al.*, 2015). Tutti gli altri polimeri biocidi, invece, vengono sintetizzati legando covalentemente monomeri cationici (i.e. sali di ammonio quaternario, fosfonio quaternario, guanidio o solfonio terziario) a diversi derivati polimerizzabili (Kenawy *et al.*, 2014; Ganewatta *et al.*, 2015; Panarin *et al.*, 1972). Tra questi i più comuni sono costituiti da composti di ammonio quaternario (CAQ) una famiglia di tensioattivi con formula chimica $(R_4N^+X^-)$ ampiamente utilizzata in forma solubile in quanto possiede un'efficiente attività antimicrobica ad ampio spettro (Christofi and Ivshina 2002, Pereira *et al.*, 2007). L'attività antimicrobica di questi composti è legata alla particolare struttura delle molecole le quali possono essere costituite da una porzione idrofilica carica e solubile ed una parte idrofoba costituita da una catena idrocarburica, talvolta alogenata, con la quale interagiscono con le membrane lipidiche dei batteri. E' stato dimostrato che l'aumento delle dimensioni della catena idrofoba dei CAQ determina una maggiore interazione con le membrane batteriche aumentando l'attività antimicrobica di tali

tensoattivi (Bonilla *et al.*, 2012). Per tale motivo i CAQ contenenti catene alchiliche costituite da 6 a 8 atomi di carbonio sono quelli maggiormente utilizzati per la sintesi dei polimeri biocidi (Abel *et al.*, 2002; Kenawy *et al.*, 2007; Fig.2).

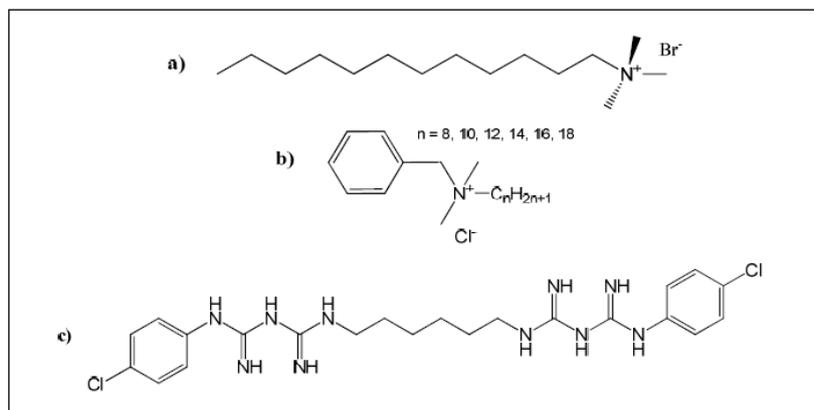


Figura 2- Rappresentazione della struttura dei sali di ammonio quaternario maggiormente utilizzati come disinfettanti: a)Dodecil trimetil ammonio bromuro b)Cloruro di benzalconio c)Cloroexidine (Hegstad *et al.*, 2010).

Nonostante il loro potenziale di azione i sali di ammonio quaternario a basso peso molecolare sono tossici per l'uomo, specie se ingeriti, e considerati ad alto impatto ambientale in quanto stabili nel tempo e difficilmente degradabili (Zhang *et al.*, 2015). In letteratura è riportato che alcuni microrganismi hanno sviluppato meccanismi di resistenza verso i CAQ (Hagstad *et al.*, 2010; Gilbert *et al.*, 2003;). Tali meccanismi sono associati alla modifica del contenuto dei fosfolipidi delle membrane batteriche al fine di impedire la traslocazione delle molecole cationiche al loro interno oppure alla iper espressione di geni batterici (detti geni *qac*) i quali codificano pompe di efflusso che rimuovono attivamente i CAQ dalle membrane riducendone l'effetto biocida (Wright *et al.*, 1987; Heir *et al.*, 1999).

1.2.1 I polimeri biocidi con composti di ammonio quaternario (CAQ)

La sintesi dei polimeri biocidi contenenti composti di ammonio quaternario ha permesso di superare le problematiche associate ai composti di ammonio quaternario a basso peso molecolare in quanto sono chimicamente stabili, non volatili e non tossici rispetto ai singoli monomeri (Kenawy *et al.*, 2003; Kenawy *et al.*, 2006; Sanches *et al.*, 2015). La sintesi del primo polimero biocida con CAQ risale al 1970 quando Panarin dimostrò che l'attività antimicrobica del polimero poli(2-metacriloeossietil-trietilammonio) verso il batterio gram positivo (*Staphilococcus aureus*) e gram negativo (*Escherichia coli*) aumentava non solo con la polimerizzazione ma anche con l'incremento della lunghezza della catena alchilica (Panarin *et al.*, 1972), dati confermati successivamente anche da Ikeda e collaboratori (Ikeda *et al.*, 1984).

Da allora sono stati sintetizzati numerosi polimeri biocidi con CAQ sempre più efficienti ed applicabili anche in ambito biomedico. L'unico inconveniente nell'utilizzare tali polimeri risiede nel fatto che le catene idrofobiche si associano indistintamente alle membrane cellulari sia degli organismi procarioti che eucarioti (Moreau *et al.*, 2002; Sovadinova *et al.*, 2010). Fortunatamente è stato scoperto che l'equilibrio tra attività antimicrobica ed emolitica dei polimeri con CAQ può essere modulato nella direzione desiderata cambiando il bilanciamento tra densità di carica e idrofobicità delle unità polimeriche ripetute. Alcuni autori hanno riportato che controllando opportunamente l'idrofobicità dei copolimeri costituiti da CAQ è possibile ottenere polimeri antimicrobici con una minima attività emolitica (Kuroda *et al.*, 2005; Ilker *et al.*, 2004; Gelman *et al.*, 2004). Nella tabella 1 sono elencati alcuni esempi di polimeri biocidi con CAQ con elevata attività antimicrobica.

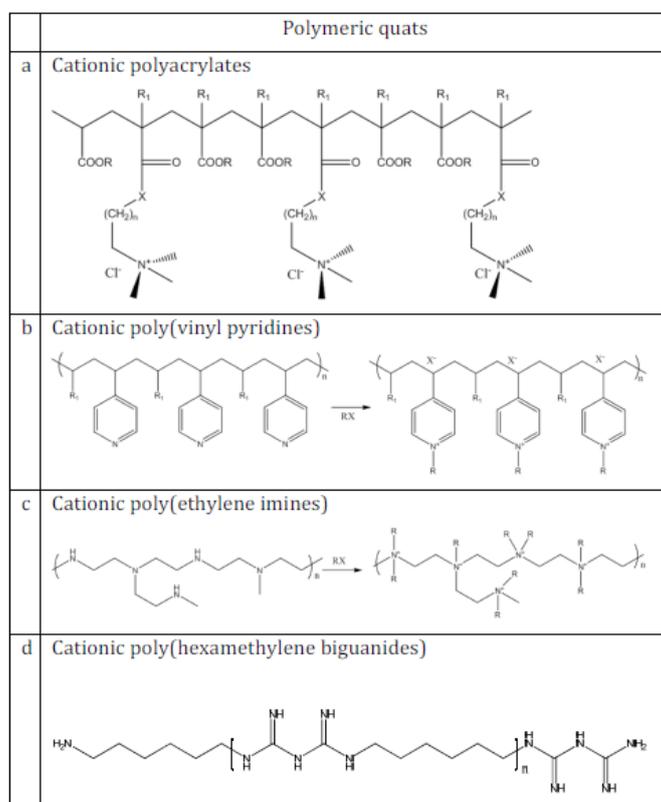


Tabella 1- Esempi di polimeri biocidi con CAQ altamente antimicrobici: a) poliacrilati cationici (Kuroda *et al.*, 2005; Jaeger *et al.*, 2010) b) polivinil piridinio (Tiller *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006) c) polietilenimine cationiche (Haldar *et al.*, 2007; Milović *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2010) d) poliesametilene biguanidi cationici (Ikeda *et al.*, 1984; Ikeda *et al.*, 1985).

I poliacrilati cationici sono quelli maggiormente studiati tra i polimeri biocidi sia perché i loro monomeri sono commercialmente disponibili sia perché le proprietà dei rispettivi polimeri possono essere facilmente modulate nei processi di sintesi. Essi vengono impiegati soprattutto per la produzione di superfici di rivestimento, come ad esempio il (3-metacrilammido alchil) trimetil ammonio cloruro (Tab.1a). I polimeri di polivinil piridinio e polietilenimina (PEI), invece, hanno un'attività antibatterica

dipendente dal gruppo R idrofobico e dal numero di unità amminiche di cui sono costituiti e si ottengono dall'alchilazione dei rispettivi monomeri (Tab.1 b-c).

Contrariamente ai suddetti polimeri, i poliesametilene biguanidi (PHMB) sono gli unici ad essere costituiti da monomeri neutri. In soluzione però, grazie all'elevata basicità dei gruppi guanidi, possono essere protonati originando dei policationi altamente antimicrobici in funzione del pH della soluzione in cui sono disciolti (Ikeda *et al.*, 1984; Gilbert *et al.*, 2005; Tab.1d).

1.3 Parametri strutturali che influenzano l'attività antimicrobica dei polimeri biocidi

La maggior parte dei polimeri biocidi costituiti da CAQ sono derivati dell'acido acrilico o metacrilati, e un gran numero di essi sono sintetizzati dal 2 (dimetilammino)-etil metacrilato (DMAEMA) in quanto disponibile commercialmente e caratterizzato da un'elevata versatilità strutturale (Bonilla *et al.*, 2012). Molti di essi sono costituiti da copolimeri random con catene polimeriche flessibili (dette *backbones*) e catene laterali costituite sia da gruppi cationici che idrofobici (Fig. 3). Nonostante in soluzione essi mostrano una conformazione random irregolare, quando si trovano in presenza delle superfici anioniche batteriche assumono una conformazione anfifilica facilitando l'interazione tra le catene cationiche e i fosfolipidi e, contemporaneamente, indirizzando i gruppi idrofobici nelle membrane (Mowery *et al.*, 2009; Mowery *et al.*, 2007).

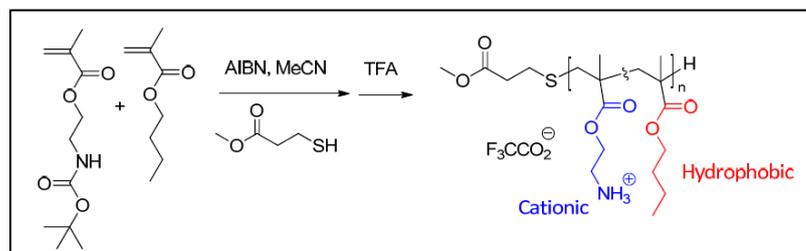


Figura 3- Esempio di copolimeri di metacrilato recanti gruppi amminici cationici (ammina primaria) e gruppi idrofobici (butile) (DeGrado *et al.*, 2009)

Per determinare la selettività dei materiali polimerici solitamente vengono misurati due parametri: la minima concentrazione di polimero necessaria per inibire la crescita dei microrganismi (MIC) e la concentrazione necessaria per lisare il 50% di globuli rossi (HC₅₀; Engler *et al.*, 2012). Per quanto riguarda, invece, il controllo della potenza antimicrobica e dell'attività emolitica dei polimeri biocidi sono stati individuati

tre principali parametri strutturali che ne influenzano entrambe le caratteristiche. Essi sono: una netta carica cationica, un ottimale bilancio idrofilico/idrofobico e un'opportuna architettura polimerica (Timofeeva *et al.*, 2011; Palermo *and* Kuroda 2010; Engler *et al.*, 2012).

1.3.1 Carica cationica

La presenza di cariche cationiche lungo le strutture polimeriche ha il compito di aumentare l'interazione elettrostatica con le cellule batteriche (Ikeda *et al.*, 1984). Di conseguenza la scelta della tipologia dei gruppi cationici rappresenta il primo passo per la sintesi di polimeri biocidi perché da esse dipenderà l'affinità selettiva con i componenti anionici delle membrane batteriche (Palermo *et al.*, 2010).

La maggior parte dei polimeri biocidi è costituita da catene idrofobiche come polivinil alcoli (Westman *et al.*, 2009), poliacrilati (Kenawy *et al.*, 2009), poliimine (Chen *and* Cooper 2000), polistireni (Tashiro *et al.*, 2001), polisilossani (Sauvet *et al.*, 2000) e poliuretani (Kurt *et al.*, 2008) funzionalizzati con CAQ ed utilizzati come efficienti agenti antimicrobici (Kenawy *et al.*, 2014; Ganewatta *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2009).

Solitamente tali polimeri vengono resi permanentemente carichi aggiungendo direttamente i composti di ammonio quaternario; tuttavia, recentemente molti studi hanno dimostrato che sistemi macromolecolari contenenti gruppi amminici protonati non quaternizzati mostrano un'attività antimicrobica maggiore rispetto ai corrispondenti polimeri quaternizzati (Timofeeva *et al.*, 2011; Dohlen *et al.*, 2016).

Ad esempio, Gelman e collaboratori hanno sintetizzato polistireni contenenti gruppi amminici terziari protonati in grado di esercitare un'attività antimicrobica nettamente maggiore rispetto agli analoghi polimeri quaternizzati (Gelman *et al.*, 2004). Timofeeva e collaboratori sono giunti alla stessa conclusione per quanto riguarda i polimeri cationici solubili di poli diallil ammonio (PDDA) contenenti pirrolidina associata a gruppi protonati di ammine terziarie e secondarie (Timofeeva *et al.*, 2009). Studi condotti su copolimeri di metacrilato hanno, inoltre, dimostrato che la carica cationica introdotta con ammine primarie e terziarie è in grado di inibire completamente la crescita del batterio *Escherichia coli* mostrando una minima attività emolitica, a differenza degli omologhi copolimeri con gruppi quaternari inefficienti anche ad elevate concentrazioni (Fig.4; Palermo *et al.*, 2009).

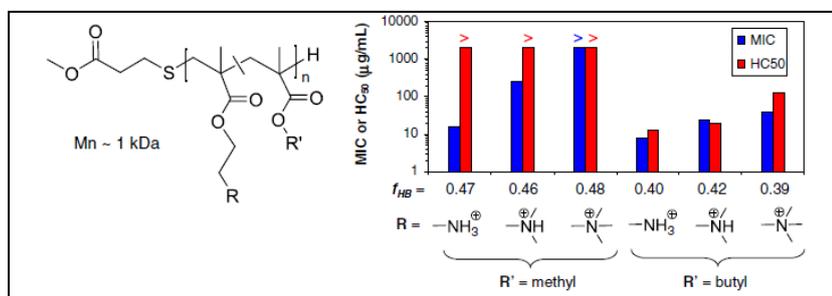


Figura 4- Effetto della struttura chimica dei gruppi cationici sull'attività antimicrobica (MIC) ed emolitica (HC₅₀) dei copolimeri di metacrilato (Palermo *et al.*, 2009).

L'elevata attività antimicrobica dei polimeri non quaternizzati è stata attribuita al ruolo assunto dai gruppi idrofilici NH₂⁺/NH⁺ nel formare forti interazioni elettrostatiche con i lipidi anionici delle membrane batteriche. Tali interazioni, inoltre, vengono stabilizzate dalla formazione di forti legami ad idrogeno che stabilizzano maggiormente il complesso polimero-membrana incrementando il danno sull'organizzazione e integrità delle membrane cellulari (Timofeeva *et al.*, 2009; Berkovich *et al.*, 2009).

1.3.2 Bilancio idrofilico/idrofobico

L'attività e la biocompatibilità dei polimeri biocidi dipende, oltre che dai gruppi cationici, anche dalla presenza di catene laterali alchiliche e, in particolare, da un equilibrio ottimale tra porzioni idrofiliche ed idrofobiche detto anche bilancio "anfifilico" (Palermo *et al.*, 2009).

Nei polimeri antimicrobici soltanto quando i residui idrofilici ed idrofobici sono presenti in un appropriato rapporto essi sono in grado di uccidere i microrganismi senza danneggiare le cellule umane (Dathe *et al.*, 2002; Shai *et al.* 1999; Fig. 5). Infatti, è stato dimostrato, che un'eccessiva presenza di carica cationica causa sì una maggiore affinità verso le superfici batteriche ma, contemporaneamente, preclude l'inserimento delle porzioni idrofobiche nel *core* delle membrane, limitandone l'azione. D'altro canto, polimeri con un'elevata frazione di residui idrofobici sono indiscriminatamente tossici sia per le cellule umane che batteriche (Palermo *et al.*, 2010; Mowery *et al.*, 2007; Kuroda *et al.*, 2009).

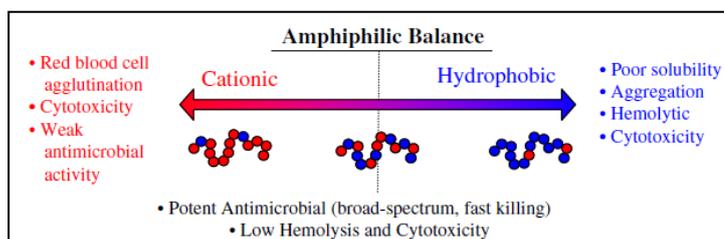


Figura 5- Effetti legati alla modifica del bilancio anfifilico sull'attività emolitica e citotossica dei polimeri biocidi antimicrobici (Palermo *et al.*, 2010).

Studi condotti su copolimeri random di metacrilati (Kuroda *et al.*, 2009; Palermo *et al.*, 2009); metacrilammidi (Palermo *et al.*, 2009) e β- lattami (Mowery *et al.*, 2007)

hanno dimostrato che variando la percentuale di gruppi cationici e l'identità dei gruppi idrofobici (R) è possibile modulare l'emolitticità e l'antimicrobicità.

Ad esempio, Palermo e collaboratori hanno ottimizzato l'attività antimicrobica ed emolitica di copolimeri variando la percentuale e la natura dei gruppi idrofobici presenti su copolimeri di metacrilato (Fig.6; Palermo *et al.*, 2009). Questi ultimi inizialmente costituiti dal 47% di gruppi idrofobici (metil metacrilato) e dal 53% di gruppi cationici (ammino etil metacrilato) mostravano una minima attività antimicrobica ed emolitica. Con l'aggiunta di corte catene idrofobiche (metil metacrilato), tali copolimeri hanno incrementato la loro selettività verso le cellule batteriche, mentre con l'aggiunta di lunghe catene alchiliche, come butilmetacrilato, i copolimeri hanno mostrato non solo una maggiore selettività ma anche una maggiore antimicrobicità (Palermo *et al.*, 2009).

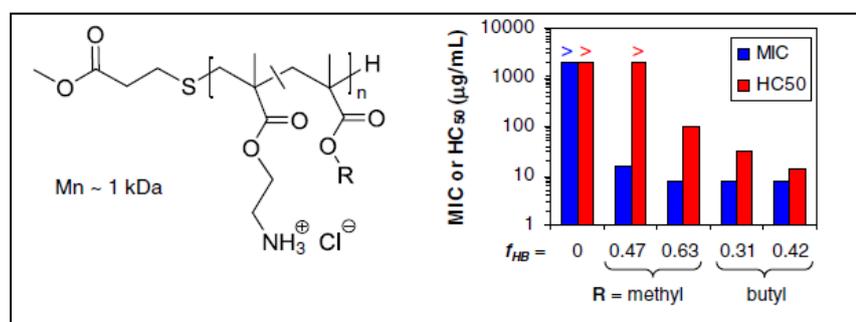


Figura 6- Effetto della variazione della frazione di catene laterali idrofobiche (f_{HB}) e dell'identità dei gruppi idrofobici (gruppo R) sull'attività antimicrobica (MIC) ed emolitica (HC₅₀) di copolimeri random di metacrilato (Palermo *et al.* 2009).

Ovviamente, siccome ciascun sistema macromolecolare ha una diversa tendenza antimicrobica, l'equilibrio idrofilico/idrofobico risulterà diverso a seconda della struttura e composizione dei polimeri.

Al fine di modulare al meglio tale bilancio sono state sviluppate delle strategie di sintesi applicabili a qualsiasi sistema che permettono di alterare la composizione o l'arrangiamento molecolare dei gruppi idrofobici e cationici (Fig.7). La prima strategia è detta "approccio *segregated*" (Fig.7a) e si ottiene copolimerizzando, in maniera random, monomeri idrofobici e cationici: il bilancio anfifilico può essere modificato variando il rapporto tra i due monomeri o cambiando la natura del monomero idrofobico (Gabriel *et al.*, 2009). Il secondo approccio detto "*facially amphiphilic*" (Fig. 7b), prevede che ogni unità monomerica abbia una porzione polare e una non polare cosicché, per modulare il bilancio, si può variare la natura della parte idrofobica (Gabriel *et al.* 2009). Infine il terzo approccio, detto "*same centered*" (Fig. 7c), prevede la sintesi di polimeri in cui le catene alchiliche sono direttamente legate ai gruppi carichi positivamente. In questo caso il bilancio viene modulato variando l'entità della catena alchilica stessa (Sambhy *et al.*, 2008).

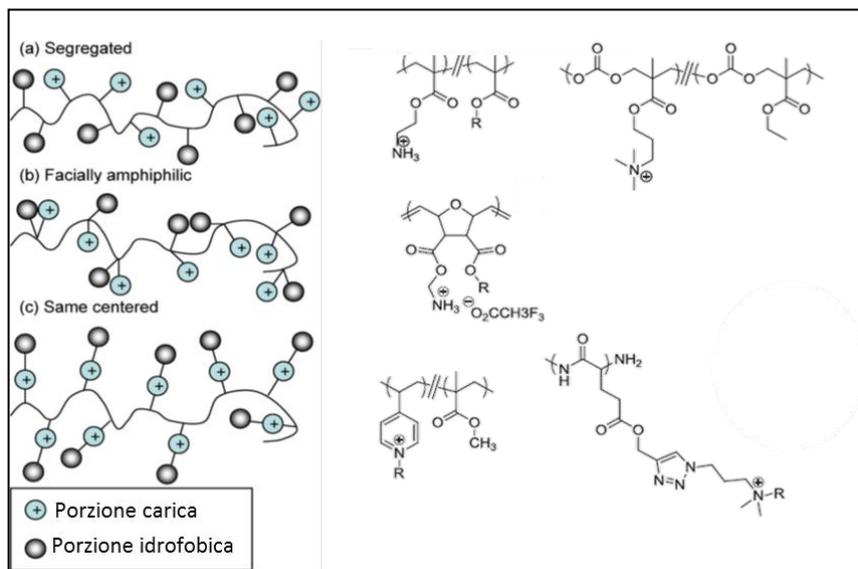


Figura 7- Modulazione del bilancio idrofobico/idrofilico secondo gli approcci: a) *Segregated*; b) *Facially amphiphilic*; e c) *Same centered* con relativi esempi (Engler *et al.*, 2012).

1.3.3 Architettura polimerica

A differenza degli agenti antimicrobici a basso peso molecolare, i polimeri possono essere sintetizzati con numerosi tipi di architetture, come: omopolimeri, copolimeri *random*, copolimeri a blocchi, telechelici o polimeri zwitterionici e ramificati, che influenzano a loro volta l'attività biologica dei polimeri a causa della diversa disposizione dei gruppi cationici ed idrofobici lungo la catena polimerica associata a ciascuna architettura (Fig. 8; Ganewatta *et al.*, 2015).

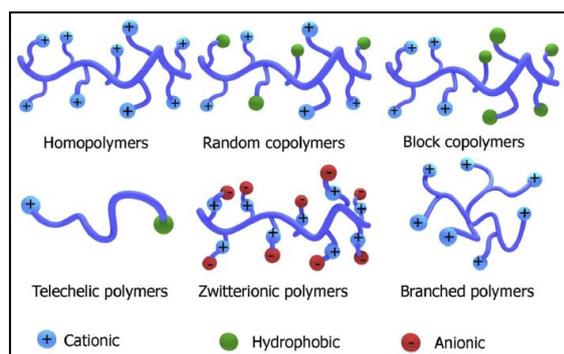


Figura 8- Architetture polimeriche comunemente utilizzate per preparare polimeri biocidi antimicrobici (Ganewatta *et al.*, 2015).

Tra queste, l'architettura polimerica più comune è quella lineare in cui le macromolecole possiedono solo due terminazioni di catena. Quando le catene presentano più ramificazioni, invece, si parla di polimeri ramificati e se tali ramificazioni sono tra loro interconnesse il polimero diventa reticolato e, in tal caso, non è possibile individuare le terminazioni di catena. Quest'ultima classe è quella che viene maggiormente utilizzata per la sintesi di polimeri biocidi in quanto offre un'ampia versatilità non solo nella composizione chimica ma anche nella struttura (Meneghetti *et al.*, 1999). La presenza di più catene ramificate polivalenti, infatti, fornisce un'elevata concentrazione locale di gruppi attivi, sia cationici che idrofobici, i quali possono agire in modo sinergico tra le varie catene (Chen *et al.*, 2000). Generalmente i polimeri biocidi ramificati, anche se solubili, difficilmente riescono a diffondersi all'interno delle cellule ma l'adsorbimento iniziale e il legame con le membrane cellulari risulta essere notevolmente maggiore rispetto ai polimeri lineari tanto da mostrare elevati livelli di distruzione delle membrane (Pasquier *et al.*, 2008). Tra le architetture copolimeriche di ultima generazione vi sono i copolimeri a stella, i dendroni e i polimeri dendronizzati, alcune di queste strutture sono riportate in Figura 9 (Qiu *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2001)

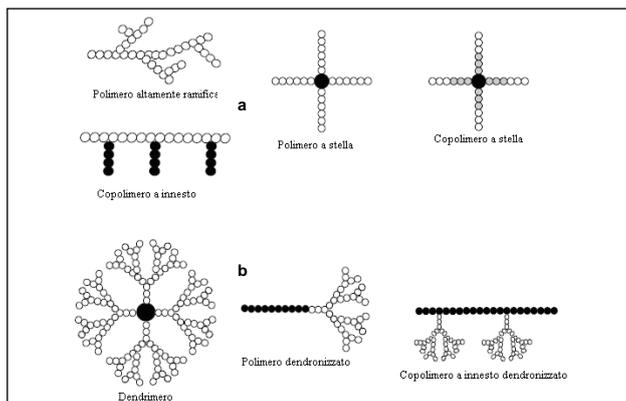


Figura 9- Architetture copolimeriche ramificate (polimeri a stella e polimeri iper-ramificati); (Qiu *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2001)

Nello specifico, i copolimeri a stella (Fig. 9a) sono costituiti da un punto centrale detto *core* da cui si dipartono catene polimeriche lineari. La sintesi di questi polimeri può essere condotta seguendo due approcci: l'approccio convergente (detto *arm-first*), e l'approccio divergente (o *core-first*) (Qiu *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2001). L'approccio convergente comporta la sintesi di ramificazioni polimeriche le quali, in un secondo momento, vengono chimicamente legate al *core* multifunzionale, che può essere una molecola a bassa massa molecolare o essa stessa una catena polimerica (Gao *et al.*, 2007). L'approccio della sintesi divergente, invece, prevede che un numero variabile di ramificazioni venga fatto crescere direttamente sul *core* opportunamente funzionalizzato (Bonilla *et al.*, 2012).

I polimeri a struttura dendritica sono, invece, sistemi macromolecolari altamente ramificati che possono essere sia a struttura controllata (come i dendroni e

i dendrimeri a innesto) che *random* (dendroni iper-ramificati) (Fig.9 b). Un dendrone è in generale una struttura polifunzionale a ramo d'albero con una punta focale che può reagire con un centro multi ramificato che funge da *core* a seguito di attivazione. L'accoppiamento di due o più dendroni su un unico *core* porta alla formazione di un dendrimero. Esistono due tipologie di sintesi per la preparazione dei dendrimeri: da un lato l'approccio convergente, ossia la crescita del dendrimero a partire dal suo *core* con progressiva aggiunta di ramificazioni successive, e dall'altro l'approccio divergente con crescita del dendrimero a partire dalla sintesi di diversi dendroni che vengono accoppiati ad un *core* comune (Worsfold *et al.*, 1969).

Comuni dendrimeri cationici antimicrobici vengono preparati funzionalizzando i gruppi finali dei dendrimeri con sali di ammonio quaternario come ad esempio le poliammidoammine (PAMAM), polipropilemine (PPI) e policarbossilani (PCS; Chen *et al.*, 2002; Fig. 10).

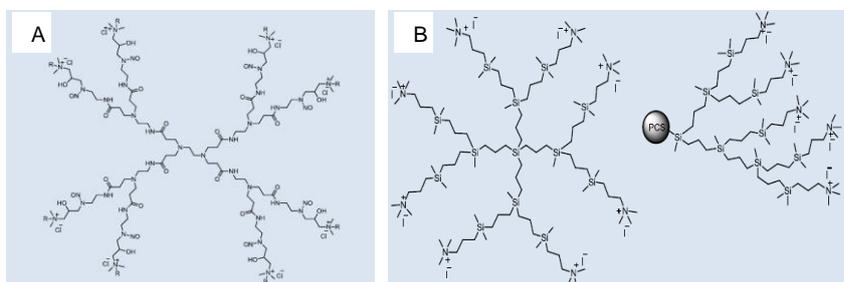


Figura 10- Dendrimeri cationici antimicrobici del tipo (A) poli-amidoammine (PAMAM) e (B) policarbossilani (PCS). (Worley *et al.*, 2014; Ortega *et al.*, 2011).

1.4 Meccanismo d'azione dei polimeri biocidi con CAQ

I polimeri biocidi sono generalmente riconosciuti come composti in grado di interagire elettrostaticamente con le superfici anioniche dei microrganismi danneggiando le loro membrane cellulari sino ad indurre la morte della cellula (Hamilton, 1968; Marcotte *et al.*, 2005).

Sebbene ci siano ancora controversie in merito, i meccanismi d'azione proposti per i polimeri con CAQ sono simili a quelli riportati per i peptidi antimicrobici cationici (AMP), presenti nel sistema immunitario di tutti gli organismi, i quali distruggono, riorganizzano o formano dei pori all'interno delle membrane cellulari batteriche sino ad indurre la morte dei microrganismi (Brogden, 2005; Maroti *et al.*, 2011).

Gli AMP sono costituiti da una piccola sequenza di amminoacidi carica positivamente e anfipatica recante gruppi laterali idrofobici e cationici esposti

separatamente lungo la catena peptidica (Matsuzaki *et al.*, 2009). La principale caratteristica del loro meccanismo d'azione è la capacità degli AMP di agire esclusivamente sulle membrane cellulari batteriche in quanto differiscono notevolmente per composizione lipidica e struttura rispetto a quelle dell'uomo (Matsuzaki *et al.*, 2009). L'iniziale interazione degli AMP con le cellule è dovuta all'attrazione elettrostatica con l'*envelope* cellulare che, nonostante differisca a seconda della tipologia di batterio, possiede sempre una carica negativa. L'*envelope* cellulare dei batteri gram positivi è generalmente costituito da uno spesso strato di peptidoglicano (parete cellulare) e da una membrana interna fosfolipidica (membrana citoplasmatica; Fig.11 A). Quello dei batteri gram negativi, invece, oltre a questi possiede anche un'ulteriore membrana protettiva, detta membrana esterna, caratterizzata dalla presenza di porine e lipopolisaccaridi, (LPS) che conferiscono maggiore resistenza alla cellula (Fig.11 B). Nelle prime fasi dell'interazione batterio-peptide, quest'ultimo si lega con i suoi aminoacidi basici alle molecole cariche negativamente esposte sulla superficie batterica, costituite dagli acidi teicoici e teicuronici nei batteri gram positivi o dai componenti del lipopolisaccaride (es. lipide A) nei batteri gram-negativi (Jenssen, 2006).

Il processo mediante il quale gli AMP raggiungono la membrana citoplasmatica è stato maggiormente studiato nei batteri gram-negativi a causa della complessità della struttura della loro membrana esterna (Jahnsen *et al.*, 2012). La membrana esterna dei batteri gram-negativi è asimmetrica ed è costituita internamente dai fosfolipidi ed esternamente dal glicolipide polianionico LPS (Wu *and* Hancock, 1999). Le cariche negative dell' LPS sono dovute alla presenza di fosfati e zuccheri acidi, collegati tra loro da cationi bivalenti come Ca^{2+} and Mg^{2+} che neutralizzano parzialmente la carica negativa e stabilizzano la membrana esterna (Franklin and Snow, 2005). Dopo essere stati attratti dai batteri gram-negativi, gli AMP si sostituiscono a tali cationi e tendono ad inserirsi, mediante le loro porzioni idrofobiche, nel doppio strato lipidico causando l'alterazione della permeabilità della membrana esterna (Wiley *et al.*, 2008; Kumar and Schweizer, 2005; Epanand and Epanand 2009; Matsuzaki 2009). Nel caso dei batteri gram positivi invece, dopo l'attrazione con i gruppi fosfato e carbossilici degli acidi teicoici presenti sulla superficie cellulare, gli AMP si accumulano e attraversano lo spesso strato di peptidoglicano che circonda la membrana interna (Brogden, 2005).

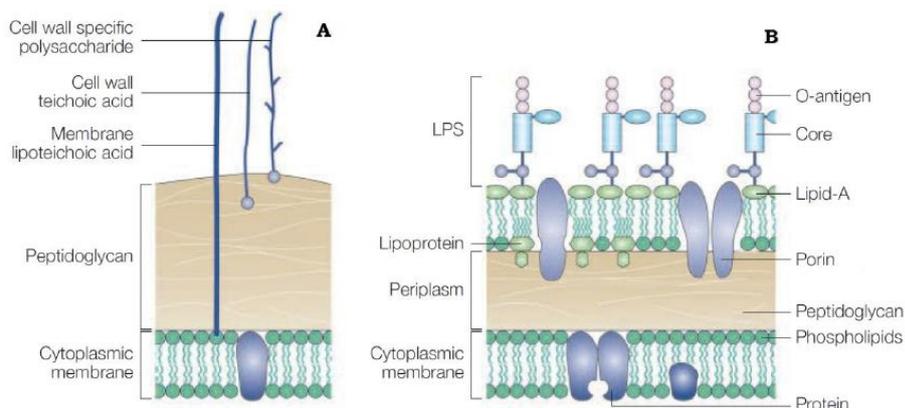


Figura 11- Struttura delle membrane cellulari dei batteri gram positivi (A) e gram negativi (B); (Lolis and Bucula, 2003).

Raggiunta la membrana citoplasmatica, la quale rappresenta il bersaglio finale, gli AMP interagiscono con i gruppi carichi negativamente dei fosfolipidi esposti sul foglietto esterno della membrana. La membrana risulta, infatti, dotata di una carica netta negativa molto elevata per la presenza di fosfatidiletanolamina, cardiolipina e fosfatidilglicerolo e di un elevato potenziale transmembrana (-140 mV) che favorisce l'interazione con i peptidi stessi i quali distruggono la membrana causando la fuoriuscita del contenuto citoplasmatico e di conseguenza la morte del batterio (Yeaman and Yount, 2005). Le membrane delle cellule vegetali ed animali invece risultano relativamente resistenti all'attività dei peptidi cationici in quanto costituite principalmente da lipidi zwitterionici (fosfatidilcolina e sfingomielina) e, di conseguenza, dotate di una più bassa carica netta negativa rispetto alle membrane batteriche (Wessman *et al.*, 2008).

Sono stati proposti diversi modelli che spiegano come i peptidi antimicrobici danneggiano l'integrità della membrana citoplasmatica (Fig. 12) anche se, recentemente, sono stati scoperti altri modelli che hanno come bersaglio alcuni processi cellulari chiave della cellula, come: la sintesi di proteine e DNA, la sintesi della parete cellulare, l'attività di alcuni enzimi (Jenssen *et al.*, 2006). Tuttavia l'interazione con le membrane batteriche è fondamentale anche nel caso di bersagli intracellulari poiché rappresenta un mezzo di traslocazione inevitabile.

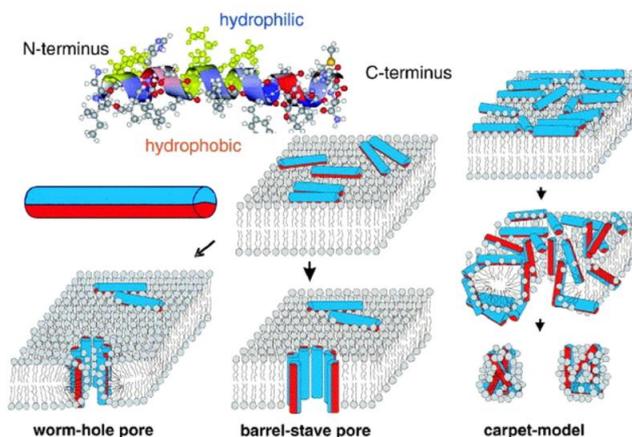


Figura 12- Meccanismi di azione dei peptidi antimicrobici che causano la formazione di pori (*worm-hole pore* e *barrel-stave pore*) o la destabilizzazione (*carpet model*) delle membrane cellulari (Ganewatta *et al.*, 2015)

I meccanismi con cui gli AMP causano danni alle membrane vengono distinti a seconda della formazione o meno di pori (Melo *et al.*, 2009; Hale and Hancock, 2007). Nel primo caso vengono descritti due modelli di interazione: “*barrel stave*” e “*worm-hole*” con cui i polimeri si inseriscono perpendicolarmente nello strato lipidico delle membrane. Nel modello “*barrel stave*” la formazione dei pori è dovuta all’interazione specifica peptide-peptide, producendo nano pori dal diametro di 1-2 nm (Ganewatta *et al.*, 2015; Fig. 12). Al contrario, nel “*worm-hole*” non si hanno interazioni peptide specifico ma i polimeri influenzano la curvatura locale del doppio strato lipidico inducendo dei pori leggermente più grandi (3-10 nm di diametro), la cui dimensione varia a seconda dello stato di idratazione della membrana stessa (Brodgen *et al.*, 2005; Fig. 12).

Nel caso di meccanismi che non prevedono la formazione di pori gli AMP interagiscono parallelamente con la superficie delle membrane e risultano attivi solo quando hanno raggiunto un’elevata concentrazione, tanto da formare un tappeto sulla superficie. Secondo tale modello, denominato “*carpet model*”, gli AMP producono dei larghi difetti sulla superficie, raggiungono anche 10 nm di dimensioni disintegrandola a causa delle forti interazioni elettrostatiche tra peptidi e membrane (Hale and Hancock, 2007).

Per quanto riguarda invece gli aspetti meccanicistici con cui i polimeri biocidi sintetici interagiscono con le membrane è generalmente accettato che essi, come nel caso dei peptidi antimicrobici, in prossimità delle membrane cellulari adottano una conformazione anfifilica in cui i gruppi idrofobici e cationici vengono fisicamente separati (Ganewatta *et al.*, 2015; Palermo *et al.*, 2012; Baul *et al.*, 2014). Tuttavia, come descritto per gli AMP, esistono due teorie sulla modalità con cui essi inducono la morte delle cellule batteriche. Alcuni autori sostengono che i polimeri biocidi con CAQ danneggiano irreversibilmente le membrane cellulari a causa della penetrazione delle loro catene idrofobiche all’interno della cellula. Ad esempio Waschinski and Tiller hanno dimostrato che i polimeri costituiti da poli 2-alchil-1,3-ossazolina (POX) con gruppi terminali di ammonio quaternario formano dei pori nelle membrane a causa del partizionamento delle catene alchiliche nella cellula,

sostenendo inoltre che l'attività antimicrobica dei polimeri è connessa alla lunghezza delle catene idrofobiche (Waschinski and Tiller, 2005; Fig. 13).

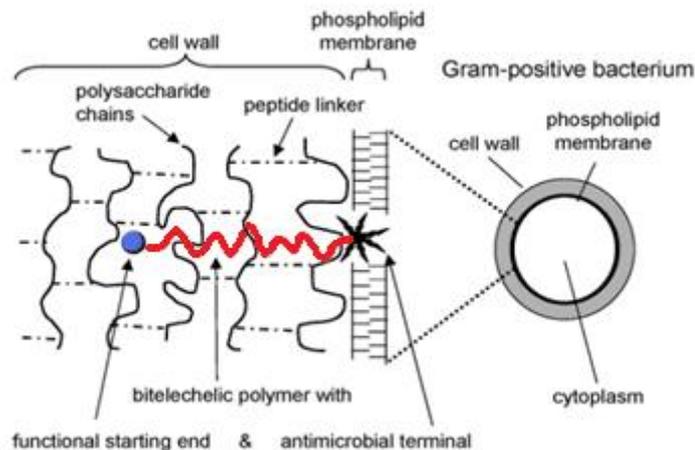


Figura 13- Meccanismo di azione basato sulla penetrazione delle catene idrofobiche dei polimeri POX-CAQ solubili all'interno delle membrane cellulari di un batterio gram positivo (Waschinski and Tiller, 2005).

Altri autori, invece, hanno osservato che, dopo l'iniziale interazione delle cariche positive dei polimeri CAQ e le cariche negative della superficie cellulare, l'ingresso dei polimeri nello strato di peptidoglicano non è influenzato solo dalla penetrazione delle catene idrofobiche ma anche da una destabilizzazione delle membrane dovuta ad un processo di scambio di specie ioniche, come Ca^{2+} e Mg^{2+} , responsabili della stabilità delle membrane cellulari (Fig. 14; Gilbert and Moore 2005). Secondo Gilbert e Moore, dopo l'associazione dei polimeri con i principali fosfolipidi di membrana, come ad esempio la fosfatidiletanolamina che costituisce il 70% della composizione della membrana, gli ammoni quaternari causano lo spiazzamento dei cationi bivalenti Ca^{2+} e Mg^{2+} che non solo rappresentano i controioni dei fosfolipidi ma sono responsabili anche della stabilità ed integrità dello strato fosfolipidico (Fig. 14 b).

Le funzioni della membrana subiscono ulteriori alterazioni a causa del successivo ingresso della porzione idrofobica dei polimeri che denatura le proteine strutturali di membrana e distrugge l'integrità dello strato lipidico (Fig.14 c,d). Inoltre, è stato dimostrato che i danni apportati dai polimeri di CAQ sono connessi alla loro concentrazione (Gilbert and Moore 2005). A basse concentrazioni, di fatti, l'interazione tra polimero e membrane causa un aumento della pressione superficiale sullo strato lipidico esposto al polimero, tale da diminuire la fluidità della membrana e la temperatura di transizione di fase (Gilbert and Moore 2005). Le membrane subiscono una transizione dallo stato fluido a liquido cristallino con la conseguente perdita di molte funzioni fisiologiche e osmoregolatrici (Fig.14d) ed, inoltre, diminuisce anche l'idrofobicità del core delle membrane ed i fosfolipidi tendono ad assumere uno riarrangiamento esagonale più stabile.

La presenza di un'elevata concentrazione di polimeri, invece, induce la formazione di aggregati micellari che solubilizzano completamente i fosfolipidi e le proteine di membrana causando il rilascio di materiale intracellulare, la lisi cellulare ed infine la morte della cellula (Fig.14e,f; Gilbert and Moore 2005; Hegstad *et al.*, 2010).

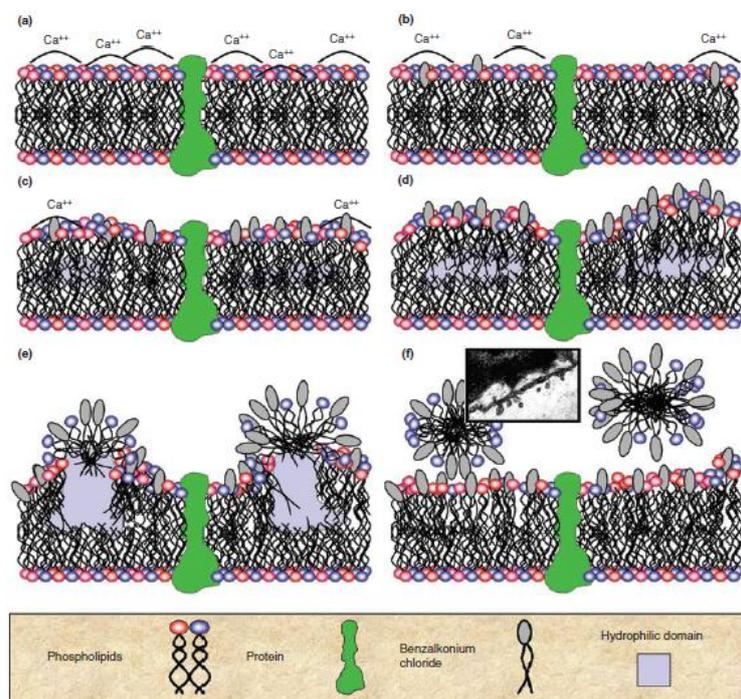


Figura 14- Meccanismo d'azione basato sulla destabilizzazione delle membrane cellulari da parte dei polimeri con CAQ a causa dello scambio di specie ioniche. Le figure (a-f) mostrano il progressivo adsorbimento dei gruppi quaternari ai fosfolipidi acidi di membrana in funzione della crescente concentrazione dei polimeri (Gilbert and Moore 2005).

1.5 Superfici antimicrobiche

Nonostante i batteri possano esistere e crescere in uno stato planctonico, ossia liberi di proliferare in un mezzo fluido, essi preferiscono aderire sulle superfici costruendo una particolare struttura tridimensionale nota come biofilm, una matrice polisaccaridica che intrappola e protegge le cellule conferendo maggiore resistenza agli agenti antimicrobici permettendo così ai microrganismi di sopravvivere anche in condizioni ambientali avverse (Dunne, 2002; Gao *et al.*, 2011; Harding and Reynolds, 2014; Salwiczek *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014).

Per tale motivo la ricerca scientifica si è focalizzata non solo sulla sintesi di efficienti polimeri antimicrobici solubili ma anche sullo sviluppo di superfici antimicrobiche che potessero evitare a monte la contaminazione dei materiali (Tiller *et al.*, 2001; Siedenbiedel *et al.*, 2012). Tali superfici sono state ottenute innestando piccole molecole o polimeri su diversi substrati dando vita a due tipologie di superfici antimicrobiche: quelle repellenti, o biopassive, destinate soltanto ad inibire o ridurre l'adesione dei microrganismi sulle superfici (Fig. 15.1), e quelle batteriostatiche, o

bioattive, destinate ad uccidere i microrganismi adesi mediante il rilascio o l'immobilizzazione di agenti antimicrobici sulle superfici (Fig. 15.2; Siedenbiedel *et al.*, 2012).

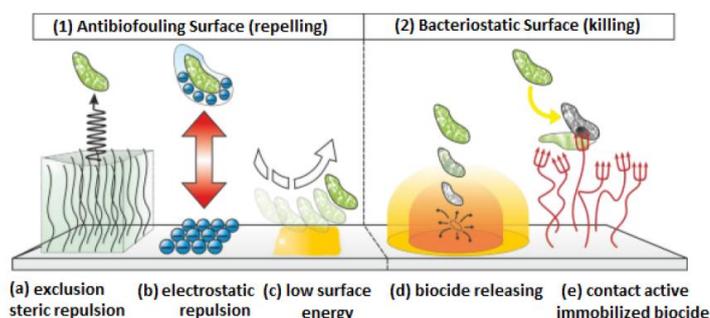


Figura 15- Esempi di superfici antimicrobiche ottenute mediante l'approccio 1) biopassivo e 2) bioattivo (Siedenbiedel *et al.*, 2012)

Le superfici repellenti sono realizzate trattando i materiali sia con polimeri zwitterionici come il polietilenglicole (PEG) che con polimeri carichi negativamente oppure mediante modifiche ultraidrofobiche delle superficie (Ciston *et al.*, 2008; Whitehead *et al.*, 2006). La seconda classe di superfici antimicrobiche è costituita, invece, da materiali che uccidono i batteri per contatto, sia rilasciando agenti biocidi nell'ambiente, che immobilizzandoli permanentemente sulle superficie (Jeon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

Queste ultime rappresentano l'alternativa maggiormente valida rispetto alle altre in quanto l'immobilizzazione dei polimeri permette di ottenere delle superficie permanentemente antimicrobiche eliminando il problema associato al rilascio di biocidi nell'ambiente (Ferreira and Zumbuehl, 2009; Kugel *et al.*, 2011; Haldar *et al.*, 2006).

1.5.1 Superfici antimicrobiche costituite da polimeri biocidi con CAQ

I polimeri biocidi costituiti da CAQ oltre che per la loro capacità antimicrobica in soluzione sono stati utilizzati anche per creare delle superficie permanentemente antimicrobiche (Oyane *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2002). Molti autori hanno di fatto dimostrato che l'immobilizzazione dei polimeri con CAQ su materiali di diversa natura come legno, carta (Lee *et al.*, 2004), metalli (Ignatova *et al.*, 2004), vetro (Tiller *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004) o superficie polimeriche (Cen *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2005) ha mostrato un'efficiente attività biocidica dovuta ad un meccanismo d'azione che avviene esclusivamente per contatto con i microrganismi.

I CAQ possono essere immobilizzati sulle superfici sia ancorando monostrati di piccole molecole oppure aggiungendo direttamente i polimeri con CAQ (Simoncic *et al.*, 2010; Caillier *et al.*, 2009; Barbey *et al.*, 2009; Fig.16)

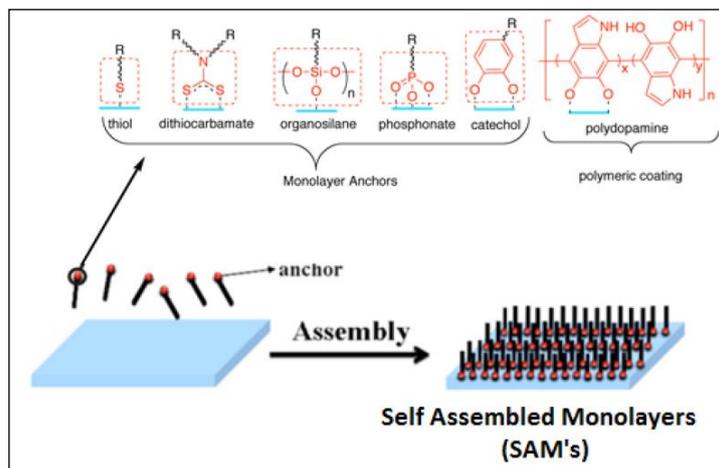


Figura 16- Esempi di ancoraggio di monostrati di piccole molecole e di polimeri cationici su diversi substrati (Barbey *et al.*, 2009)

L'innesto dei polimeri sulle superfici detto anche "grafting" può essere realizzato secondo tre approcci: (i) fisisorbimento dei polimeri sulla superficie (approccio *grafting to*), (ii) chemiassorbimento mediante reazione di ancoraggio dei polimeri con gruppi funzionali complementari alla superficie del substrato (approccio *grafting to*), (iii) attaccamento dei polimeri mediante tecnica di polimerizzazione radicalica per trasferimento di atomi (ATPR) (approccio *grafting from*), (Frstrup *et al.*, 2009; Barbey *et al.*, 2009; Fig. 17).

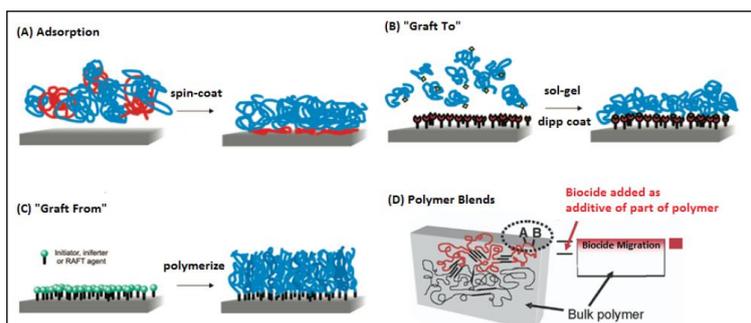


Figura 17- Esempi riportati in letteratura delle diverse strategie di immobilizzazione degli agenti biocidi sulle superfici. (A) Superfici ottenute mediante adsorbimento di sottili film polimerici su materiali compatibili, (B) superfici ottenute mediante auto assemblaggio di piccole molecole (SAM) o di polimeri (SAP), (C)

Innesto dei polimeri sulle superfici mediante la preimmobilizzazione di un iniziatore mediante tecnica di Polimerizzazione Radicalica per Trasferimento di Atomi (ATPR) o (D) aggiunta dell'agente biocida durante o prima del processo di polimerizzazione mediante approccio *grafting from*. (Barbey *et al.*, 2009)

Tuttavia, nonostante tali tecniche siano utilizzate per rivestire la maggior parte delle superfici antimicrobiche sino ad ora descritte non sempre permettano di ottenere un efficace prodotto finale. Ad esempio, con la tecnica del "*grafting to*" è possibile innestare polimeri con architetture molto complesse ma tale innesto causa anche una distribuzione disomogenea della densità di carica e quindi una riduzione dell'attività antimicrobica. Al contrario, la tecnica del "*grafting from*", permette di ottenere un maggiore controllo della densità di carica superficiale, ma con essa non è possibile innestare architetture polimeriche più complesse che potrebbero migliorare l'attività antibatterica delle superfici (Barbey *et al.*, 2009). Inoltre, in entrambi i casi, è richiesto che l'introduzione dei gruppi di ammonio quaternario debba essere preceduta dalla quaternizzazione al fine di essere permanentemente carichi.

1.5.2 Meccanismo d'azione delle superfici antimicrobiche costituite da polimeri biocidi con CAQ

In letteratura è stato ampiamente dimostrato che l'efficienza dei polimeri biocidi può essere preservata dopo l'immobilizzazione sulle superfici rendendole antimicrobiche mediante un meccanismo d'azione che si svolge prevalentemente per contatto (Milović *et al.*, 2005; Tiller *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2006; Venkataraman *et al.*, 2010; Waschinski *et al.*, 2008).

Tuttavia, l'efficienza di tali polimeri è influenzata da parametri strutturali differenti rispetto a quelli descritti per i polimeri CAQ solubili in quanto, l'innesto sulle superfici, ne riduce notevolmente la libertà di movimento e quindi la possibilità di attaccare i microrganismi secondo un meccanismo isotropico (Timofeeva *et al.*, 2011). L'adesione dei batteri sulle superfici è, difatti, dipendente da tre fattori: carica superficiale, idrofobicità e rugosità della superficie (Terada *et al.*, 2006). L'attrazione elettrostatica esercitata dalle carica superficiale gioca un ruolo fondamentale affinché i batteri aderiscano alle superfici, mentre l'idrofobicità ne favorisce l'adsorbimento (An and Friedman 1998). Inoltre, le superfici rugose tendono ad trattenere maggiormente le cellule microbiche, permettendo una maggiore adesione delle stesse ai polimeri biocidi (Terada *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione dei polimeri immobilizzati, sono state proposte ipotesi discordanti sia sui parametri strutturali che influenzano la progettazione, sia sulla modalità con cui agiscono sulle cellule microbiche. Alcuni autori sostengono che il meccanismo d'azione delle superfici polimeriche sia lo stesso di quello ipotizzato per i polimeri in soluzione (Tiller *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2010); altri, invece, sostengono che esistono dei meccanismi totalmente differenti (Asri *et al.*, 2014; Bieser and Tiller, 2011; Li *et al.*, 2011). In base a tali studi, sono stati proposti tre meccanismi d'azione che potrebbero spiegare la modalità con cui le superfici polimeriche agiscono distruggendo le membrane cellulari.

Nel primo meccanismo (detto *polymeric spacer effect*) si ipotizza che, i polimeri biocidi con CAQ innestati sulle superfici siano in grado di penetrare all'interno della parete cellulare dei batteri adesi, raggiungendo e distruggendo fisicamente la

membrana citoplasmatica (Wong *et al.*, 2010; Tiller *et al.*, 2001; Siedenbiedel *et al.*, 2012; Gozzelino *et al.*, 2013; Fig. 18). Tale meccanismo presuppone che, siccome la parete cellulare dei batteri ha uno spessore variabile da 16 a 80 nm, i polimeri innestati debbano possedere delle catene alchiliche sufficientemente flessibili e lunghe (> 100 nm) per poter attraversare completamente l'*envelope* cellulare (Tiller *et al.*, 2001; Tiller 2010).

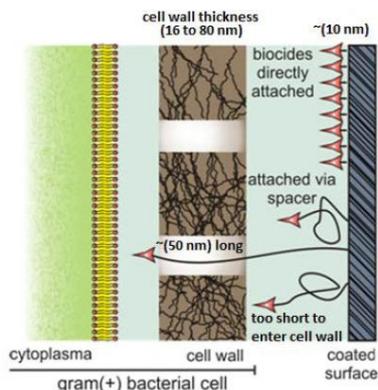


Figura 18- Permeabilizzazione delle membrane cellulari batteriche a causa della penetrazione delle catene idrofobiche dei polimeri innestati sulle superfici (Tiller, 2011; Siedenbiedel *et al.*, 2012)

Un secondo meccanismo di distruzione delle membrane è stato proposto dopo la scoperta che alcuni polimeri cationici, con gruppi alchilici di lunghezza inferiore a 10 nm, mostravano un'efficiente attività antimicrobica nonostante la loro catena polimerica fosse troppo corta per poter attraversare l'*envelope* cellulare (Murata *et al.*, 2007; Kugler *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004). In accordo con questi autori, l'attività antimicrobica delle superfici polimeriche è legata esclusivamente alla concentrazione delle cariche cationiche esposte sulle superfici. Kugler e Murata hanno separatamente ipotizzato che quando i polimeri immobilizzati sulle superfici possiedono una densità di carica compresa tra 10^2 - 10^{16} N/cm², esercitano un meccanismo d'azione detto "*Ion-Exchange*" ossia interagiscono elettrostaticamente con le cariche negative delle cellule batteriche inducendo la perdita dei cationi divalenti responsabili dell'integrità delle membrane cellulari, come Ca²⁺ e Mg²⁺, e di conseguenza la morte dei batteri (Kugler *et al.*, 2005; Murata *et al.*, 2007).

Infine, recentemente, Li, Bieser e Asri hanno proposto un terzo meccanismo d'azione, definito "*phospholipid sponge effect*", basato sull'ipotesi che le superfici cationiche, a causa del campo elettrico generato dalla presenza di cariche positive, sono in grado di esercitare delle forze di adesione talmente elevate da strappare letteralmente i fosfolipidi anionici di membrana, senza che ciò sia accompagnato dallo scambio di ioni divalenti (Li *et al.*, 2011; Bieser and Tiller, 2011; Asri *et al.*, 2014; Fig. 19).

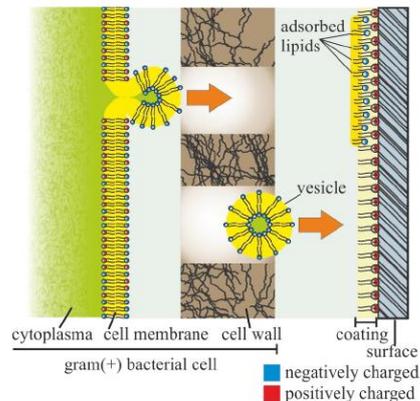


Figura 19- Distruzione delle membrane cellulari a causa della destabilizzazione indotta dall'elevata densità di carica superficiale presente sulle superfici antimicrobiche (Siedenbiedel *et al.*, 2012)

In base a tale meccanismo è stato inoltre ipotizzato che i batteri reagiscono in modo diverso a seconda dell'intensità della forza di adesione con cui si depositano sulle superfici. Nello specifico sono state proposte tre regimi di forze (Busscher *et al.*, 2012; Fig.20):

1. *Regime planctonico* in cui i batteri a causa delle deboli forze di adesione non aderiscono alla superficie e restano nel loro stato planctonico rimanendo suscettibili agli antimicrobici;
2. *Regime di interazione* in cui le forze di adesione inducono una serie di cambiamenti genotipici e fenotipici che rendono i microrganismi più resistenti agli antimicrobici
3. *Regime letale* in cui le forze di adesione de-attivano i batteri adesi alle superfici riducendone la crescita e causando la morte cellulare.

Liu e collaboratori hanno successivamente coniato il termine "stress indotto da de-attivazione", per indicare quei batteri che, a causa della forte adesione con le superfici cariche positivamente, dimostrano una ridotta resistenza agli agenti antimicrobici (Liu *et al.*, 2008).

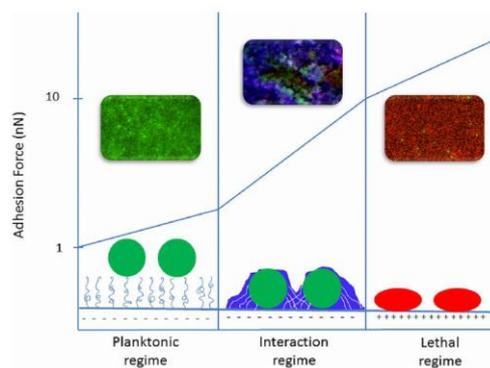


Figura 20- Risposta indotta dai microrganismi a seconda del regime delle forze di adesione esercitata dalle superfici cationiche (Busscher *et al.*, 2012).

2.1 PEG(MMA-DMAEMA)_n: nuove superfici intrinsecamente antimicrobiche

Nell'ultimo decennio, diversi sono stati i metodi utilizzati per innestare efficacemente polimeri con composti di ammonio quaternario su substrati di varia natura (Huang *et al.*, 2007; Caillier *et al.*, 2009; Barbey *et al.*, 2009). Tuttavia, tali tecniche non sono state sempre efficienti in quanto i polimeri, dopo l'immobilizzazione od insolubilizzazione, risultavano spesso inattivi a causa delle modifiche chimico-fisiche che subivano (Kawabata *et al.*, 1988; Tiller *et al.*, 2001; Timofeeva *et al.*, 2011).

Al fine di trovare una soluzione a tale problema, recentemente, il gruppo di ricerca della Dott.ssa Lorella Izzo del Dipartimento di Chimica e Biologia dell'Università degli Studi di Salerno, ha dato vita ad una nuova famiglia di superfici intrinsecamente antimicrobiche che non prevede l'immobilizzazione dei polimeri su substrati (Vigliotta *et al.*, 2012). Tali superfici sono costituite da copolimeri ramificati anfifilici, insolubili in acqua, contenenti gruppi di dimetilammino etilmetacrilato (DMAEMA) non quaternizzati che, in presenza di un ambiente umido (pK_b~ 3.1), formano spontaneamente ammoni quaternari responsabili dell'attività antimicrobica.

I copolimeri in esame hanno un'architettura di tipo **A(BC)_n** in cui "n" rappresenta il numero di ramificazioni (n= 1, 2, 4) mentre A e BC i costituenti del polimero. In particolare "A" è un blocco a base di monometossi poli(etilenglicole) (mPEG), e "BC" una catena polimerica random costituita da metilmetacrilato (MMA) e 2-(dimetilammino) etilmetacrilato (DMAEMA; Fig. 21).

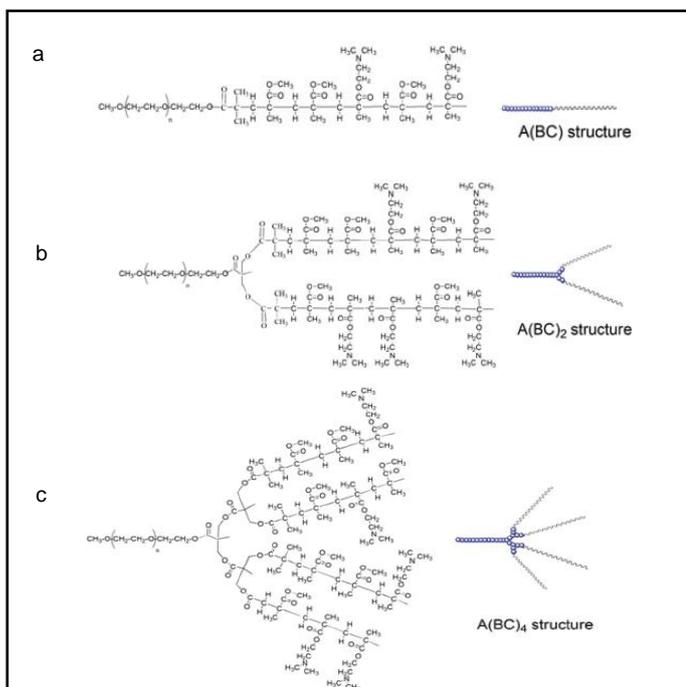


Figura 22- Rappresentazione schematica dell'architettura a) A(BC); b) A(BC)₂; c) A(BC)₄ dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n (Vigliotta *et al.*, 2012)

La presenza della catena di PEG, grazie alle sue proprietà intrinseche (Meng *et al.*, 2004), evita l'adesione dei batteri sulla superficie e produce un ambiente idrofilico necessario per la protonazione dei gruppi amminici dei monomeri di DMAEMA (Fig. 22). Questi ultimi rappresentano di fatto la porzione carica dei copolimeri anfifilici, mentre la porzione idrofobica è costituita dai monomeri di MMA che rendono i copolimeri insolubili in acqua e fungono da spaziatori tra le catene di DMAEMA (Gelman *et al.*, 2004; Ponti *and* Mella, 2011).

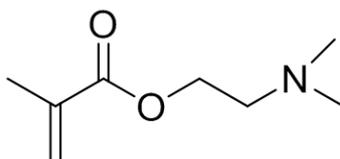


Figura 22- Struttura del monomero di 2-dimetilammino etilmetacrilato (DMAEMA) responsabile dell'attività antimicrobica delle nuove superfici PEG(MMA-DMAEMA)_n

2.2 Le proprietà antimicrobiche dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n dipendono dall'architettura polimerica

Studi antimicrobici condotti sulle tre tipologie di copolimeri mostrati in Figura 23 hanno dimostrato che, a parità di ammontare del monomero DMAEMA, l'attività antimicrobica di tali superfici dipende strettamente dal grado di ramificazione della struttura (Vigliotta *et al.*, 2012). Tutti i copolimeri mostrano nel tempo una efficiente attività biocida ma, dopo le prime 5 ore di contatto dei film polimerici con i batteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* e *Dechlorosoma sp.* il copolimero A(BC)₂ mostra una capacità battericida leggermente maggiore del polimero A(BC)₄, mentre il corrispondente polimero lineare, privo di monomeri di DMAEMA e quindi di cariche, è quasi inattivo (Fig. 23).

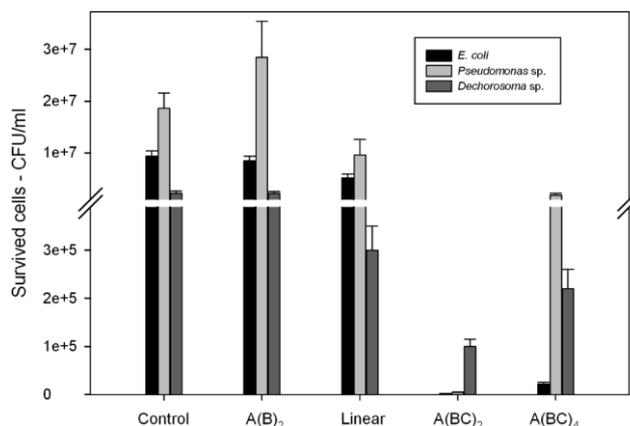


Figura 23- Confronto tra l'attività antimicrobica del copolimero lineare A(BC), dei copolimeri ramificati, A(BC)₂ e A(BC)₄ e del copolimero di controllo A(B)₂ rispetto alla sospensione batterica priva di polimeri (Control) espressa come numero di unità formanti colonie (UFC) dei batteri *E.coli*, *Pseudomonas sp.* e *Dechlorosoma sp.* dopo 5 ore di trattamento. Gli istogrammi rappresentano la media delle UFC ottenute da tre esperimenti ± la deviazione standard (Vigliotta *et al.*, 2012).

La diversa attività battericida dei copolimeri è stata attribuita ad un diverso ammontare di cariche cationiche presenti nei film polimerici. Difatti, la presenza di gruppi ammonio, responsabili dell'attività antimicrobica, varia al variare della struttura, ipotesi confermata sperimentalmente tramite saggi di assorbimento degli anioni benzoato da parte dei film polimerici. Come si evince dalla Figura 24 i copolimeri con struttura A(BC)₂ hanno mostrato la maggiore tendenza ad assorbire gli anioni benzoato in quanto possiedono una maggiore concentrazione di cariche cationiche rispetto alle altre due strutture (Vigliotta *et al.*, 2012).

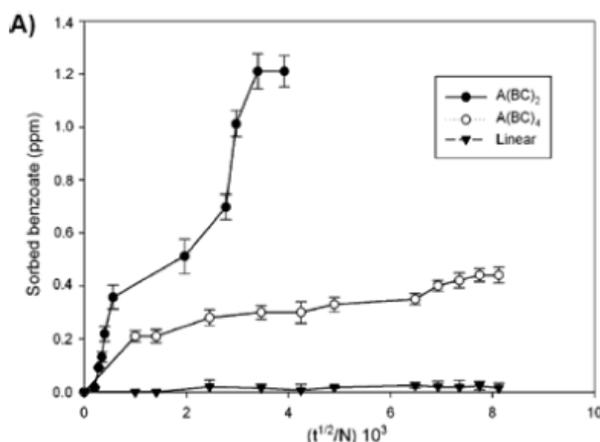


Figura 24- Confronto tra la concentrazione di anioni benzoato assorbita dai copolimeri A(BC)_n in funzione dell'ammontare delle loro cariche cationiche (Vigliotta *et al.*, 2012).

2.3 Ruolo dell'architettura polimerica A(BC)₂ nella formazione di legami ad idrogeno tra i gruppi amminici dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n

Si è ipotizzato che il diverso comportamento antimicrobico delle tre architetture A(BC), A(BC)₂ e A(BC)₄ con la stessa quantità di gruppi DMAEMA, potesse essere attribuito alla loro attitudine a formare legami idrogeno tra gruppi amminici neutri e protonati (Meuwl *and* Karplus 2002; Ponti *and* Mella, 2003). A sostegno di questa ipotesi è stata calcolata la diversa attitudine dei copolimeri a formare legami ad idrogeno che spiegherebbero la diversa quantità di carica positiva dei tre copolimeri come evidenziato negli esperimenti con gli anioni benzoato. Tali calcoli hanno dimostrato che i legami ad idrogeno, che determinano la formazione di "dimeri" del tipo --N(CH₃)₂--H⁺N(CH₃)₂-, stabilizzano la carica positiva sull'atomo di azoto di un ammontare pari a circa 6 kcal/mol. Per ragioni dovute alla distanza, la loro formazione può avvenire inter-catena oppure intra-catena, tra pendagli di monomeri vicini o alternati ad un monomero di MMA (Fig. 25). La probabilità di formare dimeri inter-catena è risultata essere 2.5 volte superiore nei copolimeri ramificati A(BC)₂ e A(BC)₄ rispetto ai lineari A(BC), spiegando così la maggiore attività battericida dei polimeri ramificati già nelle prime ore di contatto con i batteri (5 ore).

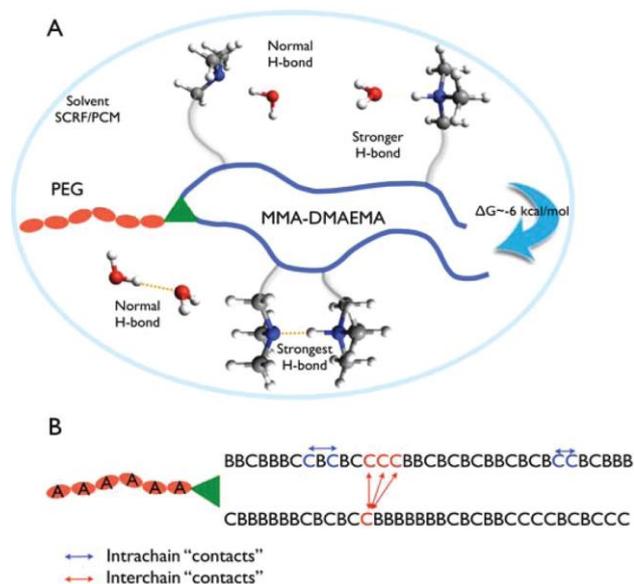


Figura 25- (A) Rappresentazione schematica del processo di dimerizzazione tra gruppi amminici protonati e neutri nelle catene di MMA-DMAEMA. (B) Definizione di interazioni intra e inter catena tra i gruppi DMAEMA (Vigliotta *et al.*, 2012)

2.4 Attività antimicrobica dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n

Per stabilire se i copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n agissero mediante il rilascio di molecole biocide nella sospensione batterica oppure mediante un meccanismo per contatto, Vigliotta e collaboratori hanno svolto diversi esperimenti finalizzati a valutare l'attività antimicrobica dei film polimerici. Nello specifico sono stati condotti dei saggi microbiologici di diffusione ponendo i film sulla superficie di terreni di coltura agarizzati contenenti il batterio gram negativo *Escherichia coli* ed il batterio gram positivo *Staphylococcus aureus*. L'attività antimicrobica dei copolimeri è stata confrontata con l'azione battericida dell'ampicillina, antibiotico solubile che agisce per diffusione (Vigliotta *et al.*, 2012). Come mostrato in Figura 26 la crescita dei batteri sulla superficie di agar in contatto con il copolimero A(BC)₂ (f) è stata totalmente inibita dopo 24 ore di trattamento soltanto nella zona a diretto contatto col film (Fig.26 2A, 4B). Al contrario, l'ampicillina (C), ha inibito la crescita non solo dei microrganismi direttamente a contatto con essa ma anche di quelli circostanti come evidenziato dalla presenza dell'alone di inibizione a causa della diffusione dell'antibiotico nel terreno di coltura (Fig. 26A, B).

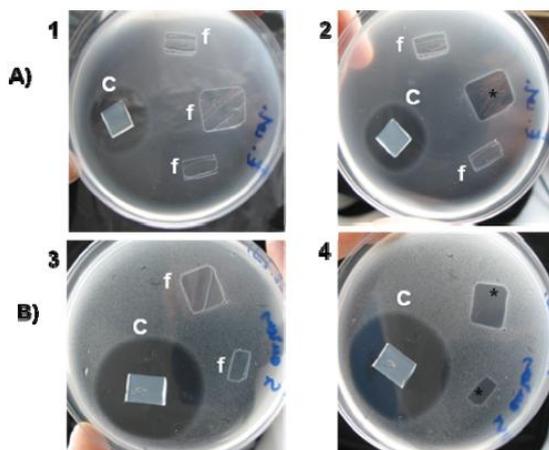


Figura 26- Saggi microbiologici di diffusione del polimero A(BC)₂ sul batterio (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*. Pezzi di LB agarizzato contenente ampicillina, usati come controllo positivo di diffusione, sono indicati con la lettera C mentre film A(BC)₂ con la lettera f. In tutte le foto la diffusione della penicillina (C) è evidente dalla formazione dell'alone circolare che inibisce la crescita dei microrganismi intorno al pezzo di LB agarizzato contenete l'antibiotico. In prossimità dei films (f) invece, non si osserva alcuna riduzione della crescita dei microrganismi la quale è evidente solo dopo la rimozione dei polimeri (*figura 2A e 4B) (Vigliotta *et al.*, 2012).

Inoltre, Vigliotta e collaboratori hanno condotto un ulteriore esperimento di condizionamento basato sul riutilizzo della soluzione di acqua distillata dopo il

trattamento dei batteri *E.coli* con il copolimero A(BC)₂. In dettaglio il copolimero è stato incubato con *E.coli* per 24 ore. Successivamente il film è stato rimosso e la soluzione centrifugata per recuperare il surnatante. Per valutare la presenza di molecole solubili rilasciate dalla precedente incubazione, tale surnatante "condizionato" è stato incubato per 24 ore a 37°C con nuovi batteri di *Escherichia coli* ottenuti da una coltura in crescita in assenza di polimeri. L'effetto antimicrobico è stato valutato calcolando e confrontando le unità formanti colonie (UFC) con quelle di un campione di controllo (costituito da batteri di *E.coli* in acqua distillata non condizionata). Il numero delle UFC ottenute nella soluzione condizionata non ha subito variazioni significative rispetto al campione di controllo confermando così che l'azione del polimero non è associata al rilascio di molecole biocide.

Questi risultati hanno dimostrato chiaramente che i copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n possono essere classificati come superfici antimicrobiche che agiscono mediante un meccanismo che avviene esclusivamente per contatto.

Secondo le modalità d'azione ipotizzate per tali superfici, descritte nel capitolo precedente, esse possono essere in grado di uccidere i microrganismi o perché costituite da polimeri che possiedono delle lunghe catene alchiliche (> 100 nm) con cui raggiungono e distruggono fisicamente la membrana citoplasmatica (Fig.18); oppure, a causa degli effetti associati all'interazione elettrostatica tra le cariche positive dei polimeri e quelle anioniche presenti sulla superficie delle cellule, destabilizzano irreversibilmente le membrane cellulari (Klibanov *et al.*, 2001; Tiller *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2006; Murata *et al.*, 2007; Kugler *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008).

Dato che la parete cellulare dei batteri *Escherichia coli* ha uno spessore di circa 5-20 nm e che la lunghezza dei soli gruppi cationici di DMAEMA dei copolimeri A(BC)_n è nettamente inferiore a tale spessore, Vigliotta e collaboratori hanno ipotizzato che tali superfici non agiscono mediante un meccanismo di penetrazione all'interno delle cellule ma destabilizzando le membrane cellulari grazie alla presenza dei gruppi cationici (Vigliotta *et al.*, 2012). Di fatti, come riportato da alcuni autori, la presenza di una elevata densità di carica compresa tra 10¹²-10¹⁶ gruppi di ammonio per centimetro quadrato, può indurre una forte interazione elettrostatica con le cariche anioniche della parete cellulare batterica causando, ad esempio, la perdita dei cationi divalenti Ca²⁺ e Mg²⁺ responsabili dell'integrità delle membrane cellulari oppure possono interferire con la carica totale della superficie cellulare o con il trasporto ionico cellulare (Kugler *et al.*, 2005; Murata *et al.*, 2007; Vigliotta *et al.*, 2012).

Lo studio del meccanismo d'azione di tali superfici antimicrobiche rappresenta uno degli obiettivi del mio progetto di dottorato e sarà discusso nel capitolo 4.

3.1 Introduzione

Gli studi preliminari condotti sulle nuove superfici polimeriche insolubili ideate dalla dott.ssa L. Izzo, hanno dimostrato che l'attività antimicrobica dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n è strettamente dipendente dalla concentrazione di cariche positive associate a ciascuna architettura polimerica (Vigliotta *et al.*, 2012). Tuttavia, trattandosi di una recente ed innovativa scoperta e non essendoci in letteratura studi meccanicistici in merito, non è ancora chiaro quali siano i parametri strutturali da considerare al fine di progettare e migliorare la sintesi di tali superfici.

Il primo obiettivo del mio progetto di dottorato è stato proprio stabilire tali parametri, andando a valutare se l'attività antimicrobica ed emolitica dei copolimeri PEG(MMA-DMAEMA)_n fosse influenzata dalla modifica dei tre principali componenti dei copolimeri ossia: dal bilancio tra densità di carica ed idrofobicità (bilancio anfifilico), dall'architettura polimerica e dalla modifica del gruppo amminico protonabile. Tenendo conto di tali componenti, in collaborazione con il gruppo di sintesi della dott.ssa L. Izzo, sono state sviluppate due nuove serie di superfici insolubili del tipo PEG(MMA-AAEMA)_n costituite dalle architetture A(BC), A(BC)₂ e A(BC)₄ con diverso rapporto tra densità di carica (AAEMA) e idrofobicità (MMA) e diverso gruppo amminico protonabile sui monomeri AAEMA (Metile, Etile, *ter* Butile, *iso* propile).

3.2 Risultati e Discussione

3.2.1 Nuove superfici antimicrobiche del tipo PEG(MMA-AAEMA)_n

Le nuove serie di copolimeri del tipo A(BC)_n con n=1,2,4 sono costituite da una catena di monometossipoli(etilenglicole) (A = mPEG; Mn = 2000 Da) e da catene copolimeriche "random" composte da metilmetacrilato (B = MMA) e da un alchilamminoetilmetacrilato (C=AAEMA). I monomeri AAEMA contengono un gruppo amminico protonabile con proprietà battericida e sono solubili nella loro forma polimerica. La presenza di mPEG, altamente idrofilico, ha invece lo scopo di favorire l'assorbimento di acqua e quindi la protonazione dei gruppi amminici di AAEMA, mentre l'MMA idrofobico permette di ottenere un prodotto finale insolubile in acqua (Vigliotta *et al.*, 2012).

La caratteristica distintiva di questi nuovi copolimeri, rispetto a quelli descritti nel capitolo precedente, è legata alla presenza di gruppi alchilici sul monomero C diversi da DMAEMA i quali, avendo un differente valore di pK_b, hanno anche una diversa efficienza nel formare ammoni quaternari responsabili dell'azione antimicrobica. La variazione dei gruppi alchilici, infatti, determina la modifica della densità di carica dei copolimeri in quanto la loro basicità condiziona la propensione delle catene di AAEMA a protonarsi e a formare forti legami ad idrogeno secondo la reazione di equilibrio (Fig.27):

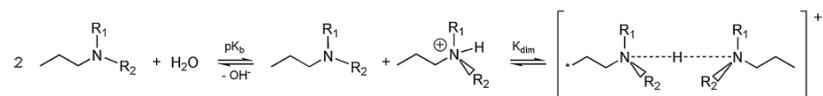


Figura 27- Reazione di formazione di legami ad idrogeno tra i gruppi amminici protonati e neutri tra le catene di AAEMA

Oltre al gruppo dimetilammino etile (DMAE) sono state utilizzati anche i gruppi dietilammino etile (DEAE), diisopropilammino etile (DIPAE) e tert-butilammino etile (TBAE) caratterizzati dalla presenza sull'atomo di azoto rispettivamente di due gruppi metile (R = Me), etile (R = Et), isopropile (R = *i*-Pr) e da un gruppo *ter*-butile (R = *t*-Bu) (Fig. 28).

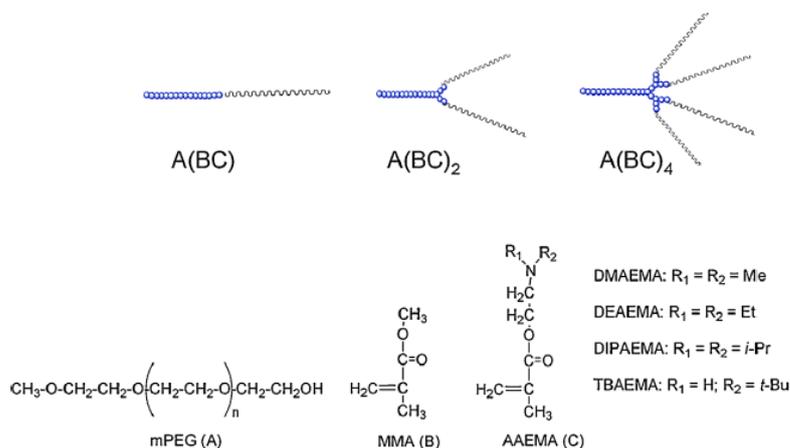


Figura 28- Rappresentazione schematica delle strutture A(BC)_n con n= 1,2,4 e composizione dei polimeri PEG(MMA-AAEMA)_n con i diversi sostituenti alchilici sui monomeri AAEMA (Matrella *et al.*, 2015)

Come precedentemente accennato, l'influenza sull'attività antimicrobica dei nuovi copolimeri è stata studiata sia in funzione della modifica dell'architettura polimerica e del gruppo amminico protonabile, che variandone il bilancio anfifilico (AAEMA/MMA). In particolare, sono state sintetizzate due diverse serie di copolimeri costituite dalle architetture A(BC), A(BC)₂ e A(BC)₄ e dai diversi gruppi alchilici, differenziate tra loro in base alla percentuale in moli dei monomeri AAEMA introdotta nelle catene.

La prima serie, contenente il 40% in mol di AAEMA, è stata ideata al fine di modulare il bilancio anfifilico (AAEMA/MMA) in funzione dell'aumento della concentrazione della carica cationica. In questo modo, è stato possibile studiare come l'attività antimicrobica fosse legata alla modifica dell'architettura polimerica, all'ammontare dei pendagli AAEMA e alla natura del sostituito alchilico presente sull'atomo di azoto.

La seconda serie di copolimeri, è stata invece sintetizzata modulando il bilancio anifilico (AAEMA/MMA) in funzione dell'aumento di MMA in modo da poter valutare l'influenza della componente idrofobica sull'attività antimicrobica.

3.2.2 Caratterizzazione dei copolimeri PEG (MMA-AAEMA)_n contenenti il 40% in mol dei monomeri di AAEMA

Nella Tabella 2 sono riportate le caratteristiche microstrutturali della prima serie di copolimeri di PEG(MMA-AAEMA)_n. Come si evince, i copolimeri sono stati sintetizzati usando nella miscela di alimentazione un ammontare relativo dei monomeri MMA e AAEMA tale da ottenere copolimeri con 40% di AAEMA in modo da massimizzare la probabilità che i gruppi amminici si trovino ad una distanza tale da favorire la formazione di legami ad idrogeno tra i pendagli.

Architecture	AAEMA	$M_n(\text{NMR})^{\text{a}}$ [kDa]	$X_{\text{mPEG}}^{\text{b}}$ [%]	$X_{\text{MMA}}^{\text{b}}$ [%]	$X_{\text{AAEMA}}^{\text{b}}$ [%]	M_w/M_n^{c}
A(BC)		76	7.0	51	42	1.5
A(BC) ₂		96	6.0	51	43	1.5
A(BC) ₄		93	6.0	53	41	1.8
A(BC)		70	9.0	49	42	1.5
A(BC) ₂		87	7.0	53	40	1.8
A(BC) ₄		153	4.0	55	41	1.8
A(BC)		81	8.0	53	39	1.4
A(BC) ₂		84	8.0	52	40	1.4
A(BC) ₄		105	6.0	54	40	1.4
A(BC)		93	7.0	47	46	1.5
A(BC) ₂		110	6.0	48	46	1.5
A(BC) ₄		130	5.0	53	42	1.8

Tabella 2- Composizione chimica dei copolimeri del tipo A(BC), A(BC)₂, A(BC)₄ con un ammontare relativo del monomero AAEMA pari a circa il 40% in presenza dei diversi sostituenti alchilici.

Per valutare la concentrazione delle cariche cationiche associata a ciascun copolimero è stata misurata la capacità dei films di assorbire molecole anioniche di benzoato monitorando nel tempo la variazione di assorbanza a 224 nm della soluzione. Come si evince dalla Figura 29a, la propensione ad assorbire gli anioni benzoato da parte dei copolimeri è risultata fortemente dipendente dall'architettura polimerica in presenza di tutti i sostituenti alchilici, ad eccezione del gruppo *iso*-Propile (Fig. 29a).

In particolare, i copolimeri lineari A(BC) e quelli maggiormente ramificati A(BC)₄ hanno assorbito la minore concentrazione di benzoato rispetto all'architettura A(BC)₂. Una valutazione più accurata dell'assorbimento degli anioni in presenza della struttura A(BC)₂ ha confermato questi dati e mostrato che la cattura del benzoato da parte dei copolimeri sembra avere un duplice andamento: nella prima parte è molto rapido, mentre nella seconda, il benzoato viene assorbito con maggiore lentezza sino alla totale saturazione, salvo nel caso del sostituito *iso*-Propile (Fig. 29b). Questo comportamento nel tempo è stato imputato alla morfologia dei copolimeri, che pare possedere due regioni: una superficiale, sulla quale gli anioni vengono rapidamente

adsorbiti, e l'altra interna accessibile probabilmente a causa della presenza di canali o cavità raggiunta in un secondo momento dagli anioni.

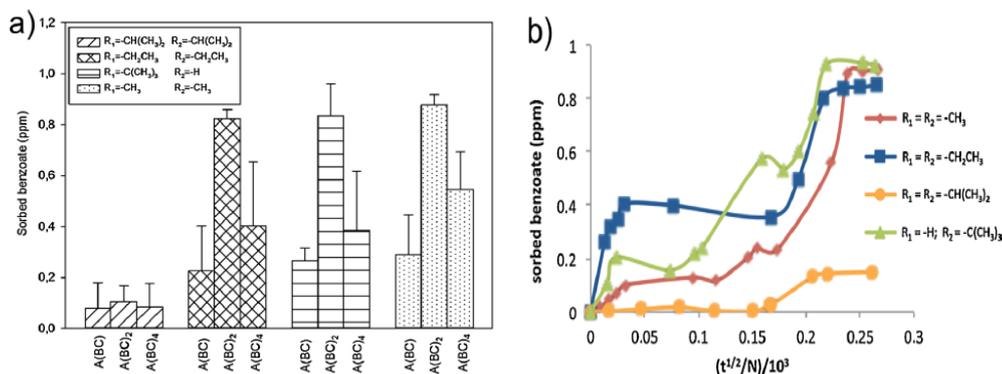


Figura 29- a) Assorbimento di anioni benzoato da parte delle diverse architetture A(BC)_n contenenti il 40% di AAEMA b) assorbimento di anioni benzoato nel tempo sino a saturazione nei copolimeri A(BC)₂ (Matrella *et al.*, 2015)

Tali risultati dimostrano quindi che i copolimeri con il 40% di AAEMA e architettura A(BC)₂ e A(BC)₄ hanno una maggiore densità di carica cationica rispetto alla struttura lineare. Questi dati, in accordo con quanto dimostrato da Vigliotta e collaboratori, confermano che le strutture ramificate hanno una maggiore propensione a formare forti legami ad idrogeno tra i gruppi amminici (salvo nel caso dell' *iso*- Propile) i quali incrementano la concentrazione di carica cationica (Vigliotta *et al.*, 2012).

3.2.3 Studio dell'attività antimicrobica dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n contenenti il 40% in mol dei monomeri di AAEMA

La modulazione del bilancio anfifilico, in funzione dell'incremento dei monomeri di AAEMA (40%) ha permesso di ottenere dei film polimerici con una densità di carica maggiore rispetto ai copolimeri descritti nel capitolo precedente (Fig. 29, Fig. 24). Sulla base di ciò, è stata valutata l'attività antimicrobica di questa nuova serie di copolimeri, studiando, innanzitutto, se l'incremento della densità di carica, associata alle architetture ramificate, avesse un forte effetto anche sulle proprietà biocidi dei copolimeri. Siccome tutti i materiali (tranne quelli con il gruppo *iso*-Propile) hanno mostrato stessa propensione ad assorbire gli anioni in funzione dell'architettura, i testi microbiologici sono stati effettuati su un copolimero tester A(BC)_n recante il

sostituente *t*-Bu. E' bene ricordare che, prima di procedere agli esperimenti, tutti i film polimerici hanno innanzitutto subito vari e prolungati lavaggi in acqua deionizzata per essere sicuri che il loro effetto non fosse associato al rilascio di biocidi nella soluzione.

Cellule batteriche di *Escherichia coli* sono state risospese in acqua distillata ed incubate con i copolimeri A(BC), A(BC)₂ e A(BC)₄ con gruppo *t*-Bu per 1.5, 5 e 24 ore. Al termine di ogni intervallo di tempo, la sospensione è stata piastrata su terreno agarizzato Luria Bertani, e previa incubazione a 37°C, calcolata la percentuale di cellule sopravvissute (UFC) (Fig. 30; per i dettagli sperimentali vedi sezione Materiali e Metodi paragrafo 6.2).

I risultati ottenuti evidenziano che tutti i copolimeri, indipendentemente dall'architettura, sono in grado di ridurre la popolazione batterica nel tempo. Nonostante ciò, essi non hanno agito allo stesso modo sui batteri. Di fatti, nelle prime 5 ore di trattamento, il copolimero maggiormente efficiente e veloce è stato quello con architettura A(BC)₂ che ha ucciso l'87±14% dei batteri in confronto al 43±7% e 59±5% delle strutture A(BC) e A(BC)₄ (P<0.001).

In totale accordo con i risultati del saggio degli anioni benzoato (Fig. 29 a), le architetture polimeriche con densità di carica maggiore hanno anche la maggiore attività antimicrobica. Siccome tali copolimeri possiedono la stessa quantità di gruppi amminici (AAEMA) al variare dell'architettura, la maggiore efficienza della struttura A(BC)₂ è correlata al maggior numero di legami ad idrogeno tra i gruppi amminici protonati e neutri presenti.

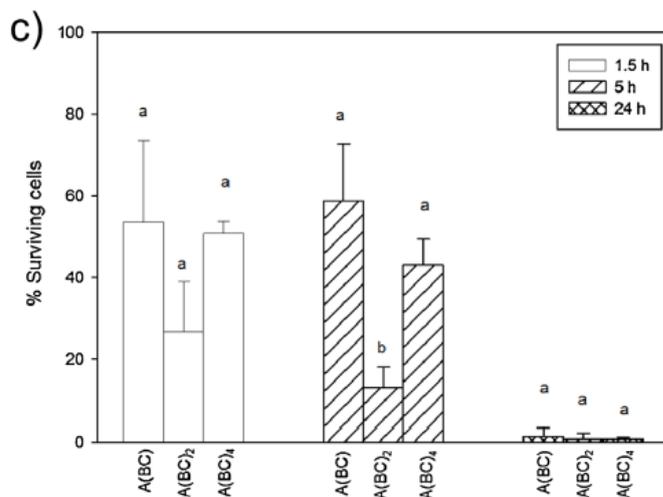


Figura 30- Percentuale di cellule sopravvissute dopo 1.5, 5 e 24 ore di trattamento in presenza delle architetture A(BC), A(BC)₂ e A(BC)₄ dei copolimeri recanti il gruppo *ter*-Butile. Le percentuali sono state ottenute rapportando, per ciascun tempo, le UFC dei campioni trattati con i copolimeri con le UFC del campione di controllo (costituiti da cellule di *Escherichia coli* in acqua distillata senza polimeri). Nei grafici è riportata la media ± deviazioni standard (numero di esperimenti ≥3). Per ciascun tempo (1.5, 5 e 24 ore) le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere differenti (nel gruppo a 5 ore A(BC) vs. A(BC)₂ $t_{(6)}= 7.618$, $P < 0.001$, A(BC)₂ vs. A(BC)₄ $t_{(6)}= - 6.889$, $P < 0.001$).

Ho pensato, dunque, di studiare se l'attività antimicrobica dell'architettura A(BC)₂ fosse influenzata anche dal tipo di sostituente amminico il quale, avendo un diverso valore di pK_b ha anche una differente propensione a formare legami ad idrogeno. Cellule di *E.coli* sono state trattate con copolimeri A(BC)₂ con sostituenti Me, Et, *t*-Bu e *i*-Pr e successivamente calcolata la percentuale di cellule sopravvissute nel tempo.

Come mostrato nella Figura 31 l'attività antimicrobica dei copolimeri A(BC)₂ differisce in base al sostituente alchilico già nelle prime ore di trattamento. In particolare, la presenza del sostituente Me riduce di oltre il 90% la popolazione batterica esercitando la maggiore attività battericida nel minor tempo di contatto (1.5 ore; P < 0.001). Dopo 5 e 24 ore di trattamento invece l'azione battericida dei copolimeri con i monomeri Me, Et e *t*-Bu risulta simile ma sempre significativamente più efficiente (P < 0.05) rispetto al copolimero con gruppo *i*-Pr e il polimero di controllo A(B)₂ privo di pendagli amminici.

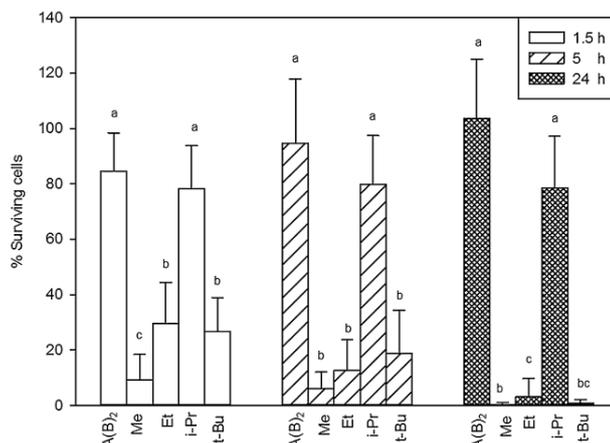


Figura 31- Attività antimicrobica influenzata dalla presenza dei diversi sostituenti alchilici nei copolimeri con architettura A(BC)₂ contenenti il 40% di AAEMA. Le percentuali sono state ottenute rapportando, per ciascun tempo, le UFC dei campioni trattati con i copolimeri con le UFC del campione di controllo (costituiti da cellule di *Escherichia coli* in acqua distillata senza polimeri). Nei grafici è riportata la media ± deviazioni standard (numero di esperimenti ≥3). Per ciascun tempo (1.5, 5 e 24 ore) le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere differenti (nel gruppo a 1.5 h, Me vs. A(B)₂, P < 0.001, Me vs. Et, P < 0.001, Me vs. *i*-Pr, P < 0.001, Me vs. *t*-Bu, P < 0.001; nel gruppo a 5 ore Me vs. A(B)₂, P < 0.05, Me vs. *i*-Pr, P < 0.05, nel gruppo a 24 h, Me vs. A(B)₂, P < 0.05, Me vs. Et, P < 0.05, Me vs. *i*-Pr, P < 0.05).

L'insolito comportamento del copolimero A(BC)₂ con sostituente *i*-Pr, che sembra del tutto analogo al copolimero A(B)₂ privo di cariche, mi ha spinto ad indagare ulteriormente la veridicità della relazione esistente tra potere battericida e densità di carica cationica.

A tal fine, in collaborazione con il gruppo di sintesi, è stata valutata la quantità di ammine protonabili presenti solo sulla superficie dei films polimerici mediante il saggio del sale sodico di fluoresceina. Questo anione è in grado di legarsi solo con i cationi esposti sulla superficie dei copolimeri senza penetrare all'interno del

materiale, a differenza dello ione benzoato (Tab.3). Mediante tale saggio ho potuto constatare che, la concentrazione di ammine protonate è molto elevata ma anche molto simile sulla superficie dei copolimeri A(BC)₂ con i sostituenti Me, Et e *t*-Bu e che la maggior attività antimicrobica riscontrata per il sostituto Me è probabilmente dovuta al minore ingombro sterico intorno all'atomo di azoto. Sulla superficie dei copolimeri A(BC)₂ con gruppo *i*-Pr, invece, tale concentrazione è inferiore di circa un ordine di grandezza rispetto agli altri copolimeri.

Architettura	AAEMA	X _{AAEMA} (%)	carica superficiale /cm ²
A(BC) ₂	R ₁ =R ₂ =Me	43	5.6·10 ¹⁴
A(BC) ₂	R ₁ =R ₂ =Et	40	7.8·10 ¹⁴
A(BC) ₂	R ₁ =R ₂ = <i>i</i> -Pr	40	2.0·10 ¹³
A(BC) ₂	R ₁ =H; R ₂ = <i>t</i> -Bu	46	5.4·10 ¹⁴

Tabella 3- Concentrazione di carica cationica presente sulla superficie dei copolimeri A(BC)₂ in funzione dei sostituenti alchilici (40% AAEMA)

Tuttavia però, come precedentemente accennato, la densità di carica dipende dalla tendenza di ciascun gruppo amminico a protonarsi, ossia di acquistare protoni in soluzione secondo la reazione di equilibrio descritta in Figura 27. Tale tendenza viene misurata calcolando la costante di dissociazione basica (K_b) associata a ciascun gruppo amminico ed espressa come pK_b = - log (K_b). Quanto più piccolo è il valore di pK_b tanto più forte è la base, per cui maggiore sarà la sua tendenza a protonarsi. I valori di pK_b per ciascun sostituto alchilico riportati in letteratura seguono il seguente ordine (Chen *et al.*, 1987):



ovvero la presenza dei gruppi Metile come sostituenti alchilici dovrebbe conferire la più bassa basicità ai gruppi amminici presenti sulle ramificazioni e di conseguenza la più bassa densità di carica nel corrispondente copolimero A(BC)₂, tendenza totalmente opposta ai dati osservati sperimentalmente.

Tale parametro discordante ha indotto a valutare che la densità di carica calcolata mediante i diversi saggi con gli anioni non è influenzata solo dal pK_b dei gruppi amminici ma, come suggerito da Vigliotta e collaboratori, anche dalla capacità dei gruppi amminici di formare forti legami idrogeno del tipo --N(R)₂--H⁺N(R)₂-- che stabilizzano la carica positiva sull'azoto (Vigliotta *et al.*, 2012).

Per dimostrare tale ipotesi il gruppo di sintesi della dott.ssa Izzo ha calcolato teoricamente, per ciascun sostituto, l'energia libera di formazione dei legami ad idrogeno (ΔG_{dim}) tra i gruppi amminici liberi e protonati (Tab.4) e la struttura di

ciascun dimero (Fig. 32). Come si evince dalla Tabella 4 il valore di ΔG dimostra che i sostituenti amminici Me, Et e *t*-Bu sono in grado di formare forti legami ad idrogeno, mentre il gruppo *i*-Pr è totalmente incapace di stabilizzare la carica positiva sull'atomo di azoto ($\Delta G > 0$). Inoltre, il sostituito *t*-Bu dovrebbe essere quello maggiormente efficiente nel formare tali legami ma, probabilmente, tale tendenza è stata attenuata dalla repulsione elettrostatica causata dall'eccesso di protoni nel materiale che provoca una diminuzione della distanza media tra i dimeri protonati vicini.

Substituent	Me	Et	<i>i</i> -Pr	<i>t</i> -Bu
ΔG_{dim}	-13.8	-7.95	>0	-20.9

Tabella 4- Valori dell'energia libera di formazione (ΔG) del legame idrogeno tra i dimeri in presenza dei sostituenti Me, Et, *i*-Pr e *t*-Bu

Dall'osservazione della disposizione dei sostituenti Et, *t*-Bu e *i*-Pr (Fig.32 a, b, c) si deduce inoltre che il valore positivo associato al ΔG nel caso dell'*i*-Pr è causato dall'ingombro sterico dei quattro gruppi isopropile intorno all'atomo di azoto. In questo caso i due atomi di azoto dei due gruppi dell'isopropile non riescono a disporsi ad una distanza sufficientemente vicina da poter condividere i protoni in eccesso, problematica che invece non si presenta nel caso del complesso con molecole di piccole dimensioni come l'acqua (Fig. 32 d).

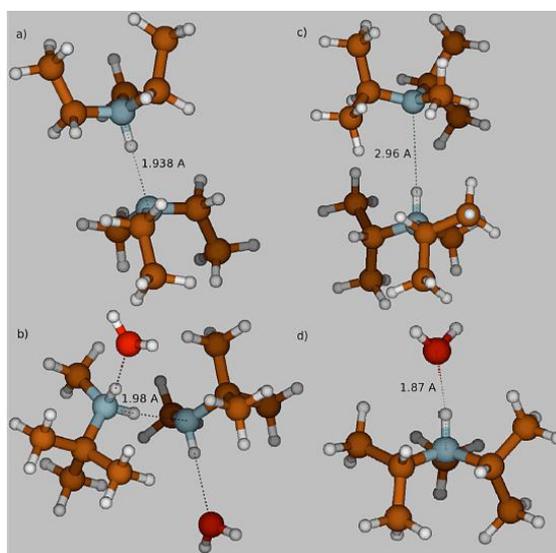


Figura 32- Struttura dei dimeri ammino protonati e della distanza media tra i gruppi recanti i sostituenti a) Etile, b) *ter*- Butile e c) *iso*-Propile e d) il complesso tra le specie ammino protonate dell'*iso*-Propile e una molecola di acqua.

3.2.4 Caratterizzazione dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n contenenti il 15% in mol dei monomeri di AAEMA

La seconda serie di film polimerici sintetizzata secondo l'approccio *same centered* è invece costituita da copolimeri con minore densità di carica cationica (AAEMA 15%) e una maggiore concentrazione della frazione molare delle catene di MMA (76%) (Tab.5). La sintesi di questi copolimeri con bilancio anfifilico a favore dell'aumento della componente idrofobica ha lo scopo di valutare se l'effetto antimicrobico dei film polimerici PEG(MMA-AAEMA)_n fosse legato anche alla presenza delle catene di metilmetacrilato e non solo alla densità di carica cationica.

Architecture	AAEMA	$M_n(NMR)^a$ [KDa]	X_{mPEG}^b [%]	X_{MMA}^b [%]	X_{AAEMA}^b [%]	M_w/M_n^c
A(BC)		38	12	71	17	1.4
A(BC) ₂		69	7.0	78	15	1.4
A(BC) ₄		73	6.0	83	11	n.d.
A(BC)		42	11	76	13	1.4
A(BC) ₂		35	13	72	15	1.3
A(BC) ₄		39	12	74	13	1.2
A(BC)		32	13	76	11	1.3
A(BC) ₂		36	11	76	13	1.2
A(BC) ₄		42	12	76	12	1.2
A(BC)		42	11	75	14	n.d.
A(BC) ₂		49	10	76	14	1.3
A(BC) ₄		52	9.0	77	14	1.4

Tabella 5- Composizione chimica dei copolimeri del tipo A(BC), A(BC)₂, A(BC)₄ con un ammontare relativo del monomero AAEMA pari a circa il 15% in presenza dei diversi sostituenti alchilici.

Al fine di poter confrontare al meglio le due serie di film polimerici, gli esperimenti condotti su tali copolimeri sono stati gli stessi di quelli descritti in precedenza (Par. 3.2.2). Inizialmente, ho verificato che la densità di carica associata alle architetture polimeriche A(BC), A(BC)₂ e A(BC)₄ fosse effettivamente diminuita sulla superficie dei copolimeri.

Il saggio di assorbimento degli anioni benzoato ha, difatti, confermato che l'aumento della quantità di monomeri idrofobici MMA, a discapito di quelli di AAEMA, ha notevolmente ridotto la capacità dei copolimeri di assorbire anioni benzoato nel tempo (Fig. 33). La densità di carica totale di questi copolimeri, inoltre, (a differenza dei copolimeri con il 40% di AAEMA) risulta essere del tutto indipendente dalle architetture polimeriche. In particolare, i copolimeri con sostituito Me risultano essere quelli con la minore densità di carica cationica (Fig. 33). Il saggio del sale di sodio fluoresceinato ha confermato questi risultati evidenziando che i copolimeri con sostituito Me hanno la minore concentrazione di ammine protonabili superficiali rispetto a tutti gli altri copolimeri (Tab. 6).

La densità di carica associata ai copolimeri, in questo caso, risulta in accordo sia con risultati dei saggi degli anioni, che con i valori di pK_b riportati per ciascun sostituito alchilico (Chen et al., 1987). In pratica il gruppo Me, essendo quello meno basico, ha una scarsa tendenza a protonarsi e, quindi, ad incrementare la carica cationica dei copolimeri.

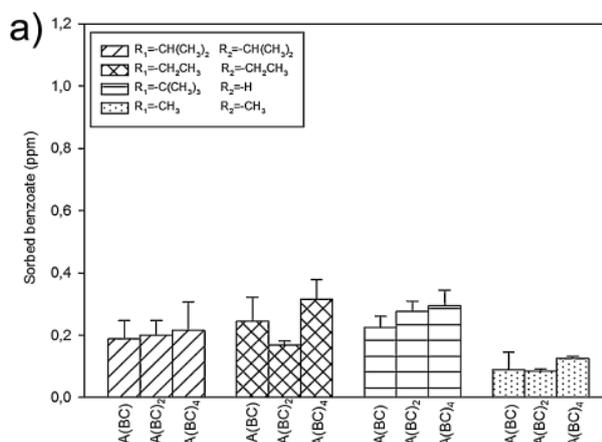


Figura 33- Concentrazione di anioni benzoato (ppm) assorbita dalle diverse architetture A(BC)_n contenenti il 15 % di AAEMA. (Matrella *et al.*, 2015)

Architettura	AAEMA	X _{AAEMA} (%)	carica superficiale /cm ²
A(BC) ₂	R ₁ =R ₂ =Me	15	2.2 · 10 ¹³
A(BC) ₂	R ₁ =R ₂ =Et	15	1.7 · 10 ¹⁴
A(BC) ₂	R ₁ =R ₂ = <i>i</i> -Pr	13	1.4 · 10 ¹⁴
A(BC) ₂	R ₁ =H; R ₂ = <i>t</i> -Bu	14	1.7 · 10 ¹⁴

Tabella 6- Densità di carica superficiale valutata mediante il saggio di assorbimento del sale di sodio fluoresceinato nei copolimeri A(BC)₂ con 15% di AAEMA (Matrella *et al.*, 2015).

3.2.5 Studio dell'attività antimicrobica dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n contenenti il 15% in mol dei monomeri di AAEMA

Gli effetti associati all'incremento della frazione idrofobica sull'attività antimicrobica dei copolimeri sono stati valutati mediante calcolo della percentuale di

cellule sopravvissute di *Escherichia coli*, in maniera del tutto analoga a quanto descritto in precedenza (Par.3.2.3).

I risultati dei test microbiologici mirati a valutare l'influenza delle architetture polimeriche A(BC), A(BC)₂ e A(BC)₄ hanno dimostrato che tutti i films sono in grado di ridurre significativamente la popolazione batterica in soluzione dopo 24 ore ma tale attività, contrariamente alla prima serie di copolimeri, risulta essere totalmente indipendente dall'architettura polimerica (Fig. 34). Tuttavia, il potere biocida di questi copolimeri risulta strettamente correlato, seppur presente in bassa concentrazione, alla tipologia di sostituente amminico dei monomeri di AAEMA. Come si evince dalla Figura 35 già dopo breve tempo di contatto i copolimeri A(BC)₂ con maggiore attività battericida sono quelli contenenti i sostituenti Et, *i*-Pr e *t*-Bu ($P < 0.001$). Il copolimero meno attivo invece, contrariamente a quanto avveniva con i copolimeri aventi il 40% di AAEMA, è stato il copolimero A(BC)₂ con sostituente Me assieme al copolimero di controllo A(B)₂ privo di cariche.

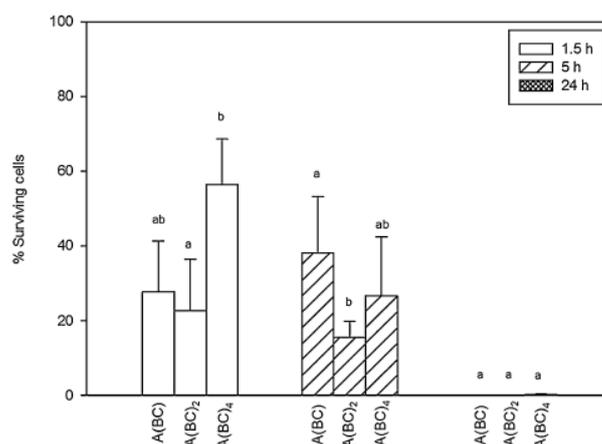


Figura 34- Percentuale di cellule sopravvissute nel tempo in presenza dei copolimeri A(BC)_n con sostituente *t*-Bu contenente il 15% di AAEMA. Le percentuali sono state ottenute rapportando, per ciascun tempo, le UFC dei campioni trattati con i copolimeri con le UFC del campione di controllo (costituiti da cellule di *Escherichia coli* in acqua distillata senza polimeri). Nei grafici è riportata la media \pm deviazioni standard (numero di esperimenti ≥ 3). Per ciascun tempo le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere differenti (nel gruppo a 1.5 ore A(BC)₂ vs. A(BC)₄ $t_{(6)} = -2.709$, $P = 0.035$, nel gruppo a 5 ore A(BC) vs. A(BC)₂ $t_{(6)} = 2.520$, $P = 0.045$).

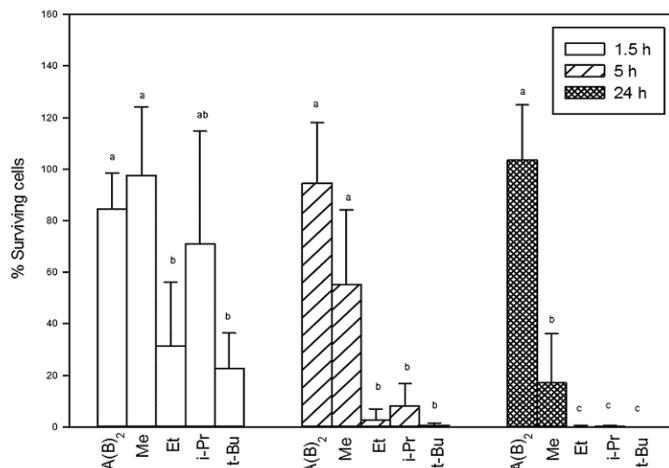


Figura 35- Influenza dei diversi sostituenti alchilici sull'attività antimicrobica dell'architettura A(BC)₂ contenente il 15 % di AAEMA. Le percentuali sono state ottenute rapportando, per ciascun tempo, le UFC dei campioni trattati con i copolimeri con le UFC del campione di controllo (costituiti da cellule di *Escherichia coli* in acqua distillata senza polimeri). Nei grafici è riportata la media \pm deviazioni standard (numero di esperimenti \geq 3). Per ciascun tempo le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere differenti (nel gruppo a 1.5 ore *t*-Bu vs. A(B)₂ $P < 0.001$, *t*-Bu vs. Me, $P < 0.001$; nel gruppo a 5 ore, *t*-Bu vs. A(B)₂ $P < 0.001$, *t*-Bu vs. Me, $P < 0.001$; nel gruppo a 24 ore *t*-Bu vs. A(B)₂ $P < 0.001$, *t*-Bu vs. Me, $P < 0.05$).

L'attività di questa seconda serie di copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n dimostra che la maggiore concentrazione di catene di MMA non influenza significativamente l'azione antimicrobica che risulta, anche in questo caso, correlata solo con la densità di carica superficiale associata a ciascun copolimero.

3.2.6 Confronto tra l'attività antimicrobica dei copolimeri con architettura A(BC)₂ con 40% e 15% in mol dei monomeri di AAEMA

Dai dati sino ad ora discussi si evince che la modulazione del bilancio tra densità di carica (AAEMA) ed idrofobicità (MMA) influenza l'attività antimicrobica dei copolimeri in modo dipendente dalla concentrazione di cariche cationiche. Nonostante ciò, entrambe le serie polimeriche hanno mostrato un potere battericida nel tempo riducendo, seppur con efficienza e velocità diversa, quasi completamente la popolazione batterica dopo 24 ore.

A questo punto ho confrontato l'attività antimicrobica delle due serie di copolimeri A(BC)₂ al fine di capire al meglio l'influenza dei parametri densità di carica ed idrofobicità ed individuare il polimero maggiormente antimicrobico.

Nella Figura 36 ho riportato l'andamento dell'attività antimicrobica nel tempo dei copolimeri A(BC)₂ con sostituenti Me, Et, *t*-Bu e *i*-Pr sia della serie di copolimeri con 40% che con 15% in moli dei monomeri di AAEMA.

Per quanto riguarda l'andamento nelle prime 1.5 ore di trattamento si evince che A(BC)₂ con il 40% di AAEMA e sostituito Me risulta essere maggiormente antimicrobico rispetto agli altri copolimeri, (trend confermato anche dopo 5 ore di trattamento) mentre i copolimeri con sostituenti *i*-Pr, Et e *t*-Bu mostrano un'attività antimicrobica indipendente dalla concentrazione dei monomeri di AAEMA (Fig. 36a).

Con l'aumentare del tempo di trattamento (5 h) si assiste invece ad un andamento quasi del tutto opposto: i copolimeri maggiormente efficienti sono quelli con maggiore concentrazione di monomeri di MMA (AAEMA 15%) ed in particolare i copolimeri ramificati con sostituenti *i*-Pr e *t*-Bu (Fig. 36b).

Questo comportamento, evidente soprattutto per i copolimeri con gruppo *i*-Pr, è associato al fatto che diminuendo la concentrazione dei monomeri di AAEMA diminuisce anche l'ingombro sterico associato ai gruppi *i*-Pr che, a questo punto, riescono facilmente a protonarsi (seguendo il valore di pK_b). Ciò è confermato dai dati riportati nelle tabelle 3 e 6 in cui si nota che soltanto i copolimeri con gruppi *i*-Pr al 40% e gruppi Me al 15% presentano una densità di carica inferiore rispetto alla media ($2.0 \cdot 10^{13}$ - $2.2 \cdot 10^{13}$ carica/cm²) mentre tutti gli altri hanno una concentrazione di ammine protonabili molto simile e di conseguenza una maggiore attività antimicrobica.

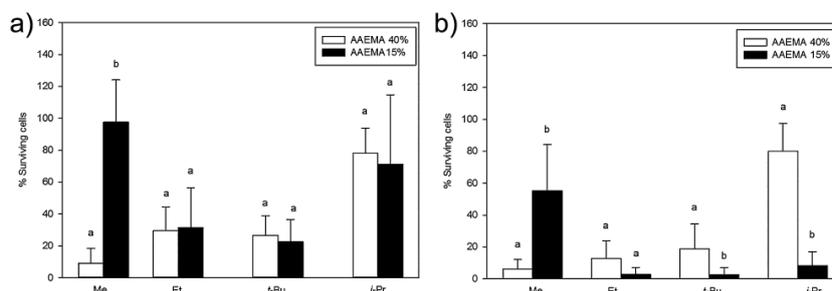


Figura 36- Confronto tra l'attività antimicrobica dei copolimeri A(BC)₂ con diversa percentuale dei monomeri AAEMA. Nei grafici è riportata la media ± deviazioni standard (numero di esperimenti ≥ 5) e le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere differenti. a) confronto dopo 1.5 ore di trattamento P < 0.001 secondo il test post-hoc di Holm-Sidak. b) confronto dopo 5 ore di trattamento P < 0.05 secondo il test post-hoc di Dunn. Le percentuali sono state ottenute rapportando, per ciascun tempo, le UFC dei campioni trattati con i copolimeri con le UFC del campione di controllo (costituiti da cellule di *Escherichia coli* in acqua distillata senza polimeri).

Il confronto tra l'andamento antimicrobico dopo 1.5 e 5 ore di trattamento tra i copolimeri A(BC)₂ con 40% e 15% di AAEMA permette di concludere che il potere battericida dei film polimerici PEG(MMA-AAEMA)_n non dipende dalla componente idrofobica dei copolimeri, ma soltanto dalla concentrazione di cariche cationiche superficiali le quali risultano le principali responsabili dell'interazione con le cellule batteriche di *Escherichia coli*.

In particolare, sembra che esista un valore soglia di densità di carica pari a circa $1.4 \cdot 10^{14}$ cariche/cm² al di sopra del quale tutti polimeri iniziano a mostrare un'apprezzabile efficacia antimicrobica indipendentemente dall'idrofobicità.

Tali risultati sono in accordo con quanto dimostrato da Kugler e Murata negli esperimenti condotti per rendere antimicrobiche superfici quaternizzate con poli(vinilpiridina) o con monomeri di DMAEMA (Kugler *et al.*, 2005; Murata *et al.*, 2007). Entrambi gli autori, infatti, concludono che il parametro fondamentale per ottenere delle superfici antimicrobiche è rappresentato dalla densità di carica superficiale ed, in particolare, da un determinato valore soglia delle cariche positive, variabile a seconda della tipologia delle superfici.

Nello specifico, al fine di uccidere il 100% di batteri di *Escherichia coli* Kugler (2005) sostiene che tale valore soglia debba essere di 10^{14} cariche/cm² mentre Murata (2007) che debba essere maggiore di $5 \cdot 10^{15}$ cariche/cm².

Queste assunzioni sono sufficienti a spiegare l'andamento osservato per tutti i sostituenti presenti sui copolimeri A(BC)_n, tranne nel caso dei gruppi *i*-Pr. Questi, infatti, nonostante l'incremento del 40% di AAEMA risultano sempre quelli con la minore densità di carica.

Infatti, considerando che il valore di pK_b associato all'*i*-Pr è intermedio tra quello del Me e del *t*-Bu esso dovrebbe teoricamente possedere una sufficiente carica cationica quando la percentuale di AAEMA è pari al 40% e quindi essere maggiormente antimicrobico rispetto ai corrispondenti copolimeri con AAEMA al 15%. Dallo studio dell'assorbimento degli anioni benzoato sembra che la minore densità di carica superficiale dei copolimeri dell'*i*-Pr sia fortemente influenzata dalla morfologia superficiale. Questa, infatti, è probabile che causi una riduzione dell'esposizione dei gruppi protonabili sulla superficie tale da giustificarne la scarsa attività antimicrobica. Stranamente però, ciò non è evidente nel caso dei copolimeri con il sostituto *t*-Bu. Questo è costituito da gruppi molto ingombranti ma, allo stesso tempo, contiene un solo gruppo alchilico attaccato all'atomo di azoto invece di due come nel caso dell' *i*-Pr.

Tale spiegazione sembra, di fatti, in totale accordo con i dati riportati in letteratura in cui è dimostrato che la morfologia superficiale influenza significativamente l'attività antimicrobica delle superfici. Ad esempio, la presenza di lunghe catene alchiliche quaternizzate dei gruppi esile causa una diminuzione del potere antimicrobico dei gruppi amminici tetra-alchilici a causa del collasso delle catene e il conseguente effetto schermante delle cariche superficiali (Tiller *et al.*, 2001; Ignatova *et al.*, 2004).

3.2.7 Attività emolitica dei copolimeri A(BC)₂ con 15% e 40% in mol dei monomeri AAEMA

In letteratura è riportato che per poter utilizzare i polimeri come alternativa a tutti gli agenti antimicrobici, compresi gli antibiotici, essi devono essere biocompatibili ossia non tossici per le cellule umane (Kenawy *et al.*, 2007). Tale caratteristica misurata mediante i test di emolisi (HC₅₀) è stata ben studiata nel caso dei polimeri solubili i quali, affinché mostrino un'attività antimicrobica ma non emolitica, devono avere un rapporto opportunamente bilanciato tra carica cationica e idrofobicità

(Kuroda *et al.*, 2009; Palermo *et al.*, 2009). Infatti, un'eccessiva carica cationica comporta una riduzione dell'attività antimicrobica dei polimeri, in quanto riduce l'interazione con la porzione idrofobica delle membrane. Inoltre, nel caso in cui i gruppi cationici si formino attraverso protonazione (ad esempio gruppi amminici), la repulsione elettrostatica tra gruppi carichi vicini può sfavorire la protonazione. D'altro lato un'eccessiva idrofobicità limita la selettività degli antimicrobici, che diventano indiscriminatamente tossici sia per i batteri che per i globuli rossi (Fischer *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2002). Dunque, la progettazione dei polimeri deve essere finalizzata principalmente sull'aumento del potere battericida a discapito di quello emolitico.

Per tale motivo ho valutato l'attività emolitica esercitata dai copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n per determinare il loro grado di biocompatibilità. I film polimerici sono stati incubati in presenza di globuli rossi umani ed è stata valutata la loro capacità di lisare gli eritrociti quantizzando la concentrazione di emoglobina rilasciata nel tempo (per i dettagli sperimentali vedi sezione Materiali e Metodi paragrafo 6.3). Come è evidente nella Tabella 7 la variazione del bilancio anfifilico non sembra influenzare significativamente l'azione emolitica dei copolimeri. Infatti, la quantità di emoglobina misurata nel tempo nella soluzione contenente i copolimeri, non è statisticamente differente rispetto a quella misurata nella soluzione contenente le cellule di eritrociti di controllo (per i polimeri con 80% di MMA P=0.113 e P= 0.06 rispettivamente dopo 5 e 24 ore di incubazione, mentre per i copolimeri con 50% di MMA agli stessi tempi P= 1.00 e P= 0.305), confermando che tutti i copolimeri non hanno un'azione citotossica verso le cellule umane.

AAEMA	Exposure time [h]			
	80% MMA		50% MMA	
	5 h	24 h	5 h	24 h
R ₁ = R ₂ = Me	2.51 ± 2.73	0.21 ± 0.36	0.00 ± 0.00	2.81 ± 4.50
R ₁ = R ₂ = Et	0.00 ± 0.00	0.28 ± 0.49	0.00 ± 0.00	1.18 ± 2.04
R ₁ = R ₂ = <i>i</i> -Pr	0.00 ± 0.00	0.81 ± 1.41	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.10
R ₁ = H; R ₂ = <i>t</i> -Bu	5.18 ± 7.11	11.2 ± 11.6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Tabella 7- Percentuale di emolisi indotta dai copolimeri A(BC)₂ con diversa quantità di AAEMA normalizzata rispetto al controllo. I valori sono espressi come percentuale di emolisi totale indotta negli eritrociti di controllo e sono indicati come medie ± deviazione standard (numero di esperimenti = 3).

Tale risultato incoraggiante quindi permette di concludere che i copolimeri di PEG(MMA-AAEMA)_n rappresentano degli ottimi candidati come superfici antimicrobiche insolubili in acqua utilizzabili anche per le applicazioni biomediche.

4.1 Introduzione

Nel capitolo precedente, grazie agli studi condotti sulla modulazione del bilancio anfifilico, è stato possibile stabilire che l'attività antimicrobica dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n dipende soltanto dalla concentrazione di cariche cationiche superficiali e non dalla componente idrofobica. Dopo aver dimostrato quanto detto, il secondo obiettivo del mio progetto di dottorato è stato quello di studiare il meccanismo d'azione con cui tali superfici insolubili agiscono sulle cellule batteriche. Nonostante tutti i copolimeri possiedano un'attività biocida nel tempo, mi sono focalizzata principalmente sullo studio della modalità d'azione del copolimero con struttura A(BC)₂ e sostituito Metile contenente il 40% di monomeri AAEMA (che da ora in poi chiamerò DMAEMA40), in quanto più efficiente già dopo poche ore di trattamento.

Gli studi preliminari condotti sulla modalità d'azione di tali superfici antimicrobiche, descritte nel capitolo 2 (Par.2.4), hanno dimostrato che sono in grado di uccidere i microrganismi mediante un meccanismo che avviene esclusivamente per contatto, senza rilascio di biocidi nella soluzione (Fig.27; Vigliotta *et al.*, 2012). In letteratura è riportato che le superfici attive per contatto possono danneggiare le cellule microbiche o a causa della penetrazione delle catene alchiliche nella cellula, distruggendo fisicamente la membrana citoplasmatica (Wong *et al.*, 2010; Tiller *et al.*, 2001; Siedenbiedel *et al.*, 2012); o mediante un meccanismo associato alla forte interazione elettrostatica tra i gruppi cationici dei polimeri e i gruppi anionici presenti sulla superficie batterica. Quest'ultimo meccanismo può indurre la destabilizzazione delle membrane cellulari a causa del processo di scambio di specie ioniche, come Ca²⁺ e Mg²⁺, responsabili della stabilità delle membrane cellulari (Murata *et al.* 2007; Kugler *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008) oppure la rimozione dei fosfolipidi di membrana, senza rilascio di cationi divalenti, a causa delle forze di adesione esercitate dalle superfici (Asri *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Bieser *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda il polimero DMAEMA40, siccome i pendagli cationici, responsabili dell'attività antimicrobica dei copolimeri, non sono sufficientemente lunghi per poter attraversare la parete cellulare dei batteri gram negativi, Vigliotta e collaboratori hanno escluso che essi siano in grado di penetrare all'interno delle cellule batteriche (Vigliotta *et al.*, 2012).

Sulla base di tale assunto mi sono focalizzata sullo studio delle possibili alterazioni subite dalle cellule del batterio gram negativo *Escherichia coli* a contatto con DMAEMA40. A tal fine, dato che i meccanismi d'azione che inducono la destabilizzazione della struttura cellulare implicano che i gruppi attivi dei polimeri debbano interagire con l'*envelope* cellulare, ho studiato l'interazione di DMAEMA40 con la barriera esterna del batterio mediante tecniche di microscopia a fluorescenza ed elettronica a trasmissione con lo scopo di individuare modifiche della permeabilità cellulare indotte dai suddetti polimeri. Tale ipotesi è stata confermata dallo studio del rilascio di materiale periplasmatico e citoplasmatico e dai saggi di vitalità cellulare in condizione di stress osmotico i quali hanno permesso di dimostrare che DMAEMA40 causa una significativa alterazione della barriera esterna delle cellule batteriche causando la morte per lisi cellulare.

Successivamente, per comprendere se i danni indotti da DMAEMA40 avessero effetti anche su altre funzioni cellulari ho studiato l'andamento della cinetica di

crescita delle cellule trattate con il copolimero in un sistema chiuso e valutato se l'azione biocida del film sulla barriera esterna inducesse o meno dei danni irreversibili in funzione della durata del trattamento.

Infine, ho studiato l'interazione del film DMAEMA40 con i diversi strati che circondano il citoplasma al fine di determinare i possibili bersagli cellulari con i quali il polimero agisce. In particolare, ho indagato se il film avesse un'azione diretta sulle membrane citoplasmatiche, ed in generale sulle membrane cellulari, studiando l'azione di DMAEMA40 su cellule vitali di *Escherichia coli* private della membrana esterna (protoplasti) e su vescicole sintetiche (liposomi) che mimano la composizione fosfolipida delle membrane batteriche. Successivamente ho studiato l'azione di DMAEMA40 sulla membrana esterna valutando se esso fosse in grado di alterarne la permeabilità permettendo l'ingresso nella cellula dell'antibiotico actinomicina D, (normalmente attivo soprattutto nei batteri gram negativi poiché privi della membrana esterna) e causare la rimozione delle molecole di lipopolisaccaridi (LPS) responsabili dell'integrità della membrana. Questi risultati hanno fornito prove sufficienti per poter ipotizzare il meccanismo d'azione delle nuove superfici antimicrobiche PEG(MMA-AAEMA)_n.

Risultati e discussione

4.2 Alterazione della permeabilità della barriera esterna dei batteri *Escherichia coli*

Per iniziare a comprendere il meccanismo d'azione di DMAEMA40 ho condotto degli studi per verificare se l'integrità della barriera esterna delle cellule microbiche fosse o meno compromessa a seguito del trattamento con il copolimero. Una delle tecniche utilizzate è stata quella di monitorare l'ingresso di coloranti fluorescenti nelle cellule trattate mediante microscopio a fluorescenza. Nello specifico, ho trattato cellule di *E.coli*, incubate precedentemente con il copolimero DMAEMA40 per 4 ore, contemporaneamente con tre diversi fluorocromi. Il primo di questi è il fluorocromo Hoechst, un derivato del bisbenzimidazole che emette luce blu quando viene eccitato, e si diffonde liberamente attraverso le membrane cellulari intercalandosi col DNA con lo scopo di rilevare il numero totale di cellule nel campione indipendentemente dalla loro vitalità (Cappelier *et al.* 1997).

Il secondo è la Fluoresceina (FITC) sonda di colore verde a basso peso molecolare incapace di attraversare la membrana citoplasmatica a meno che questa non abbia subito un'alterazione della sua permeabilità. Infine, il CTC (5-ciano-2,3-ditolil cloruro di tetrazolio) indicatore dello stato vitale delle cellule in quando ne rileva l'attività respiratoria. Quest'ultimo è un colorante redox di monotetrazolio incolore e non fluorescente che però, in presenza di una catena di trasporto degli elettroni, viene ridotto in un sale insolubile di formazano che si accumula nella cellula emettendo fluorescenza di colore rosso (Rodriguez *et al.* 1992).

La combinazione della colorazione di contrasto utilizzando contemporaneamente le sonde CTC e Hoechst, ha permesso di identificare nello stesso campione sia il numero totale di cellule (fluorescenza blu) che il numero di

batteri metabolicamente attivi (fluorescenza rossa) (Mangoni *et al.* 2004; Cappelier *et al.* 1997). Aggiungendo ad essi anche il colorante FITC è stato possibile inoltre monitorare due tipi di cellule: quelle la cui permeabilizzazione delle membrane causa anche la lisi della cellula (accumulo di FITC nelle cellule e assenza di fluorescenza rossa) e cellule che, nonostante abbiano subito un'alterazione delle membrane risultano comunque vitali (presenza di fluorescenza verde e rossa; Fig. 37).

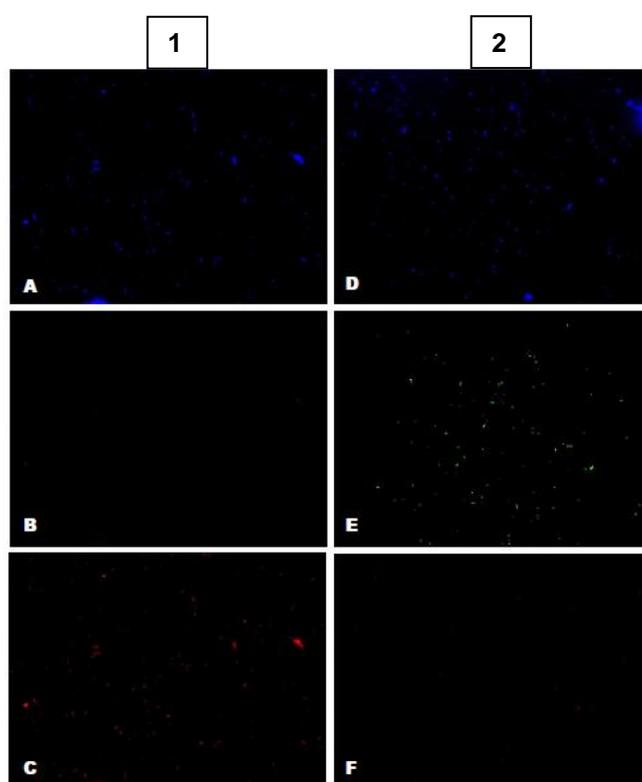


Figura 37- Confronto delle immagini ottenute dall'osservazione al microscopio a fluorescenza delle cellule di *Escherichia coli* di (1) controllo evidenziate dalla colorazione con (A) Hoechst (B) FITC e (C) CTC e (2) delle cellule trattate con DMAEMA40 e con i fluorocromi Hoechst (D) FITC (E) e CTC (F).

Come si evince dalla Figura 37 le cellule di *E. coli* di controllo risospese in acqua distillata (Fig. 37 1A) non mostrano segni di permeabilizzazione delle membrane, come evidenziato dall'assenza della fluoresceina all'interno delle cellule (Fig 37 1B). Inoltre, esse risultano metabolicamente attive poiché, emettendo fluorescenza rossa, la loro catena di trasporto degli elettroni è in grado di ridurre efficientemente l'indicatore CTC in sale di formazano fluorescente (Fig. 37 1C).

Nel caso dei batteri di *E. coli* trattati con il film DMAEMA40, invece, la maggior parte delle cellule (Fig. 37 2D) emette anche fluorescenza verde indice del fatto che le loro membrane esterne e citoplasmatiche risultano seriamente danneggiate tanto da permettere l'ingresso della piccola sonda FITC nello spazio intracellulare (Fig. 37 2E). È interessante notare che l'alterazione della barriera esterna dovuta al contatto dei batteri con il copolimero ne causa anche la morte in quanto le cellule, a differenza di quelle di controllo, non sono più metabolicamente attive (assenza di fluorescenza rossa; Fig. 37 2F).

L'azione del polimero a livello cellulare è stata indagata anche mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). A tal fine, affinché potessi osservare possibili cambiamenti strutturali e morfologici delle cellule ho incubato i batteri di *E. coli* con DMAEMA40 soltanto per 1.5 ore per evitare la lisi completa della popolazione, poiché, come mostrato dai dati cinetici in Fig. 31, il copolimero ha un'elevata azione battericida già dopo poco tempo di trattamento (Matrella *et al.*, 2015). Le immagini ottenute sono state confrontate con quelle di cellule di *E. coli* di controllo non trattate con il polimero (Fig. 38).

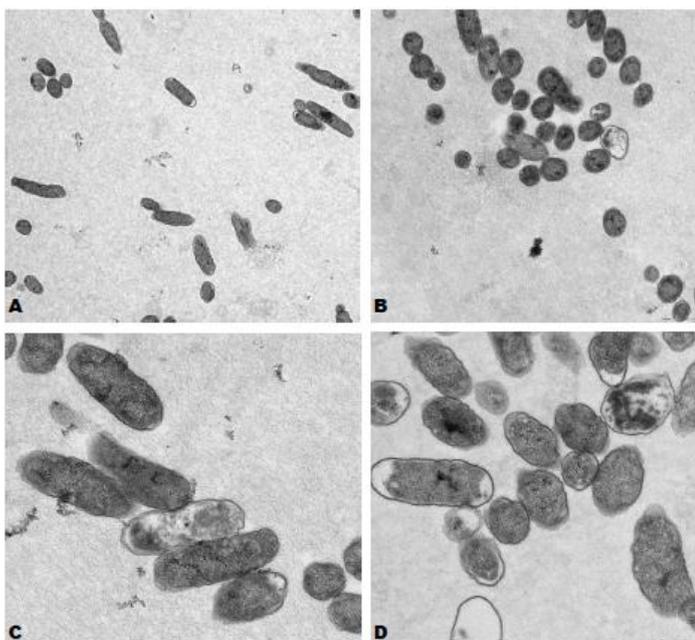


Figura 38- Immagini ottenute dall'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione delle cellule di *Escherichia coli* di (A) controllo e trattate (B,C,D) con il copolimero DAEMA40 per 1.5 ore.

Come si evince dalla Figura 38 la maggior parte delle cellule di controllo risospese in acqua distillata mostrano una forma bastoncellare con superficie continua e con membrane intatte, tipica del ceppo di *E. coli* (Fig. 38 A). Al contrario, l'esposizione al polimero per breve tempo causa già una evidente alterazione della

morfologia cellulare dei batteri (Fig. 38 B,C,D). Difatti, le cellule dopo il contatto con DMAEMA40 assumono una forma più tondeggiante (Fig. 38 B), la superficie appare meno regolare, più rugosa, le membrane sembrano disordinate (Fig. 38 C). Le cellule nel loro interno presentano zone chiare più o meno estese probabilmente generate dalla perdita di materiale citoplasmatico e precipitati causati da fenomeni di agglutinazione (Fig. 38 D).

Tali dati, assieme a quelli ottenuti mediante la microscopia a fluorescenza, confermano che l'azione antimicrobica del polimero DMAEMA40 causa una evidente alterazione della permeabilità della barriera esterna dei batteri.

4.2.1 Rilascio di materiale citoplasmatico

I dati ottenuti mediante microscopia elettronica e a fluorescenza, sono stati supportati anche da esperimenti volti a valutare la presenza di materiale cellulare, sia di tipo periplasmatico che citoplasmatico nella sospensione batterica a seguito del trattamento con il film polimerico.

Nel primo caso, mediante il saggio della nitrocefina, ho valutato la presenza di materiale periplasmatico rilevabile solo in caso di lisi della membrana esterna (ME) dei batteri (Hancock *et al.* 1984; Epand *et al.* 2006; Mensa *et al.* 2011). La nitrocefina è una cefalosporina cromogenica, incapace di attraversare la ME a meno che essa non venga permeabilizzata e rilasci l'enzima β -lattamasi che idrolizza la nitrocefina producendo l'acido cefalosporanico (Buckner *et al.* 2005).

Per eseguire tale saggio ho utilizzato dischi imbevuti di nitrocefina che permettono una rapida rilevazione dell'enzima β -lattamasi a seguito del viraggio del colore del disco da bianco a rosso (Montgomery *et al.* 1979; McCarthy *et al.* 1980). Cellule di *E.coli*, risospese in acqua distillata e trattate con il copolimero DMAEMA40 per 4 ore, sono state poste sui dischi ed incubate a temperatura ambiente assieme alle cellule di controllo. Dopo pochi minuti i dischi inoculati con le cellule trattate hanno virato il colore da bianco a rosso (Fig. 39 B, C) indicando l'avvenuta reazione tra la nitrocefina e l'enzima β -lattamasi e confermando la permeabilizzazione della ME delle cellule di *E. coli*.

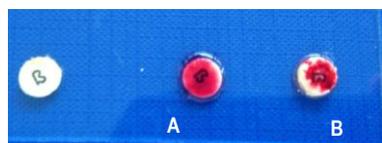


Figura 39- Saggio della nitrocefina in presenza di cellule di *E.coli* di A) controllo e B,C) trattate con il copolimero DMAEMA40. Lo sviluppo della colorazione rossa sui dischi B,C è indicativo della presenza dell'enzima periplasmico β -lattamasi.

Contemporaneamente a tale esperimento ho valutato la presenza di materiale citoplasmatico indice della permeabilizzazione della membrana citoplasmatica. La

distruzione di tale membrana, come è noto, è accompagnata dal rilascio dei componenti intracellulari come ioni K^+ and PO_4^{3-} , amminoacidi, proteine, acidi nucleici ecc. che causano una variazione dell'assorbanza a 260 nm e della conducibilità elettrica della soluzione contenente i batteri (Chen *et al.* 2002; Dayan *et al.* 1999).

Come mostrato nella Figura 40 A il rilascio dei componenti intracellulari nella prima ora di monitoraggio ha avuto un andamento simile sia per le cellule di *E. coli* di controllo che per quelle incubate col polimero probabilmente perché i batteri, a causa del passaggio dal terreno di coltura ricco alla soluzione di acqua distillata ipotonica, subiscono uno shock osmotico. Tuttavia, dopo 2 ore si assiste ad un aumento significativo dell' A_{260nm} nella soluzione contenente le cellule trattate rispetto a quelle di controllo indicando l'avvenuta permeabilizzazione della membrana citoplasmatica. In accordo con i saggi microbiologici (Fig. 31) la quasi totalità del rilascio del contenuto citoplasmatico avviene nelle prime 4 ore di trattamento raggiungendo un plateau dopo 24 ore in cui si osserva il 99.8% di mortalità della popolazione di *E. coli*.

Tali risultati sono stati confermati anche dalla misura della variazione della conducibilità elettrica nelle soluzioni (Fig. 40 B). Di fatti, nella prima ora di trattamento, si osserva un leggero aumento della conducibilità sia nella soluzione di controllo che nelle cellule trattate. Tuttavia, nella soluzione di controllo il valore della conducibilità resta costante intorno a 1.5 $\mu S/cm$ per tutta la durata dell'esperimento, mentre in quella contenente il copolimero DMAEMA40 aumenta significativamente nel tempo, raggiungendo un valore di 9 $\mu S/cm$ e 11 $\mu S/cm$ rispettivamente dopo 1,5 e 5 ore di trattamento (Fig. 40 B).

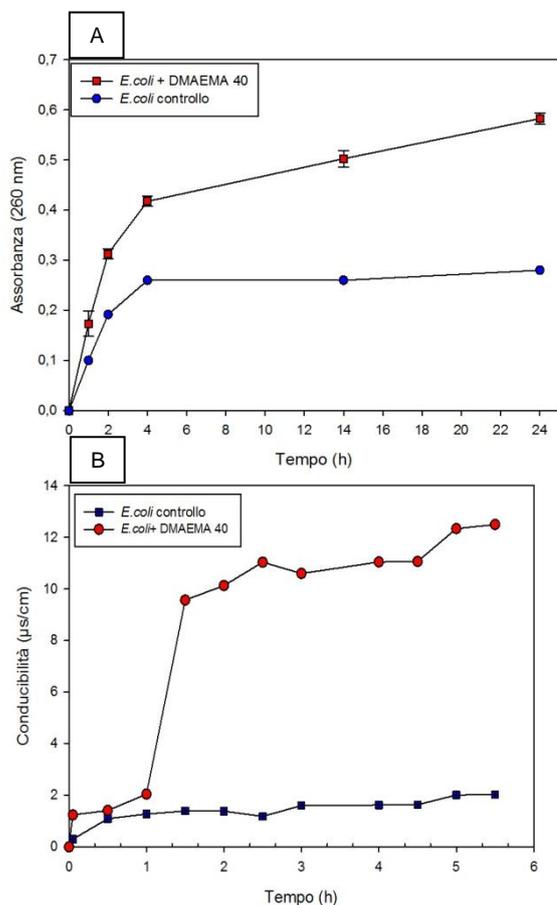


Figura 40- A) Confronto tra l' andamento A) della variazione di assorbanza a 260 nm e B) della conducibilità elettrica nella soluzione contenente cellule di *E.coli* di controllo e trattate con DMAEMA40.

Questi dati indicano che dopo 1,5 ore di trattamento con DMAEMA40 si ha un incremento della conducibilità elettrica nella soluzione pari al 75% rispetto a quello osservato dopo 5 ore di trattamento, in accordo con i dati ottenuti con i saggi cinetici (Fig 31). L'aumento della concentrazione dei componenti intracellulari e della conducibilità elettrica nella soluzione batterica trattata con DMAEMA40 confermano che il copolimero causa la lisi e quindi la rottura della membrana esterna e citoplasmatica delle cellule batteriche.

4.2.2 Saggio dello shock osmotico

Analizzando attentamente i grafici in Fig. 40 la permeabilizzazione completa delle membrane cellulari non avviene immediatamente dopo il contatto con il film polimerico. Inizialmente, infatti, la lisi cellulare sembra essere quasi assente mentre dopo 1 ora si assiste ad un rapido incremento del rilascio del materiale intracellulare (Fig. 40B). Ciò ha portato ad ipotizzare che la lisi cellulare potesse essere limitata o poco evidente nella prima ora di trattamento e che l'urto delle cellule batteriche contro il film polimerico potesse causare la permeabilizzazione delle membrane in modo severo soltanto con l'aumentare dell'esposizione con il copolimero. Per valutare tale ipotesi ho condotto dei saggi di vitalità cellulare verificando la resistenza allo shock osmotico delle cellule di *E. coli* trattate per breve tempo con il copolimero. In letteratura è di fatto riportato che, quando le cellule batteriche subiscono un'alterazione della permeabilità della barriera cellulare esterna, se vengono risospese in un ambiente ipotonico sono più suscettibili alla lisi cellulare rispetto a quelle con membrane intatte (Pilizota *et al.*, 2013; Rojas *et al.*, 2014). A tal fine ho incubato cellule di *E. coli* in acqua distillata col copolimero DMAEMA40 per 30, 60 e 90 minuti. Al termine di ogni intervallo, ho rimosso dai campioni soltanto il film polimerico e valutato l'entità del danno subito dai batteri nel tempo calcolando la percentuale di cellule sopravvissute (UFC) nella soluzione ipotonica (per i dettagli sperimentali vedi sezione Materiali e Metodi paragrafo 6.7; Fig.41).

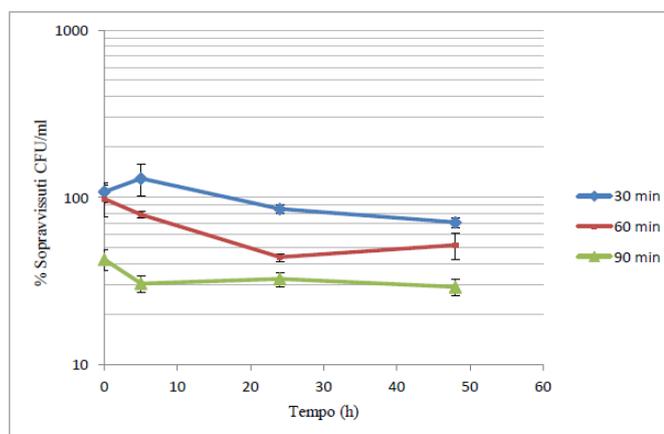


Figura 41- Percentuale delle cellule di *E. coli* sopravvissute in ambiente ipotonico a seguito del pretrattamento con il copolimero DMAEMA40 rispettivamente per 30, 60 e 90 minuti. La riduzione della popolazione batterica è associata ad un aumento della lisi cellulare in ambiente ipotonico a causa dei danni subiti dal contatto con il copolimero.

Come si può notare nella Figura 41 le unità formanti colonia calcolate immediatamente dopo 30 e 60 minuti di incubazione con DMAEMA40 sono confrontabili con quelle delle cellule di *E. coli* di controllo incubate solo in acqua distillata (tempo 0). Tuttavia, l'alterazione subita da tali cellule a causa del pretrattamento col polimero si nota nelle ore successive. Difatti, la popolazione

batterica pretrattata per 30 minuti con DMAEMA40 si riduce di circa il 30% dopo 48 ore in soluzione ipotonica, mentre quella pretrattata per 60 minuti, subisce una riduzione complessiva pari al 50% che si manifesta già nelle prime 24 ore di incubazione.

Diverso è, invece, l'andamento della percentuale di cellule vitali a seguito di un prolungato pretrattamento con il copolimero. In questo caso, i batteri che hanno subito il pretrattamento di 90 minuti con DMAEMA40 risultano seriamente danneggiati già immediatamente dopo la rimozione del polimero (tempo 0) in cui si registra una riduzione del 57% della popolazione rispetto al controllo.

Questi dati dimostrano chiaramente che le cellule subiscono danni alla barriera esterna già dopo 30 minuti di trattamento con DMAEMA40 in quanto risultano più suscettibili alla lisi in ambiente ipotonico. Inoltre, la percentuale delle cellule alterate e il danno che esse subiscono risultano proporzionali al tempo di incubazione con il film polimerico. E' interessante notare che il pretrattamento di 60 minuti con DMAEMA40 provoca danni alla barriera esterna delle cellule le cui entità però non sono tali da causare la morte della totalità delle cellule, difatti l'inoculo di tali cellule su terreno ricco al tempo 0, permette loro di recuperare il danno subito (come evidenziato dal 100% di cellule sopravvissute). Contrariamente, aumentando il tempo di pretrattamento a 90 minuti, le cellule subiscono un severo danno alla barriera esterna evidente già a tempo 0 (Fig. 41).

4.3 Studio della cinetica di crescita delle cellule di *E.coli* trattate con DMAEMA40

I dati sino ad ora ottenuti hanno evidenziato che DMAEMA40, per un periodo di trattamento inferiore a 60 minuti, causa un aumento della permeabilità della barriera esterna dei batteri senza però indurre la morte della cellula. Per valutare se i danni apportati dal polimero in questo intervallo di tempo causassero dei danni fisiologici alla popolazione batterica sono andate a monitorare la variazione del numero di cellule della popolazione batterica trattata con il polimero con quella di una popolazione di controllo in un sistema chiuso (detto anche sistema batch) determinando così possibili differenze della crescita delle due popolazioni. Generalmente il ciclo di crescita (o curva di crescita) di una popolazione cellulare è suddiviso in fasi diverse e ben distinte tra loro: la fase di latenza (ossia fase di adattamento metabolico in cui non avviene riproduzione cellulare), fase esponenziale (in cui i microrganismi si riproducono con un tempo di generazione costante), fase stazionaria (in cui la velocità specifica di crescita è nulla e la crescita della coltura si arresta) ed infine la fase di morte (in cui il numero delle cellule vitali diminuisce; Zwietering *et al.*, 1990).

E' noto che, quando una popolazione batterica viene inoculata in un terreno di coltura, la crescita delle cellule non avviene immediatamente (fase di latenza) in quanto esse necessitano di sintetizzare i costituenti cellulari per prepararsi alla divisione cellulare. Si determina una fase di latenza anche quando l'inoculo è costituito da cellule che siano state danneggiate, ma non uccise, da trattamenti con calore, radiazioni o composti chimici tossici, in quanto le cellule devono avere il

tempo necessario per riparare il danno subito (Sondi *et al.*, 2002; Geeraerd *et al.*, 2000). Per valutare se la popolazione di *Escherichia coli* a causa del trattamento con DMAEMA40 avesse una maggiore durata della fase di latenza rispetto alle cellule di controllo ho determinato la cinetica di crescita delle cellule a seguito del trattamento con DMAEMA 40 per 30, 60 e 90 minuti (per dettagli sperimentali vedi sezione Materiali e Metodi Par. 6.9).

Per ciascuna popolazione è stata calcolata la durata della fase di latenza, la velocità di crescita del numero di cellule per unità di tempo, la densità cellulare raggiunta in fase stazionaria ed infine la differenza tra la durata della fase di latenza delle cellule trattate con DMAEMA40 e quelle di controllo (Tab.8).

Campione	Durata fase latenza (h)	Velocità di crescita (h ⁻¹) di fase esponenziale	OD _{600nm} /ml fase stazionaria	Differenza durata fase di latenza (minuti)
<i>E.coli</i> controllo 30'	2	1.83±0.02	2.23±0.03	
<i>E.coli</i> + DMAEMA40 30'	2	1.91±0.21	2.32±0.18	
<i>E.coli</i> controllo 60'	2	1.85±0.27	2.31±0.45	
<i>E.coli</i> + DMAEMA40 60'	2.5	1.83±0.11	2.22±0.26	30
<i>E.coli</i> controllo 90'	2	1.83±0.27	2.08±0.20	
<i>E.coli</i> + DMAEMA40 90'	2.5	1.83±0.31	2.15±0.19	30

Tabella 8- Caratteristiche della curva di crescita delle popolazioni batteriche di *E.coli* di controllo e pretrattate con DMAEMA per 30, 60 e 90 minuti.

I valori ottenuti monitorando nel tempo la variazione della densità ottica di entrambe le popolazioni nei diversi tempi di trattamento sono stati inoltre graficati per meglio valutare le eventuali differenze delle curve di crescita nella fase di latenza e all'inizio della fase esponenziale (Fig. 42).

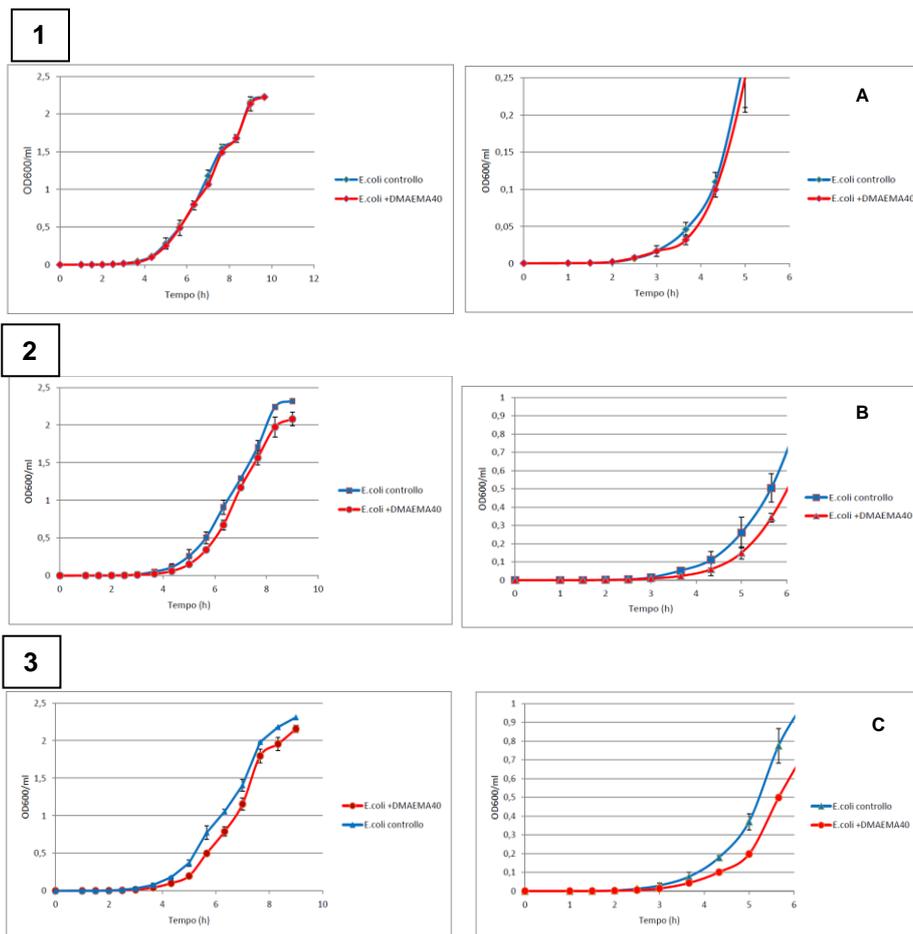


Figura 42- Confronto tra le curve di crescita della popolazione batterica di *Escherichia coli* di controllo e pretrattata con DMAEMA40 per 1) 30 minuti; 2) 60 minuti 3) 90 minuti evidenziando. La fase iniziale corrispondente alla fase di latenza ed all'inizio della fase esponenziale è stata maggiormente evidenziata per ciascun tempo nelle figure 1A, 2B, 3C.

Dall'analisi dell'andamento della crescita delle popolazioni batteriche si evince che la curva di crescita delle cellule trattate con DMAEMA40 per 30 minuti è perfettamente sovrapponibile (sia per quanto riguarda la fase di latenza, che la fase esponenziale e quella stazionaria) con quella delle cellule di controllo (Fig. 42 1A). Ciò indica che le popolazioni sono fisiologicamente uguali e sono caratterizzati da una durata della fase di latenza di 2 ore, mentre la fase esponenziale presenta una velocità di crescita di 2 generazioni per ora (g/h), e la densità finale corrispondente alla fase stazionaria di 2,5 OD₆₀₀.

Diverso è invece l'andamento delle curve di crescita delle cellule trattate per tempi maggiori (60 minuti e 90 minuti) in quanto le due curve non risultano sovrapponibili e la durata della fase di latenza risulta essere maggiore per le cellule

trattate con il polimero rispetto a quella delle cellule di controllo. Nello specifico, si nota che l'ingresso in fase esponenziale avviene dopo circa 2.5 ore per le cellule di controllo mentre dopo 3 ore per le cellule trattate con il film, con un ritardo di 30 minuti (Tab.8). Le velocità di crescita e le biomasse finali, invece, sono tra loro confrontabili.

Questi risultati indicano che nei primi stadi della crescita (tempo 0) le cellule pretrattate per maggior tempo con DMAEMA40 presentano differenze fisiologiche rispetto a quelle di controllo in quanto necessitano di un maggior intervallo di tempo per attivare il processo di riproduzione cellulare. Tale differenza nella durata della fase di latenza (30 minuti) potrebbe essere dovuta alla necessità da parte della cellula permeabilizzata di riparare i danni subiti alla barriera esterna ed attivare la divisione cellulare.

Per valutare tale ipotesi ho condotto un esperimento che mi permettesse di capire se le cellule, dopo trattamento con DMAEMA40, potessero essere in grado di riparare il danno subito alla barriera esterna una volta inoculate in un terreno di coltura fresco.

A tal fine, cellule di *Escherichia coli* sono state pretrattate per 60 minuti con DMAEMA40. Successivamente sono state inoculate prima in un terreno di coltura per 30 minuti (tempo corrispondente alla fase di recupero indicata dalla cinetica di crescita in cui non avviene riproduzione cellulare Tab. 8) e successivamente risospese in una soluzione ipotonica (acqua distillata) per determinare la sensibilità allo shock osmotico come precedentemente descritto (Par.4.2.2). L'andamento della vitalità cellulare nel tempo è stata confrontata con quella di cellule pretrattate con DMAEMA40 per 60 minuti e successivamente inoculate direttamente in acqua distillata (Fig. 43).

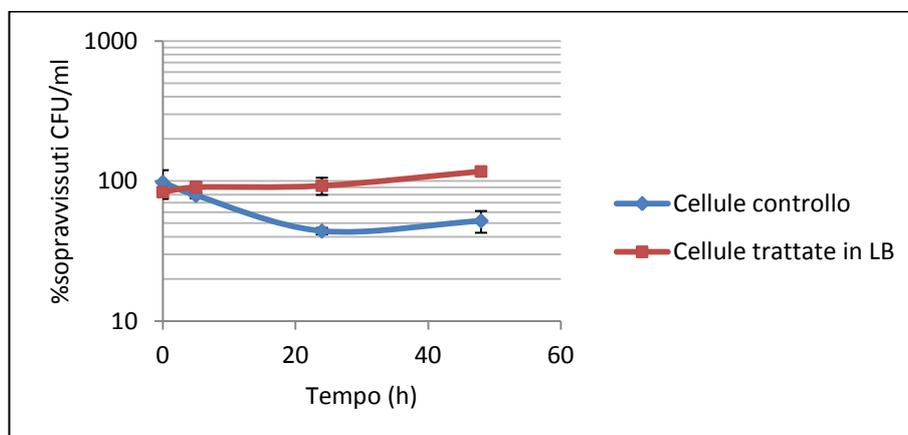


Figura 43- Confronto tra la percentuale delle cellule di *E. coli* pretrattate con il copolimero DMAEMA40 per 60 minuti inoculate prima in terreno ricco Luria Bertani e successivamente in una soluzione ipotonica (cellule trattate in LB) e di quella di cellule pretrattate con DMAEMA40 per 60 minuti e immediatamente risospese nella soluzione ipotonica (cellule controllo).

Come si può notare in Fig. 43 la percentuale di cellule trattate per 60 minuti con DMAEMA40 sopravvissute nel tempo dopo l'inoculo direttamente in acqua distillata, si riduce significativamente nel tempo causando una riduzione della popolazione del 30% dopo 5 ore e del 50% dopo 24 ore di incubazione in soluzione isotonica. Al contrario, la vitalità cellulare della popolazione batterica che, a seguito del trattamento con DMAEMA40 per 60 minuti, è stata inoculata nel terreno di coltura per 30 minuti e successivamente sottoposta a shock osmotico non mostra alcuna variazione nel tempo.

Questi dati dimostrano che l'aumento della durata della fase di latenza osservata nelle Fig. 42 dopo 60 e 90 minuti di trattamento è dovuta alla necessità delle cellule (se poste in condizioni favorevoli) di riparare il danno subito sulla barriera esterna confermando inoltre che, per tale intervallo di trattamento, i danni indotti da DMAEMA40 sono reversibili.

4.4 Azione di DMAEMA40 sulla membrana citoplasmatica

La barriera esterna delle cellule batteriche, che si oppone all'ingresso e alla fuoriuscita indiscriminata di macromolecole e molecole cariche, è costituita fondamentalmente dalla parete e dalla membrana citoplasmatica (Wiley *et al.*, 2008; Kumar & Schweizer, 2005; Epand and Epand 2009; Matzuzaki 2009). Nei batteri gram negativi è presente anche un'ulteriore membrana protettiva, detta membrana esterna, che conferisce maggiore resistenza alle cellule e che, per la sua

composizione, risulta molto più impermeabile della membrana citoplasmatica (Lolis and Bucula, 2003). Benchè i dati ottenuti dagli esperimenti mostrati fino ad ora hanno dimostrato che DMAEMA40 interagisce con la barriera esterna del batterio gram negativo *Escherichia coli* essi non permettono di capire l'interazione del copolimero con le membrane batteriche (esterna e citoplasmatica).

Per determinare se il polimero è in grado di agire direttamente sulle membrane cellulari e capire il ruolo assunto dalla parete cellulare durante l'azione biocida, ho pensato di valutare l'attività del polimero sulla membrana citoplasmatica e successivamente sulla membrana esterna. Per studiare l'interazione di DMAEMA40 con la membrana citoplasmatica ho utilizzando due sistemi di studio. Il primo è costituito da protoplasti di *Escherichia coli*, sistema cellulare privo di parete che, risospeso in un mezzo opportuno, può essere mantenuto vitale conservando le principali caratteristiche biochimiche e molecolari delle cellule con parete cellulare. Lo studio dell'attività degli agenti antimicrobici sugli protoplasti fornisce utili informazioni in quanto questi batteri sono molto sensibili all'attività dei biocidi e lisano dopo l'esposizione a composti che causano gravi danni alle membrane citoplasmatiche (Hugo and Longworth 1964; Davies *et al.*, 1968). Il secondo sistema è costituito, invece, da membrane citoplasmatiche sintetiche (liposomi) che mimano la composizione lipidica e strutturale dello strato fosfolipidico dei batteri (Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). Per quanto riguarda invece l'interazione di DMAEMA40 con la membrana esterna ho valutato inizialmente se, a seguito del trattamento con il copolimero, le cellule di *E.coli* fossero maggiormente sensibili all' actinomicina D, antibiotico attivo soprattutto nei batteri gram positivi in quanto privi della membrana esterna e, successivamente, ho studiato l'interazione di DMAEMA40 con le molecole di lipopolisaccaride (LPS), principale componente della membrana esterna.

4.4.1 Interazione tra DMAEMA 40 e protoplasti di *Escherichia coli*

La conversione di cellule di *Escherichia coli* in protoplasti è stata ottenuta sospendendo i batteri in un mezzo nutriente ed isotonic (contenete saccarosio) e trattandoli con lisozima, enzima in grado di idrolizzare i legami tra l'acido N-acetilmuramico (NAM) e la N-acetilglucosamina (NAG) componenti principali del peptidoglicano (PG). L'idrolizzazione completa del peptidoglicano causa la rimozione di tutti gli strati sovrastanti la membrana citoplasmatica ed induce un cambiamento della morfologia del batterio da bastoncellare a sferica (Voss *et al.*, 1963; Davies *et al.*, 1969; Hugo *et al.*, 1999). L'avvenuta conversione delle cellule in protoplasti è stata confermata dall'osservazione al microscopio ottico a contrasto di fase.

Il copolimero DMAEMA40 è stato introdotto nella sospensione isotonica contenente i protoplasti ed è stata calcolata la percentuale di cellule sopravvissute nel tempo mediante conta delle UFC su terreno agarizzato Luria Bertani con saccarosio. Tale percentuale è stata confrontata contemporaneamente con due campioni di controllo. Il primo è costituito da protoplasti risospesi in saccarosio in assenza del copolimero ed il secondo, per valutare l'attività biocidica del copolimero nella soluzione di saccarosio, è costituito da cellule intatte di *Escherichia coli* con DMAEMA40 (Fig. 44).

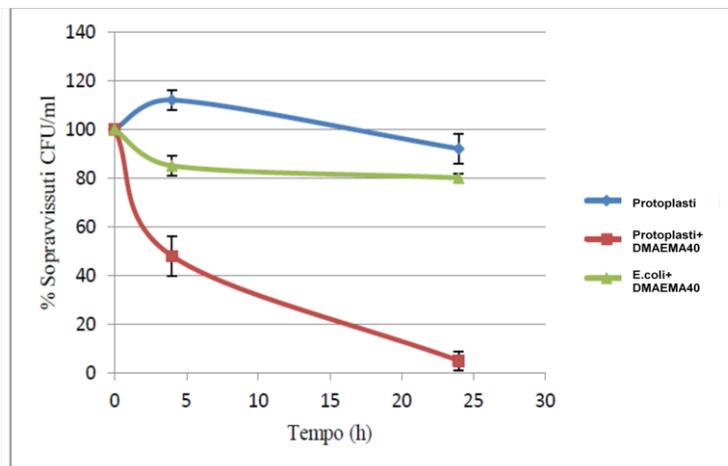


Figura 44- Confronto tra la percentuale di protoplasti sopravvissuti nel tempo (con relative deviazioni standard) in presenza del copolimero DMAEMA40 (Protoplasti+DMAEMA40) e nei due campioni di controllo costituiti da protoplasti e da cellule intatte di *E. coli* trattate con il polimero (*E.coli*+ DMAEMA40).

I risultati ottenuti, come si evince dalla Figura 44, dimostrano che il copolimero DMAEMA40 permeabilizza la membrana citoplasmatica dei protoplasti di *E. coli* causando una significativa riduzione delle UFC nel tempo. In particolare, rispetto alle cellule di controllo in saccarosio, la presenza del film polimerico ne riduce la popolazione del 50% e del 95% dopo 4 e 24 ore di trattamento rispettivamente. Al contrario, l'effetto battericida del copolimero DMAEMA40 nella soluzione di saccarosio risulta notevolmente rallentato sulle cellule intatte di *Escherichia coli* riducendo, in questo caso, la popolazione batterica soltanto del 15% nelle prime ore di contatto. Tale comportamento potrebbe essere dovuto all'azione osmoprotettiva delle molecole di saccarosio, le quali sono in grado di occludere i pori causati dai polimeri membrana-litici impedendo l'ingresso di acqua all'interno della cellula (Sato and Feix 2006; Smith *et al.*, 2014).

Questi dati dimostrano che DMAEMA40 ha un effetto specifico e diretto sulla membrana citoplasmatica dei batteri ed inoltre, il fatto che esso ha un'attività battericida anche sui protoplasti dimostra che la presenza della parete cellulare non ha un ruolo attivo durante il meccanismo d'azione del copolimero. In letteratura è riportato che la parete cellulare dei batteri gram negativi svolge un ruolo fondamentale durante il meccanismo d'azione dei polimeri cationici solubili (Dathe *et al.*, 2002). In particolare, tali polimeri hanno una maggiore attività biocida sulle cellule costituite dalla parete cellulare rispetto ai protoplasti di *E. coli* a causa della differente densità carica anionica presente sulla membrana esterna e sulla membrana citoplasmatica. La membrana citoplasmatica difatti presenta circa il 20% in meno di cariche negative rispetto alla membrana esterna e quindi i polimeri esercitano con essa una più debole interazione elettrostatica (Dathe *et al.*, 2002; Xiong *et al.* 2005; Hoischen *et al.*, 1997). Benchè tali polimeri, essendo solubili, hanno un diverso

meccanismo d'azione rispetto al copolimero insolubile DMAEMA40, la maggiore interazione elettrostatica che teoricamente il polimero dovrebbe esercitare con la membrana esterna, non sembra avere in questo caso un ruolo positivo poiché non si osserva una maggiore mortalità delle cellule intatte rispetto ai protoplasti a causa del trattamento con DMAEMA40 (Fig. 44).

4.4.2 Interazione tra DMAEMA40 e liposomi (LUV)

Recentemente è stato dimostrato che l'interazione tra i polimeri biocidi e le membrane batteriche è influenzata non solo dalla carica anionica dei fosfolipidi ma anche dalla composizione lipidica delle membrane cellulari (Som *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2006; Ishitsuka *et al.*, 2008; Sanches *et al.*, 2015). Una strategia per valutare l'attività degli agenti antimicrobici direttamente sui fosfolipidi presenti nelle membrane cellulari è quella di utilizzare membrane lipidiche sintetiche (liposomi) che ne mimano perfettamente le caratteristiche essenziali (Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010).

I liposomi sono delle vescicole sferiche costituite da uno o più strati di molecole fosfolipidiche che si autoassemblano in modo che il nucleo acquoso, contenente solitamente un colorante, viene racchiuso dalla membrana di fosfolipidi (Fig. 45).

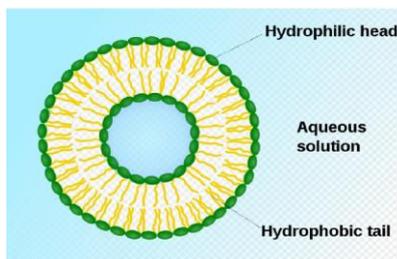


Figura 45- Rappresentazione schematica di un liposoma costituito da molecole di fosfolipidi (Subramaniam *et al.*, 2011)

Nel caso specifico, mediante tecnica di estrusione, ho preparato due tipologie di vescicole unilamellari (LUV) costituite dai fosfolipidi di fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilglicerolo (PG) in rapporto 4:1 per ottenere delle membrane sintetiche simili a quelle dei batteri gram negativi (Wilkinson *et al.*, 1988) e, vescicole composte dai fosfolipidi PG e cardiolipina (CL) in rapporto 12:1 che mimano quella dei gram positivi (Xiong *et al.*, 2005). Tali vescicole sono state preparate incorporando al loro interno il fluoroforo calceina il cui rilascio, a causa della rottura delle membrane, può essere rilevato mediante fluorimetro. I liposomi così ottenuti sono stati incubati con il copolimero DMAEMA40 ed il polimero A(B)₂ (polimero privo di cariche cationiche) e monitorata nel tempo la concentrazione di calceina nelle soluzioni (Fig. 46).

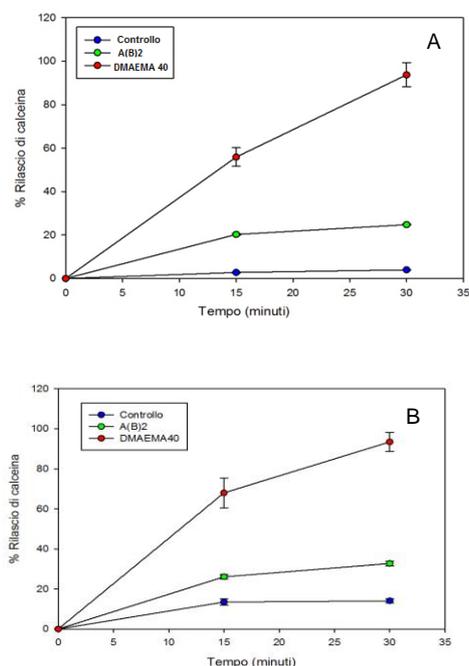


Figura 46- Percentuale di calceina rilasciata nel tempo nelle soluzioni contenenti LUV costituiti dai fosfolipidi che mimano la membrana citoplasmatica dei batteri gram negativi (A) e dei batteri gram positivi (B) in presenza dei film polimerici DMAEMA40 e A(B)₂

A contatto con i liposomi, il polimero DMAEMA40 causa la permeabilizzazione di entrambe le membrane lipidiche sintetiche. In particolare, dai grafici (Fig. 46 A,B) si evince che la maggior parte del rilascio di calceina avviene nei primi 15 minuti di contatto con il polimero mentre la completa fuoriuscita dopo 30 minuti. Contrariamente, il copolimero A(B)₂ privo di cariche cationiche, induce una permeabilizzazione meno significativa dei liposomi confermando l'inattività antimicrobica mostrata anche in Fig.31.

Questi risultati dunque, in accordo con l'esperimento dei protoplasti, dimostrano che il film polimerico DMAEMA40 agisce direttamente con le membrane cellulari, in particolar modo con la membrana citoplasmatica, indipendentemente dalla composizione lipidica e carica. Inoltre ciò indica che la parete cellulare dei batteri gram negativi non svolge un ruolo attivo durante il meccanismo d'azione del copolimero in quanto esso è in grado di uccidere efficacemente anche i protoplasti.

4.5 Interazione tra DMAEMA40 e la membrana esterna

4.5.1 Effetto dell'actinomicina D delle cellule di *E. coli* trattate con DMAEMA40

Alla luce dei risultati descritti sino ad ora è chiaro che DMAEMA40 è in grado di agire direttamente sulla membrana citoplasmatica. Tuttavia però, come descritto precedentemente, sebbene la membrana citoplasmatica rappresenti un bersaglio cellulare per DMAEMA40 esso non è in grado di distruggerla immediatamente dopo il contatto con la cellula poiché i suoi pendagli cationici non sono sufficientemente lunghi da attraversare la parete cellulare dei batteri gram negativi (Vigliotta *et al.*, 2012). Ciò mi ha fatto ipotizzare che DMAEMA40 prima di poter raggiungere la membrana citoplasmatica necessiti di danneggiare efficacemente la parete esterna delle cellule.

Per confermare tale ipotesi ho studiato l'interazione di DMAEMA40 con la membrana esterna dei batteri gram negativi la quale, come è noto, protegge gli strati sottostanti dall'attacco degli agenti biocidi rendendo i batteri resistenti agli antibiotici, detergenti ed alla maggior parte di biocidi (Nikaido and Vaara, 1985; Nikaido, 2003). Tuttavia la permeabilizzazione della membrana esterna (ME) nei batteri gram negativi non ha di per sé un effetto battericida ma potrebbe potenziare l'attività dei polimeri in quanto indebolisce le difese della cellula (Helander *et al.* 1997; Vaara 1992, 1999; Nikaido, 2003). L'interazione del film polimerico DMAEMA40 con la ME è stata studiata valutando inizialmente se, dopo il trattamento con il copolimero, le cellule di *Escherichia coli* fossero permeabili all'antibiotico actinomicina D, maggiormente attivo nei batteri gram positivi in quanto privi della membrana esterna.

L'actinomicina D è una molecola ad elevato peso molecolare (1.255 g/mol) ad azione batteriostatica capace di indurre effetti inibitori della sintesi di RNA soprattutto nei batteri gram positivi che non possiedono la membrana esterna protettiva (Sekiguchi *et al.*, 1967). I batteri gram negativi risultano particolarmente impermeabili a molecole cariche e alle macromolecole a causa della forte resistenza al loro passaggio opposta dalla membrana esterna, salvo nel caso in cui subiscono una permeabilizzazione della barriera esterna (Leive 1965; Vaara *et al.*, 1992; Kersten *et al.*, 2013). Per avvalorare l'ipotesi che DMAEMA40 causi una immediata permeabilizzazione della barriera esterna delle cellule di *Escherichia coli* come evidenziato dall'aumento della conducibilità elettrica nella sospensione batterica (Fig. 40), e dallo studio dello shock osmotico (Fig. 41) ho incubato i batteri di *Escherichia coli* per 30 e 60 minuti con il copolimero e successivamente determinato la loro sensibilità all'actinomicina D.

In dettaglio, dopo il trattamento con il copolimero, le cellule sono state recuperate e risospese in terreno ricco Luria Bertani in presenza di diverse concentrazioni di actinomicina D (25 µg/ml, 50 µg/ml e 75 µg/ml). La crescita delle cellule in presenza dell'antibiotico è stata monitorata mediante misura dell'assorbanza a 600 nm e confrontata rispetto alle cellule di controllo.

A) Trattamento con DMAEMA40 per 60 minuti			
	[actinomicina D] (µg/ml)		
	25	50	75
E. coli + actinomicina	N	N	R
E. coli +DMAEMA40 + actinomicina	N	R	R
E. coli + actinomicina / E.coli	1	1	30%
E. coli +DMAEMA40 / E.coli	1	30%	60%

B) Trattamento con DMAEMA40 per 30 minuti			
	[actinomicina D] (µg/ml)		
	25	50	75
E. coli + actinomicina	N	N	R
E. coli +DMAEMA40 + actinomicina	N	R	R
E. coli + actinomicina / E.coli	1	1	30%
E. coli +DMAEMA40 / E.coli	1	30%	40%

Tabella 9- Effetto dell'actinomicina D sulla riduzione della crescita (espressa in percentuale rispetto al controllo) della popolazione batterica di *Escherichia coli* di controllo e trattata per A) 60 minuti e B) 30 minuti con il copolimero DMAEMA40 in presenza di diverse concentrazioni di antibiotico (N= Nessun effetto sulla crescita batterica; R= riduzione della crescita batterica).

Come si evince dalla Tabella 9 le cellule non risultano sensibili all'actinomicina D a concentrazione pari a 25 µg/ml mentre alla concentrazione di 50 µg/ml si assiste ad una riduzione della crescita solo della popolazione trattata con DMAEMA40 (sia per 30 che 60 minuti; Tab.9 A, B). Al contrario, nel caso in cui l'antibiotico viene utilizzato alla concentrazione di 75 µg/ml si osserva la riduzione della crescita sia delle cellule di controllo che trattate con il film polimerico. La percentuale di inibizione della crescita causata dall'ingresso dell'antibiotico all'interno delle cellule è stata calcolata rapportando i valori di assorbimento ottenute dallo studio delle cellule *E. coli* cresciute in presenza dell'antibiotico rispetto a quelle di controllo (ossia non trattate con actinomicina D). In dettaglio, per quanto riguarda il trattamento con DMAEMA40 per 60 minuti (Tab. 9A) le cellule di *Escherichia coli* di controllo subiscono una riduzione della crescita pari al 30% quando vengono incubate con 75 µg/ml di actinomicina D. Al contrario, se le cellule di *Escherichia coli* vengono pretrattate con il film polimerico, si osserva una riduzione della popolazione del 30% ad una concentrazione di antibiotico inferiore, ossia pari a 50 µg/ml, mentre a 75 µg/ml del 60%.

Tali risultati permettono di definire un valore di concentrazione dell'antibiotico al quale le cellule risultano sensibili, ossia la minima concentrazione inibente di actinomicina D in grado di ridurre la crescita della popolazione batterica del 50% (MIC₅₀). Nel caso delle cellule esposte al polimero per 60 minuti tale valore è compreso tra 50 e 75 µg/ml mentre per le cellule non trattate esso è maggiore di 75 µg/ml.

Simile sensibilità all'actinomicina D è stata osservata anche per la popolazione batterica trattata soltanto per 30 minuti con il copolimero solo che, la riduzione della crescita in presenza di 75 µg/ml di actinomicina D, risulta inferiore rispetto al trattamento a 60 minuti (Tab. 9B). In particolare, in linea con i risultati ottenuti dal saggio dello shock osmotico (Fig.41), la presenza di una frazione minore di cellule permeabilizzate fa sì che la MIC₅₀ nel caso in cui le cellule vengono trattate per 30 minuti con DMAEMA40 è simile a quella delle cellule di controllo (circa 75 µg/ml). Questi dati indicano quindi che DMAEMA40 nei primi 60 minuti di incubazione con le cellule batteriche interagisce con la membrana esterna causandone un significativo aumento della permeabilità.

4.5.2 Interazione tra DMAEMA40 e il lipopolisaccaride (LPS)

La stabilità della membrana esterna è legata alla presenza di cationi bivalenti, come Ca²⁺ e Mg²⁺, i quali si trovano strettamente associati alle molecole di LPS poiché hanno la funzione di neutralizzare le cariche negative dei gruppi fosfato dei lipopolisaccaridi facendo in modo che non si respingano l'uno con l'altro (Vaara, 1992; Nikaido and Nakae, 1993). E' stato ampiamente dimostrato che batteri privati di questi cationi, ad esempio mediante trattamento con EDTA (Leive, 1974) e Tris buffer (Irvin et al. 1981), sono maggiormente soggetti all'azione dei polimeri antimicrobici. Tali agenti, infatti, chelando e rimuovendo i cationi dal loro sito di legame, causano il rilascio di LPS dalle membrane cellulari e quindi aumentano la permeabilità ai soluti (Sahalan *et al.*, 2013). A tal fine per valutare se l'alterazione della permeabilità della membrana esterna osservata mediante il saggio dell'actinomicina D (Tab.9) potesse essere legata all'interazione di DMAEMA40 con le molecole di LPS (e di conseguenza causare la perdita dei cationi divalenti), ho monitorato nella soluzione batterica, previo trattamento con il copolimero, la presenza del KDO (2-cheto-3-deossioottano), principale costituente del lipopolisaccaride (per dettagli sperimentali vedi Materiali e Metodi par. 6.11; Fig. 47).

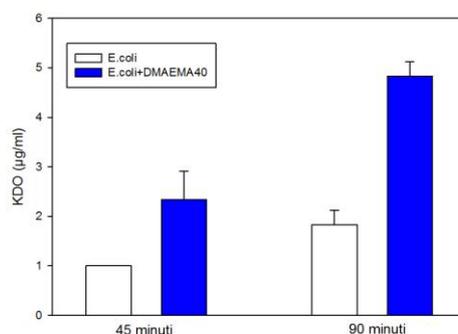


Figura 47- Concentrazione (\pm deviazione standard) di KDO rilasciata dalle cellule di *Escherichia coli* di controllo e da quelle trattate con DMAEMA40 dopo 45 e 90 minuti

Come si evince in Figura 47 l'incremento della concentrazione di KDO nella soluzione batterica in presenza di DMAEMA40 indica che il copolimero è in grado di rimuovere efficacemente le molecole di LPS presenti sul foglietto esterno della membrana. Inoltre il rilascio di LPS varia in modo dipendente dal tempo di esposizione con il copolimero. In particolare la presenza di KDO nella soluzione batterica trattata per 45 minuti con il copolimero risulta essere di circa 2.5 $\mu\text{g/ml}$ mentre dopo 90 minuti l'azione del copolimero è tale da causare il rilascio della totalità delle molecole di KDO dalla membrana esterna delle cellule trattate.

Tali dati evidenziano che DMAEMA40 a seguito dell'interazione con le cellule batteriche interagisce dapprima con le molecole di LPS causandone il rilascio graduale nel tempo sino alla completa rimozione, alterando la stabilità della membrana esterna come confermato dalla maggiore sensibilità delle cellule trattate all'actinomicina D.

Ciò probabilmente potrebbe essere una spiegazione del fatto che durante la prima ora di trattamento con DMAEMA40 non si osserva la riduzione della popolazione batterica nonostante il saggio dello shock osmotico dimostri che le cellule hanno subito un'alterazione della permeabilità della barriera esterna (Fig. 41). Di fatti un trattamento per breve tempo non permette al copolimero di rimuovere efficacemente le molecole di LPS dalla membrana esterna inducendo così un danno transitorio e recuperabile se le cellule vengono poste in condizioni ottimali. Al contrario, all'aumentare del tempo di trattamento l'interazione di DMAEMA40 causa il completo rilascio delle molecole di LPS causando dei danni irreversibili.

5.1 Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata valutata l'attività antimicrobica, emolitica ed il meccanismo d'azione di nuove superfici antimicrobiche costituite da copolimeri insolubili in acqua del tipo $A(BC)_n$ ($n=1, 2$ o 4 ; "A"=mPEG, e "BC"=PMMA-ran-PAAEMA). Si è studiata inizialmente la variazione dell'efficacia battericida di ciascuno di questi in funzione della modifica dell'architettura polimerica, della natura del gruppo alchilico sui monomeri di AAEMA e del bilancio tra densità di carica ed idrofobicità. È stato dimostrato che i copolimeri con architettura $A(BC)_2$ possiedono la maggiore densità di carica quando sintetizzati con un'elevata concentrazione di gruppi protonabili (AAEMA al 40%). Inoltre, la presenza del sostituito Metile su tale architettura ne incrementa l'azione biocida in quanto, avendo un minor ingombro sterico, permette una maggiore esposizione dei gruppi cationici sulla superficie polimerica, responsabili dell'interazione elettrostatica con la superficie anionica dei batteri. In generale, è stato dimostrato che l'attività antimicrobica di queste nuove superfici dipende essenzialmente dalla quantità di densità di carica superficiale, piuttosto che dalla componente idrofobica, in quanto i copolimeri, dopo aver raggiunto un valore soglia di densità di carica pari a $1.4 \cdot 10^{14}$ cariche/cm², mostrano tutti un'apprezzabile attività antimicrobica senza indurre attività emolitica.

Per quanto riguarda, invece, lo studio del meccanismo d'azione di tali superfici antimicrobiche sono state condotte diverse indagini allo scopo di verificare: I. l'azione del DMAEMA sull'integrità della barriera esterna che regola il passaggio di molecole tra l'esterno e l'interno della cellula batterica; II. la possibile azione sulle membrane cellulari; III. le modalità con cui il polimero esplica i suoi effetti a livello cellulare.

Le immagini ottenute al microscopio a fluorescenza e a trasmissione associate allo studio del rilascio del materiale citoplasmatico e della maggior sensibilità allo shock osmotico delle cellule trattate, hanno dimostrato che i copolimeri inducono una significativa alterazione della barriera esterna del batterio gram-negativo *Escherichia coli*. Tuttavia i danni subiti dalle cellule risultano essere irreversibili soltanto per trattamenti maggiori di 60 minuti. Di fatti, dallo studio delle cinetiche di accrescimento, è emerso che la popolazione batterica sottoposta a trattamenti prolungati con le superfici polimeriche (60 e 90 minuti) presenta delle differenze nella durata della fase di latenza della curva di crescita rispetto alle cellule di controllo. Tali dati hanno dimostrato che il danno indotto dai copolimeri nei primi 60 minuti di trattamento, risulta transitorio in quanto le cellule sono in grado di recuperare il danno causato dal polimero sulla barriera esterna. Lo studio condotto sulle cellule vitali prive di parete cellulari (protoplasti) e sulle membrane sintetiche (liposomi) ha permesso di dimostrare che i copolimeri agiscono direttamente con le membrane cellulari, in particolare con la membrana citoplasmatica. Tuttavia, nonostante la membrana citoplasmatica di *Escherichia coli* rappresenta un bersaglio cellulare per i copolimeri, la membrana esterna rappresenta il primo target che DMAEMA40 incontra. Infatti, come dimostrato dalla maggiore sensibilità delle cellule trattate con il copolimero all'actinomicina D ed all'incremento della concentrazione di KDO nella soluzione batterica, i copolimeri alterano significativamente la permeabilità della membrana esterna. Tale alterazione potrebbe causare la rimozione delle molecole di LPS ed indurre la fuoriuscita dei fosfolipidi della membrana esterna che si sostituiscono all'LPS rimosso, alterandone la composizione e permettendo alla componente

idrofobica dei copolimeri di associarsi con i fosfolipidi di membrana causando successivamente anche la lisi della membrana citoplasmatica. Sulla base di questi risultati, dunque, il meccanismo d'azione ipotizzato per le superfici PEG(MMA-AAEMA)_n sembra essere simile a quelle delle superfici antimicrobiche costituite da polimeri con corte catene alchiliche, ma caratterizzate da un'elevata densità di carica superficiale, le quali mediante un processo di scambio di specie ioniche, causano il rilascio dell'LPS e alterano la stabilità delle membrane cellulari (Murata *et al.*, 2007; Matrella *et al.*, 2015). Questi dati aprono la strada a studi futuri atti ad approfondire la modalità dell'azione del polimero. Ad esempio, mediante tecniche molecolari, potrebbe essere studiata la variazione dell'espressione di specifici geni ipotizzati come possibili target molecolari della risposta al polimero. I geni che potrebbero essere coinvolti in tale risposta riguardano più funzioni cellulari: geni della sintesi dei componenti di membrana (*fabA*, *fabR* e *fadR*), geni di risposta a stress ossidativo (*soxS*) e geni del metabolismo energetico (*recA*). Inoltre, l'elevata antimicrobicità e la biocompatibilità di tali copolimeri ne permettono l'applicazione in diversi campi come quello biomedico (ad esempio come superfici per sterilizzare impianti medici) ambientale (come filtri per gli impianti di depurazione delle acque) e per la preparazione di imballaggi alimentari (inibendo la colonizzazione microbica degli alimenti contribuendo ad aumentare il tempo di conservazione).

6.1 Materiali

Il batterio *Escherichia coli* (ceppo JM109) è stato acquistato presso Promega (<http://www.promega.com/products>; cat. No P 9751). Tutti i reagenti, i fluorocromi [CTC (5-ciano-2,3-di-(P-tolil)tetrazolio), HOECHST, FITC (fluorescina isotiocianato destrano)], i dischi di nitrocefina, la Poli(L-lisina) e la calceina sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich ed utilizzati senza ulteriori purificazioni.

I fosfolipidi 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine (DOPE), e cardiolina (CL), insieme al kit di estrusione "mini-extruder" sono stati acquistati presso Avanti Polar Lipids.

Tutti i polimeri PEG(MMA-AAEMA)_n testati sono stati sintetizzati dalla dott.ssa Carmela Vitiello presso il laboratorio di sintesi del dipartimento di chimica e biologia dell'Università degli studi di Salerno.

6.2 Saggi microbiologici

I test antimicrobici sulle superfici insolubili PEG(MMA-AAEMA)_n sono stati condotti utilizzando il protocollo standard modificato ASTM: E2149-01 *Standard Test Method for Determining the Anti-microbial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions* (E2149-2110 Annual Book, 2002).

Una colonia di *Escherichia coli* JM109 cresciuta su terreno agarizzato Luria-Bertani (10 g·L⁻¹ di triptone, 5 g·L⁻¹ di estratto di lievito, 10 g·L⁻¹ di cloruro di sodio e agar 15 g·L⁻¹) (LB-agar) è stata inocolata in 5 mL di brodo LB (LB senza agar) a 37 °C per 24 ore in costante agitazione (250 rpm). Successivamente i batteri sono stati centrifugati per 10' a 3500g e risospesi in acqua distillata sterile alla concentrazione di 0.01 OD₆₀₀ mL⁻¹ (corrispondente a 10⁷ cellule mL⁻¹) (SB). Successivamente trecento microlitri di tale sospensione batterica sono stati incubati con 1 cm² di ciascun film polimerico (tagliato in 4 parti uguali) a 37°C ed in costante agitazione (250 rpm) per tutta la durata dell'esperimento. La conta microbica totale sopravvissuta dopo il trattamento con i copolimeri è stata determinata mediante procedura di semina in piastre Petri contenenti LB-agar delle diluizioni seriali (1:10) di tutti i campioni. Le piastre sono state incubate a 37°C per 12 h. I risultati della determinazione quantitativa dei microrganismi sono stati espressi in UFC - unità formanti colonie (Vicsek *et al.*, 1990).

6.3 Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente mediante il software Sigma plot 12.0 (Systat Software, Inc.) e la significatività delle differenze tra l'attività antimicrobica dei vari copolimeri è stata testata mediante ANOVA (analisi della varianza) a due vie. Le analisi sono state effettuate su dati normalizzati ed i test post-hoc di Holm-Sidak e Dunn sono stati utilizzati per confronti multipli.

6.4 Test di Emolisi

La citotossicità dei copolimeri PEG(MMA-AAEMA)_n è stata testata su cellule di globuli rossi umani (RBC) monitorando il rilascio di emoglobina nel tempo (Sovadinova *et al.*, 2010). I globuli rossi sono stati ottenuti da sangue umano fresco (risospeso in 1.2 mg mL⁻¹ di EDTA) mediante estrazione con buffer fosfato (PBS) (150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.4). In dettaglio il sangue è stato diluito in PBS (1:10 v/v) e centrifugato per 10 minuti a 1500 g. Tale operazione è stata ripetuta tre volte per allontanare plasma e globuli bianchi. Successivamente è stato recuperato il pellet contenente i RBC e diluito in 1ml di PBS. Questa sospensione è stata ulteriormente diluita in PBS di un fattore 40 per ottenere una soluzione stock di RCB (0.3% di eritrociti). 50 mL di tale soluzione stock è stata diluita in 450 mL di PBS ed incubata in presenza dei copolimeri a 37°C in costante agitazione (250 rpm). Il rilascio di emoglobina è stato quantificato misurando la variazione di assorbanza dei campioni a 415 nm, previa centrifugazione per 5 minuti a 1500 g. PBS privo di polimeri e una soluzione di Triton X-100 (1%), addizionati alla stessa quantità di RBC, sono stati usati come controlli negativo e positivo, rispettivamente. A ciascun risultato è stato sottratto il valore di assorbanza rilevato per il controllo PBS. I dati sono stati riportati in una scala percentuale che va dal 100% di emolisi, relativa ai campioni contenenti Triton X-100 in cui si osserva la completa lisi dei globuli rossi (controllo positivo), allo 0% relativo ai campioni con solo PBS (assenza di emolisi, controllo negativo).

6.5 Microscopia a Fluorescenza

Il metodo della tripla colorazione descritto da Mangoni *et al.*, 2004 è stato utilizzato per determinare, in una singola preparazione con i fluorocromi HOECHST, CTC e FITC, il numero totale di cellule di *Escherichia coli* (vive+ morte), il numero di cellule vive e quello delle cellule che hanno subito una permeabilizzazione delle membrane a causa dei copolimeri. Sono state preparate tre soluzioni stock: CTC e DAPI sono stati risospesi in acqua alla concentrazione di 6 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹ rispettivamente, mentre la sonda FITC in acetone alla concentrazione di 10 mg mL⁻¹. La sospensione di batteri *Escherichia coli* (SB) è stata preparata come descritto nel paragrafo 6.2 e incubata con il copolimero DMAEMA40 per 4 ore. Dopo il trattamento il copolimero è stato rimosso e la sospensione batterica trattata è stata incubata con 900 µl di CTC (5 mM in PBS) per 90 minuti a 37°C a 150 rpm allo scopo di evidenziare le cellule ancora vive dopo il trattamento con il polimero. Prima di fissare la sospensione batterica con CTC sui vetrini per microscopio questi sono stati lavati con soluzione di idrossido di sodio (1M) ed etanolo per 30 minuti, sciacquati con acqua distillata ed incubati con una soluzione di poli(L-lisina) 100 mg mL⁻¹ sciolta in PBS (150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.4) a 37°C per circa un'ora. Questo trattamento (detto *coating*) favorisce l'attecchimento delle cellule sulla superficie del vetrino. La sospensione cellulare con CTC è stata quindi versata sui vetrini così trattati ed incubata a 30°C per 45 minuti al fine di permettere l'adesione dei batteri. I vetrini sono stati poi sciacquati con PBS e aggiunto 1 ml di soluzione HOECHST (10 µg mL⁻¹ in PBS). Dopo 30 minuti a 30°C la soluzione HOECHST è stata rimossa e i vetrini sono stati nuovamente sciacquati con PBS. La soluzione stock di FITC è stata diluita a 6 µg mL⁻¹ in PBS e

aggiunta sui vetrini incubati poi a 30 °C per 30 minuti e lavati come descritto sopra. Il controllo costituito dalla sospensione di batteri *Escherichia coli* non trattati con DMAEMA40 è stato trattato allo stesso modo dei campioni. I vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza Leica DM4000-6000B e le immagini analizzate e processate utilizzando il software LAS AF.

6.6 Preparazione delle cellule per l'osservazione al Microscopio Elettronico a Trasmissione

Una sospensione batterica di *Escherichia coli* (SB) è stata preparata come descritto nel paragrafo 6.2 alla concentrazione di 0.05 OD₆₀₀ mL⁻¹. Successivamente è stata incubata con DMAEMA40 per 1.5 ore a 37°C in costante agitazione (250 rpm) e, in seguito, previa rimozione del copolimero, centrifugata a 3500 g per 10' al fine di recuperare il pellet batterico. Tale pellet è stato fissato con una soluzione al 2% di glutaraldeide, lavato e post fissato con una soluzione di all' 1% di OsO₄. Il campione di controllo costituito dalla sospensione batterica di *E.coli* non incubata con DMAEMA40 è stato trattato allo stesso modo.

Le cellule sono state osservate al microscopio elettronico a trasmissione Zeiss LEO 912AB EFTEM presso la Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli.

6.7 Saggio del rilascio di materiale intracellulare

L'integrità delle membrane cellulari dei batteri *Escherichia coli* incubati con DMAEMA40 sono state valutate mediante saggi che rilevano la presenza di materiale periplasmatico e citoplasmatico nella sospensione batterica. Dopo l'incubazione in LB a 37 °C per 12 h i batteri di *Escherichia coli* sono stati centrifugati a 6000g per 10 minuti e risospesi in acqua distillata sterile alla concentrazione di 10⁶ CFU ml⁻¹ in presenza di DMAEMA40 per 4 ore a 37°C in costante agitazione (250 rpm). Per valutare l'integrità della membrana esterna 200 µl di tale sospensione sono stati posti su dischi imbevuti di nitrocefina (sigma) i quali, in contatto con l'enzima periplasmatico β-lattamasi, virano immediatamente il colore da bianco a rosso (Murray *et al.*, 1999). Per quanto riguarda la membrana citoplasmatica invece è stato misurato il rilascio di componenti intracellulari (come K⁺, PO₄³⁻, amminoacidi, proteine, ecc.) detectabili misurando l'assorbanza dei campioni a 260 nm nel tempo (Chen *et al.*, 2002) e la perdita di elettroliti nella sospensione batterica trattata con DMAEMA40 mediante un conduttimetro (DDS-307, Precision & Scientific Instrument Co. Ltd., Shanghai, China) come descritto da Lee *et al.*, 1998.

6.8 Resistenza allo shock osmotico

Per valutare l'alterazione della permeabilità delle cellule di *Escherichia coli* trattate con DMAEMA40 è stato condotto un saggio di vitalità cellulare verificando la resistenza allo shock osmotico delle stesse in una soluzione ipotonica dopo trattamento con il copolimero. E' stata preparata una sospensione batterica di

Escherichia coli (SB) come descritto nel paragrafo 6.2 alla concentrazione di $0.01 \text{ OD}_{600} \text{ mL}^{-1}$. Trecento microlitri di tale sospensione sono stati incubati a 37°C in costante agitazione (250 rpm) in tre diverse provette contenente ciascuna 1 cm^2 del film DMAEMA40. Immediatamente dopo 30, 60 e 90 minuti di trattamento i copolimeri DMAEMA40 sono stati allontanati dalle soluzioni e da queste prelevati $100 \mu\text{l}$ per determinare la conta microbica totale mediante procedura di semina in piastre Petri contenenti LB-agar delle diluizioni seriali (1:10) di tutti i campioni (tempo0). Le piastre sono state incubate a 37°C per 12 ore e successivamente contate il numero di unità formanti colonia (UFC). Tale operazione è stata ripetuta dopo 5 ore (tempo 1), 24 ore (tempo 2) e 48 ore (tempo 3) dalla rimozione dei copolimeri al fine di determinare e confrontare le UFC. Rapportando il numero delle cellule sopravvissute rispetto al campione di controllo (costituito da cellule di *E.coli* non trattate con DMAEMA40) è stata ottenuta la percentuale di cellule sopravvissute per ogni tempo dell'esperimento.

6.9 Curve di crescita

Una colonia di *Escherichia coli* JM109 crescita su terreno agarizzato Luria-Bertani ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di triptone, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di estratto di lievito, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di cloruro di sodio e agar $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (LB-agar) è stata inoculata in 5 mL di brodo LB (LB senza agar) a 37°C per 24 ore in costante agitazione (250 rpm). Successivamente i batteri sono stati centrifugati per 10' a 3500g e risospesi in acqua distillata sterile alla concentrazione di $0.01 \text{ OD}_{600} \text{ mL}^{-1}$ (corrispondente a 10^7 cellule mL^{-1}) in presenza di 1 cm^2 del film DMAEMA40 per 30, 60 e 90 minuti a 37°C ed in costante agitazione (250 rpm).

Trascorso ciascun intervallo di trattamento i batteri sono stati inoculati in beute contenenti terreno Luria Bertani non agarizzato alla concentrazione di 500.000 cellule mL^{-1} ed incubati a 37°C . La crescita cellulare è stata monitorata spettrofotometricamente tramite lettura dell'assorbanza a 600 nanometri ogni 40 minuti per ciascun campione. Graficando i valori ottenuti relativi al numero di cellule in funzione del tempo è stata ottenuta la curva di crescita di ciascuna popolazione batterica dalla quale è stata calcolata il tempo di generazione e la velocità di crescita in fase esponenziale. Il tempo di generazione (g), cioè il tempo richiesto da una cellula batterica per duplicarsi, è stato calcolato rapportando la durata di crescita esponenziale dei batteri, espressa in ore, e il numero di generazioni (n). Il numero di generazione è stato calcolato mediante la seguente formula: $n = (\log N - \log N_0) / 0.301$; in cui N_0 e N rappresentano il numero di cellule batteriche iniziali e finali della popolazione in crescita esponenziale. La velocità di generazione si ottiene invece dal rapporto del numero di generazioni rispetto al tempo di crescita esponenziale (n/t).

6.10 Saggio dello studio della riparazione dei danni alla barriera esterna

Per valutare se DMAEMA40 inducesse un danno irreversibile o meno alla barriera esterna delle cellule di *Escherichia coli* dopo 60 minuti di trattamento le cellule sono

state poste prima in condizioni favorevoli alla crescita e successivamente verificata la loro resistenza allo shock osmotico in soluzione ipotonica. Una sospensione batterica di *Escherichia coli* (SB) è stata preparata alla concentrazione di $0.01 \text{ OD}_{600} \text{ mL}^{-1}$ come descritto nel paragrafo 6.2 ed incubata con DMAEMA40 per 60 minuti a 37°C in costante agitazione (250 rpm). Immediatamente dopo 60 minuti di trattamento il copolimero DMAEMA40 è stato allontanato dalla sospensione e da questa prelevati $100\mu\text{l}$ per determinare la conta microbica totale mediante procedura di semina in piastre Petri contenenti LB-agar delle diluizioni seriali (1:10) di tutti i campioni (tempo0). Successivamente la sospensione batterica è stata trasferita in beute contenente terreno ricco Luria Bertani ed incubata a 37°C per 30 minuti (corrispondente alla differenza della durata della fase di latenza delle cellule trattate rispetto al controllo). Trascorsi 30 minuti le cellule sono state centrifugate per 10 minuti a $6000g$ e risospese in 2 ml di acqua distillata sterile (shock osmotico). Da tale soluzione sono stati prelevati $100\mu\text{l}$ per procedere al piastramento su Piastre Petri contenenti il terreno Luria Bertani agarizzato. Le piastre sono state incubate a 37°C per 12 ore e successivamente contate il numero di unità formanti colonia (UFC). Tale operazione è stata ripetuta anche dopo 5 ore, 24 ore e 48 ore di incubazione in acqua ed alla fine sono state confrontate le UFC e analizzati i risultati. Rapportando il numero delle cellule sopravvissute rispetto al campione di controllo (costituito da cellule di *E.coli* che hanno subito trattamento con DMAEMA40 per 60 minuti ed incubate subito in acqua distillata) è stata ottenuta la percentuale di cellule sopravvissute per ogni tempo dell'esperimento.

6.11 Protoplasti di *Escherichia coli*

La trasformazione di cellule di *Escherichia coli* in protoplasti è stata ottenuta seguendo il protocollo descritto da Dathe *et al.*, 2002. Cinque millilitri di una coltura cellulare di *Escherichia coli* cresciuta *overnight* in terreno liquido Luria Bertani (LB) a 37°C è stata diluita in 20 millilitri di brodo di saccarosio (triptone 10 g l^{-1} , saccarosio 100 g l^{-1} , estratto di carne 10 g l^{-1} , cloruro di sodio $3,5 \text{ g l}^{-1}$ e glucosio 1 g l^{-1}) incubata a 37°C a 120 rpm sino a che la concentrazione dei batteri nella soluzione non raggiungesse $0.9 \text{ OD}_{600}\text{mL}^{-1}$.

Successivamente $200 \mu\text{l}$ di tale coltura cellulare sono stati centrifugati a 4°C per 10 minuti a $3000 g$ ed il pellet risospeso, in un volume dieci volte più concentrato rispetto all' OD_{600} , in una soluzione di Tris (0.1 M pH 8) contenente saccarosio al 20%. La sospensione è stata trasferita in beute sterili ed agitata su piastra magnetica stabilizzando la temperatura a 37°C ed aggiunto, lentamente, il lisozima alla concentrazione finale di $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Trascorsi 10 minuti è stato aggiunto EDTA a pH 8 (1:10 vol/vol) e monitorata al microscopio ottico a contrasto di fase (Leica DM 750), la trasformazione della morfologia delle cellule da bastoncellare a sferica che si manifesta a causa della perdita della parete cellulare nei batteri.

I protoplasti ottenuti sono stati filtrati con siringa e filtro di lana-cotone per separarli dai detriti cellulari, centrifugati a $900 g$ e sciacquati con TRIS (0.1M pH 8) contenente 20% di saccarosio. Per valutare l'attività antimicrobica di DMAEMA40 $300\mu\text{l}$ della sospensione di protoplasti è stata incubata con DMAEMA40 e valutata la percentuale

di cellule sopravvissute nel tempo mediante conta delle unità formanti colonia su piastre petri contenenti terreno LB agarizzato con aggiunta di saccarosio al 20%. I dati ottenuti sono stati confrontati con le UFC nel tempo di due soluzioni di controllo costituite da un campione di soli protoplasti e da uno con cellule intatte di *Escherichia coli* risospese in Tris buffer (0.1M pH 8 con 20% di saccarosio) in presenza di DMAEMA40.

6.12 Preparazione dei liposomi (LUV)

Liposomi costituiti da larghe vescicole unilamellari (LUV) omogenee sono state ottenute mediante il metodo di estrusione utilizzando una Mini extruder (Avanti Polar Lipids) (Som *et al.*, 2008). Sono state preparate inizialmente due soluzioni buffer: Buffer A (40 mM calceina, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) e Buffer B (10 mM di Na₂HPO₄ i 90 mM di NaCl pH 7.0). I fosfolipidi DOPG, DOPE e CL sono stati acquistati in soluzioni stock da 25 mg ml⁻¹ in CHCl₃. Per la preparazione di LUV simili alle membrane citoplasmatiche dei batteri gram positivi sono stati utilizzati i fosfolipidi DOPG e CL in rapporto 12:1 mentre per quelle dei batteri gram negativi i fosfolipidi DOPE e DOPG in rapporto 4:1. Tali soluzioni sono state introdotte in palloni a fondo tondo al fine di far evaporare il cloroformio sotto flusso di azoto ed ottenere un sottile film lipidico. I film sono stati poi idratati per un' ora con 1 ml di Buffer A e successivamente sottoposti a 5 cicli di congelamento e scongelamento utilizzando azoto liquido e un bagnetto con acqua bollente per lo scongelamento. Alla fine dei cicli le soluzioni sono state estruse 10 volte attraverso membrane di policarbonato con pori di dimensione di 400 nm allineate tra due coppie di supporti di membrane presenti all'interno delle siringhe del kit miniestruder (Fig. 48).

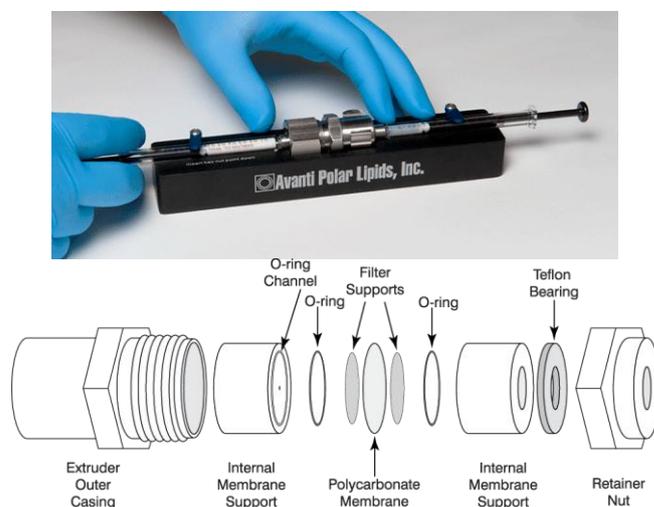


Figura 48. a) Assemblaggio dei componenti della Mini extruder (Avanti Polar Lipids)

La calceina in eccesso è stata rimossa mediante filtrazione con gel utilizzando colonnine Sephadex G-50 e come eluente il Buffer B.

Un millilitro della soluzione finale è stata diluita in 20 ml di Buffer B al fine di ottenere una soluzione stock di LUV con una concentrazione finale di lipidi di circa 0.5 mM. 300 microlitri della soluzione stock è stata incubata con DMAEMA40 e monitorata nel tempo l'intensità dell' emissione della fluorescenza ($\lambda_{em}= 510$ nm, $\lambda_{ex}= 450$) della calceina rilasciata dai LUV in contatto con il copolimero. Per la normalizzazione dei dati è stata costruita una linea base misurando la fluorescenza emessa dai LUV senza l'aggiunta di DMAEMA40. Inoltre, al termine di ogni misurazione, è stata determinata la massima fluorescenza emessa da ciascun campione corrispondente al 100% di rottura dei LUV aggiungendo 20 μ l di Triton (in 20% di DMSO). Con questi dati la misura della densità di fluorescenza è stata convertita in percentuale di rilascio di calceina nel tempo (Lienkamp *et al.*, 2009).

6.13 Saggio di diffusione dell'actinomicina D in cellule di *Escherichia coli*

L'actinomicina D è un antibiotico generalmente incapace di attraversare la barriera esterna di *E. coli* almeno che questa non abbia subito una alterazione della permeabilità tale da permettere l'ingresso dell'antibiotico nella cellula e di conseguenza la morte del batterio (Sekiguchi *et al.*, 1967). Per determinare se il copolimero DMAEMA40 è in grado di alterare la barriera esterna del batterio è stato incubato in una sospensione batterica di *E.coli* 0.01 OD₆₀₀ mL⁻¹ a 37°C in costante agitazione per 30 minuti e 60 minuti.

Al termine dei trattamenti le cellule sono state recuperate e risospese in 4 provette contenenti terreno Luria Bertani e actinomicina D rispettivamente alla concentrazioni

di 0, 25, 50 e 75 µg/ml ed incubate per 16 ore a 37°C. La crescita cellulare dei batteri è stata monitorata nel tempo misurando l'assorbanza a 600 nm tramite spettrofotometro UV-Visibile (UV-1800, Shimadzu)

6.14 Saggio del rilascio del 2-cheto-3-deossioctano (KDO)

Il 2-cheto-3-deossioctano (KDO) rappresenta un costituente fondamentale delle molecole di LPS e viene utilizzato come marker quantitativo della presenza di lipopolisaccaride ed indice dell'alterazione della permeabilizzazione della membrana esterna nei batteri gram negativi (Karkhanis *et al.*, 1978).

Il metodo utilizzato per determinare il KDO nelle soluzioni batteriche di *Escherichia coli* ($0.01 \text{ OD}_{600} \text{ mL}^{-1}$) trattate con DMAEMA40 per 45 e 90 minuti, è stato condotto secondo il protocollo descritto da Karkhanis *et al.*, 1978. Una soluzione stock di KDO di 0.1 mg mL^{-1} (Sigma) è stata risospesa in acqua distillata ed utilizzata per ottenere una retta di calibrazione con un range di concentrazione da 2-20 µg mL⁻¹. Un millilitro di acido solforico (0.4 M) è stato aggiunto in ciascuna concentrazione standard di KDO e nei campioni di cellule trattate con DMAEMA40. La reazione con l'acido è stata fatta avvenire ponendo i campioni in un bagnetto a 100°C per 30 minuti e successivamente raffreddati a temperatura ambiente in ghiaccio. I campioni sono stati centrifugati a 12000xg per 5 minuti e 0.5 mL di surnatante è stato posto in un nuovo tubo contenente acido periodico (0.25 mL di 0.04M di HIO₄) sciolto in 0.25 M di H₂SO₄. I campioni sono stati vortexati e lasciati a temperatura ambiente per 20 minuti.

Successivamente l'arsenito di sodio (0.25 ml di 2.6% di NaAsO₂) in 0.5 M di HCl è stato aggiunto alle soluzioni per degradare l'acido periodico al seguito del quale scompare la colorazione giallo-marrone assunta dai campioni. Tale colorazione diventa rosa dopo l'aggiunta di acido tiobarbiturico (0.5 mL di 0.6% di TBA) incubando i campioni a 100°C per 15 minuti.

Al termine dell'incubazione è stato immediatamente aggiunto 1mL di DMSO al fine di stabilizzare la colorazione dei campioni e incrementarne l'intensità di circa il 30%. I campioni sono stati analizzati allo spettrofotometro UV-Visibile (UV-1800, Shimadzu) misurando la variazione di assorbanza a 550 nm utilizzando come bianco per calibrare lo strumento, una soluzione trattata come sopra ma senza l'aggiunta di KDO. Per ottenere la curva standard volumi di concentrazione nota della soluzione stock di KDO (0.1 mg mL^{-1}) sono stati risospesi in 0.4 M di H₂SO₄ e trattati come sopra.

Abel T., Cohen J.I., Engel R., Filshtinskaya M., Melkonian A., Melkonian K. **2002**. Preparation and investigation of antibacterial carbohydrate-based surfaces. *Carbohydr Res* **337**, 2495–9.

Álvarez-Paino M., Muñoz-Bonilla A., López-Fabal F., Gómez-Garcés J.L., Heuts J.P.A., Fernández-García M. **2015**. Effect of glycounits on the antimicrobial properties and toxicity behavior of polymers based on quaternized DMAEMA. *Biomacromolecules* **16**, 295–303.

An Y.H., Friedman R.J. **1998**. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **43**, 338–348.

Asri L.A.T.W., Crismaru M., Roest S., Chen Y., Ivashenko O., Rudolf P., Tiller J.C., *et al.* **2014**. A shape-adaptive, antibacterial-coating of immobilized quaternary-ammonium compounds tethered on hyperbranched polyurea and its mechanism of action. *Adv. Funct. Mater.*, **24**, 346–355.

Barbey R., Lavanant L., Paripovic D., Schuwer N., Sugnaux C., Stefano Tugulu S., Klok H.A. **2009**. Polymer brushes via surface-initiated controlled radical polymerization: synthesis, characterization, properties, and applications. *Chem. Rev.*, **109**, 5437

Barzic A.I., Ioan S. **2015**. Antibacterial drugs—From basic concepts to complex therapeutic mechanisms of polymer systems. In Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials; Bobbarala, V., Ed.; *Science, Technology and Medicine*: London, UK.

Baul U., Kuroda K., Vemparala S. **2014**. Interaction of multiple biomimetic antimicrobial polymers with model bacterial membranes. *J Chem Phys* **141**, 084902.

Berkovich A., Orlov V., Melik-Nubarov N. **2009**. Interaction of polyanions with electroneutral liposomes in a slightly acidic medium. *Polym Sci Ser A* **51**, 648–57.

Bieser A.M. and Tiller J.C. **2011**. Mechanistic considerations on contact-active antimicrobial surfaces with controlled functional group densities. *Macromol Biosci* **11**, 526–34.

Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E.Jr., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. **2009** Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1–12.

Bonilla M.A., Fernández-García M. **2012**. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 281–339.

Brodkorb F., Fischer B., Kalbfleisch K., Robers O., Braun C., Dohlen S., Kreyenschmidt J., Lorenz R. *et al.* **2015**. Development of a new monomer for the synthesis of intrinsic antimicrobial polymers with enhanced material properties. *Int J Mol Sci* **16**, 20050–20066.

Brogden K. A. **2005**. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238–250.

Busscher H.J., van Der Mei H.C., Subbiahdoss G., Jutte P.C., Van Den Dungen J.J.A.M., Zaat S.A.J., Schultz M.J., Grainger D. W. **2012**. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Sci. Transl. Med.* **4**, 153rv10-153rv10.

Caillier L., Taffin de Givenchy E., Levy R., Vandenberghe Y., Geribaldi S., Guittard F. **2009**. Polymerizable semi-fluorinated gemini surfactants designed for antimicrobial materials. *J Colloid Interface Sci.* **332**, 201–7.

Cappelier J.M., Lazaro B., Rossero A., Fernandez-Astorga A. and Federighi, M. **1997**. Double staining (CTC-DAPI) for detection and enumeration of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells. *Vet. Res.* **28**, 547–555

Cen L., Neoh K.G., Kang E.T. **2003**. Surface functionalization technique for conferring antibacterial properties to polymeric and cellulosic surfaces. *Langmuir.* **19**:10295–303.

Chen H.L., Hou K.C., **1987**. Fluorometric study of the side-chain effect on protein adsorption character in cellulose-polymer composite ion exchangers. *React. Polym. Ion Exch. Sorb.* **5**, 5-11.

Chen C.Z., Cooper S.L. **2000**. Recent advances in antimicrobial dendrimers. *Adv Mater.***12**, 843–6.

Chen C.Z., Cooper S.L. **2002**. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials.* **23**, 3359–68.

Cheng Z., Zhu X., Shil Z.L., Neoh K.G., Kang E.T. **2006**. Polymer microspheres with permanent antibacterial surfaces from surface-initiated atom transfer radical polymerization of 4-vinylpyridine and quaternization. *Surf Rev Lett.***13**, 313-8.

Choi O., Deng K.K., Kim N.J., Ross L., Surampalli R.Y., Hu Z. **2008**. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water research* **42**, 3066-3074.

Christofi N. and Ivshina I.B. **2002**. Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to 3CR12 stainless steel and glass. *Water SA.* **27**, 21-26.

Ciston S., Lueptow R.M., Gray K.A. **2008**. Bacterial attachment on reactive ceramic ultrafiltration membranes, *J. Membr. Sci.* **320**, 101-107.

Compagnoni M.A., Pero A.C., Ramos S.M.M., Marra J., Paleari,A.G. and Rodriguez L.S. **2014**. Antimicrobial activity and surface properties of an acrylic resin containing a biocide polymer. *Gerodontology* **31**, 220–226.

Dathe M., Meyer J., Beyermann M., Maul B., Hoischen C., Bienert. M. **2002**. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **1558**,171–186.

Davies B.N., Horton E.W., Withrington P.G. **1968**. The occurrence of prostaglandin E2 in splenic venous blood of the dog following splenic nerve stimulation. *British journal of pharmacology and chemotherapy*. **32**, 127-135.

Dayan F.E., Watson S.B., Galindo J.C.G., Hernández A., Dou J., McChesney J.D. **1999**. Phytotoxicity of quassinoids: physiological responses and structural requirements. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **65**, 15-24.

Dohlen S., Braun C., Brodkorb F., Fischer B., Ilg Y., Kalbfleisch K., Lorenz R., Robers O., Kreyenschmidt M., Kreyenschmidt J. **2016**. Potential of the polymer poly-[2-(tert-butylamino) methylstyrene] as antimicrobial packaging material for meat products. *J Appl Microbiol*. **121**, 1059–1070.

Dunne W. M. **2002**. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*. **15**, 155-166.

Elsabee M.Z., Abdou E.S. **2013**. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl*. **33**, 1819–1841.

Engler A. C., Wiradharma N., Ong Z. Y., Coady D. J., Hedrick J. L., Yang Y.Y. **2012**. Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi-drug-resistant infections, *Nano Today* **7**, 201–222.

Epand R.F., Schmitt M.A. , Gellman S.H. , Epand R.M. **2006**. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta-antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*. **1758**, 1343–1350.

Epand R. M. and R. F. Epand **2009**. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 289-294.

Ferreira L. and Zumbuehl A. **2009**. Non-leaching surfaces capable of killing microorganisms on contact. *J Mater Chem*.**19**, 7796–806.

Fischer D., Li X. Y., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Kissel T., **2003**. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. **24**, 1121.

Franklin T. J. and Snow G.A. **2005**. Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action, 6th edition. New York: Springer.

Fristrup C, Jankova K, Hvilsted S. **2009**. Surface-initiated atom transfer radical polymerization-a technique to develop biofunctional coatings. *Soft Matter*.**5** ,4623-4634.

Fuchs AD, Tiller JC. **2006**. Contact-active antimicrobial coatings derived from aqueous suspensions. *Angew Chem Int*. **45**, 6759-62.

Gabriel G.J., Maegerlein J.A., Nelson C.E., Dabkowski J.M., Eren T., Nusslein K., Tew G.N. **2009**. Comparison of facially amphiphilic versus segregated monomers in the design of antibacterial copolymers. *Chem Eur J*.**15**,433–9.

Ganewatta M.S. and Tang C. **2015**. Controlling macromolecular structures towards effective antimicrobial polymers. *Polymer*. **63**, A1–A29.

Gao B.J., Zhang X., Zhu Y. **2007**. Studies on the preparation and antibacterial properties of quaternized polyethyleneimine. *J Biomater Sci Polym Ed*.**18**, 531–44.

Gelman M.A., Weisblum B, Lynn DM, Gellman SH. **2004**. Biocidal activity of polystyrenes that are cationic by virtue of protonation. *Org Lett*.**6**, 557-60.

Gilbert P., McBain A.J. **2003**. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*.**16**,189-208.

Gilbert P., Moore L.E. **2005**. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol*.**99**, 703-15.

Gould I.M. **1999**. A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 459–465.

Gozzelino G., Lisanti C., Beneventi S., **2013**. Quaternary ammonium monomers for UV crosslinked antibacterial surfaces, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **430**, 21–28.

Haldar J., An D., Alvarez de Cienfuegos L., Chen J., Klibanov A.M. **2006** . Polymeric coatings that inactivate both influenza virus and pathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*.**103**, 17667-71.

Haldar J., Weight A.K., Klibanov A.M. **2007**. Preparation, application and testing of permanent antibacterial and antiviral coatings. *Nat Protoc*.**2**, 2412-7.

Hale J.D. and Hancock R.E. **2007**. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **5**, 951-959.

Hamilton W.A. **1968**. The mechanism of the bacteriostatic action of tetrachlorosalicylanilide: a membrane-active antibacterial compound. *J Gen Microbiol.* **50**, 441-58.

Hancock R.E.W., Wong P.G.W. **1984**. Compounds which increase the permeability of the pseudomonas-aeruginosa outer-membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**, 48–52.

Harding J.L. and Reynolds M.M. **2014**; Combating medical device fouling. *Trends in Biotechnology.* **32**, 140-6

Hegstad K., Langsrud S., Lunestad B.T., Scheie A.A., Sunde M., Yazdankhah SP. **2010**. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist.***16**, 91-104.

Heir E., Sundheim G., Holck A.L. **1999**. The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J App Microbiol.***86**, 378-88

Hewitt C.J., Franke R., Marx A., Kossmann B. and Ottersbach P. **2004**. A study into the anti-microbial properties of an amino functionalized polymer using multi-parameter flow cytometry. *Biotechnol Lett.* **26**, 549–55.

Hu F.X., Neoh K.G., Cen L., Kang E.T. **2005**. Antibacterial and antifungal efficacy of surface functionalized polymeric beads in repeated applications. *Biotech Bioeng.***89**, 474–84.

Huang J., Murata H., Koepsel R. R. , Russell A. J. , Matyjaszewski K. **2007**. Antibacterial polypropylene via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules.* **8**, 1396–1399.

Hugo W. B., Longworth, A. R. **1964**. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **16**, 655-662.

Ilker M.F., Nusslein K., Tew G.N., Coughlin E.B. **2004**. Tuning the hemolytic and antibacterial activities of amphiphilic polynorbornene derivatives. *J Am Chem Soc.***126**,15870-5.

Ignatova M., Voccia S., Gilbert B., Markova N., Mercuri P.S., Galleni M. **2004**. Synthesis of copolymer brushes endowed with adhesion to stainless steel surfaces and antibacterial properties by controlled nitroxide-mediated radical polymerization. *Langmuir.* **20**, 10718–26.

Inhester M., Ottersbach P. **2003**. Kosmetische formulierungen mit antimikrobiellen polymeren. WO2003068316 A1, 21 August (In German).

Ikeda T., Ledwith A., Bamford C.H., Hann R.A. **1984**. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* **769**, 57-66.

Ikeda T., Tazuke S., Bamford C.H., Ledwith A. **1985**. Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocide with phospholipid membranes as probed by 8- anilinonaphthalene-1-sulfonate. *Bull Chem Soc Jpn.* **58**, 705-9.

Jaeger W., Bohrisch J, Laschewsky A. **2010**. Synthetic polymers with quaternary nitrogen atoms-Synthesis and structure of the most used type of cationic polyelectrolytes. *Prog Polym Sci.* **35**, 511-77.

Jahnsen R. D., N. , Frimodt-Møller, Franzyk H. **2012**. Antimicrobial activity of peptidomimetics against multidrug-resistant *Escherichia coli*: a comparative study of different backbones. *J Med Chem.* **55**, 7253-7261.

Jain A., Duvvuri L.S., Farah S., Beyth N., Domb A.J., Khan W. **2014**. Antimicrobial polymers. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1969–1985.

- Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E. **2006**. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* **19**, 491-511.
- Jeon H.J., Yi S.C., Oh S.G. **2003** . Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel method. *Biomaterials.* **24**, 4921–4928.
- Kawabata N., Nishiguchi A. **1988**. Antibacterial activity of soluble pyridinium-type polymers. *Microbiol. M. Appl. Environ.* **54**, 2532–2535.
- Kenawy E.R., Mahmoud Y.A.G. **2003**. Biologically active polymers. *Macromol Biosci.* **3**,107.
- Kenawy E.R., Abdel-Hay F.I., El-Magd A.A., Mahmoud Y. **2006**. Biologically active polymers: VII. Synthesis and antimicrobial activity of some crosslinked copolymers with quaternary ammonium and phosphonium groups. *React Funct Polym.* **66**, 419-29.
- Kenawy E.R., Worley S.D., Broughton R. **2007**. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules* **8**, 1359–1384.
- Kenawy E.R., Al Deyab S.S., Omar Shaker N., El Sadek B.M., Khattab A.H.B. **2009**. Synthesis and antimicrobial activity of metronidazole containing polymer and copolymers. *J Appl Polym Sci.***113**, 818-26.
- Kenawy E.R., Kandil S. **2014**. Synthesis, antimicrobial activity and applications of polymers with ammonium and phosphonium groups In Polymeric Materials with Antimicrobial Activity: From Synthesis to Applications. *The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK*; Chapter 3; pp. 54–74.
- Kersten H., Kersten W. **2013**. Inhibitors of nucleic acid synthesis: biophysical and biochemical aspects (Vol. 18). Springer Science & Business Media.
- Kreyenschmidt J. and Ibaldo R. **2012**. Modeling shelf life using microbial indicators. In *Shelf Life Assessment of Food ed. Nicolli, M.C.* pp.127–163. New York, NY: Taylor and Francis.
- Kugel A., Stafslie S., Chisholm B.J. **2011**. Antimicrobial coatings produced by “tethering” biocides to the coating matrix: A comprehensive review. *Prog Org Coat.* **72**, 222-52.
- Kugler R., Bouloussa O., Rondelez F. **2005**. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology*;**151**, 1341-8.
- Kumar N., Ravinkumar M. N. V., Domb A. J. **2001**. Biodegradable block copolymers *Advanced Drug Delivery Reviews*, **53**, pp 23-44.
- Kumar A. and H. P. Schweizer **2005**. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 1486-1513.
- Kuroda K., DeGrado W.F. **2005**. Amphiphilic Polymethacrylate Derivatives as Antimicrobial Agents. *J Am Chem Soc.***127**, 4128-9.

Kuroda K., Caputo G.A., DeGrado W.F. **2009**. The role of hydrophobicity in the antimicrobial and hemolytic activities of polymethacrylate derivatives. *Chem Eur J* **15**, 1123–33.

Kurt P., Gamble L.J., Wynne K.J. **2008** Surface characterization of biocidal polyurethane modifiers having poly(3,3-substituted)oxetane soft blocks with alkylammonium side chains. *Langmuir*. **24**, 5816–24.

Li P., Poon YF, Li W, Zhu H-Y, Yeap SH, Cao Y, Qi X, Zhou C, Lamrani M, Beuerman R.W., Kang E.T., Mu Y., Li C.M., Chang M.W., Jan Leong S.S., Chan Park MB. **2011**. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nat Mater*. **10**, 149-56.

Li Y., Liu G., Wang X., Hu J., Liu S. **2016**. Enzyme-responsive polymeric vesicles for bacterial-strain-selective delivery of antimicrobial agents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **55**, 1760–1764.

Li W.R., Xie X.B., Shi Q.S., Zeng H.Y., You-Sheng O. Y., Chen Y. B. **2010**. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*. **85**, 1115-1122.

Lin J., Qiu S., Lewis K., Klivanov A.M. **2002**. Bactericidal properties of flat surfaces and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines. *Biotechnol Progr.* **18**, 1082-6.

Liu Y., Strauss J., Camesano T.A. **2008**. Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins. *Biomaterials*. **29**, 4374-82.

Lee H. J., Choi G. J., Cho K. Y. **1998**. Correlation of Lipid Peroxidation in *Botrytis cinerea* Caused by Dicarboximide Fungicides with Their Fungicidal Activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. **46**, 737-741.

Lee D., Cohen R.E., Rubner M.F. **2005**. Antibacterial properties of Ag nanoparticle loaded multilayers and formation of magnetically directed antibacterial microparticles. *Langmuir* **21**, 9651-9659.

Lee S. B., Koepsel R. R., Morley S. W., Matyjaszewski K., Sun Y., Russell A. J. **2004**. Permanent, nonleaching antibacterial surfaces. 1. Synthesis by atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules*. **5**, 877–882.

Leive L. **1965**. A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **53**, 745-750.

Lenoir S., Pagnouille C., Galleni M., Compere P., Jerome R. and Detrembleur C. **2006**. Polyolefin matrixes with permanent antibacterial activity: preparation, antibacterial activity, and action mode of the active species. *Biomacromolecules* **7**, 2291–2296.

Lode H.M. **2009**. Clinical Impact of Antibiotic-Resistant Gram-Positive Pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 212-217.

Lolis E. and Bucala R. **2003**. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nat Rev Drug Discov.* **2**, 635-645.

Mangoni M. L., Niv P.A.P.O., Barra D., Simmaco M., Bozzi A., Di Giulio A., Rinaldi A. C. **2004**. Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal.* **380**, 859-865.

Marcotte L., Barbeau J., Lafleur M. **2005**. Permeability and thermodynamics study of quaternary ammonium surfactants—phosphocholine vesicle system. *J Colloid Interf Sci.* **292**, 219-27.

Maroti G., Kereszt A., Kondorosi E., Mergaert P. **2011**. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res. Microbiol.* **162**, 363-374.

Marra J., Paleari A.G., Rodriguez L.S., Leite A.R.P., Pero A.C., Compagnoni M.A. **2012**. Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. *J. Appl. Oral Sci.* **20**, 643–648.

Matrella S., Vitiello C., Mella M., Vigliotta G., Izzo L. **2015**. The Role of Charge Density and Hydrophobicity on the Biocidal Properties of Self-Protonable Polymeric Materials. *Macromolecular Bioscience.* **15**, 927-940

Matsuzaki K. **2009**. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* **1788**, 1687-1692.

McDonnell G., Russell A.D. **1999**. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 147–179.

Melo M.N., Ferre R., Castanho MARB . **2009**. OPINION Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 245-250.

Meneghetti S. P., Lutz P. J., and D. Rein, **1999** . Star shaped Polymers via Anionic Polymerization Methods in *Star and Hyperbranched Polymers*, M. K. Mishra, and S. Kobayashi, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Basel, Hong Kong, pp 27–57.

Meng F.H., Engbers G.H.M., Feijen J., **2004**. Polyethylene glycol-grafted polystyrene particles. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **70A**, 49–58.

Mensa B., Kim Y., Choi S., Scott R., Caputo G., DeGrado W. **2011** Antibacterial mechanism of action of arylamide foldamers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5043-5053

Meuwly M., Karplus N. **2002**. Simulation of proton transfer along ammonia wires: An *ab initio* and semiempirical density functional comparison of potentials and classical molecular dynamics. *M. J. Chem. Phys.* **116**, 2572–2585.

- Panarin E.F., Solovskii M.V., Ekzemplyarov O.N. **1972**. Synthesis and antimicrobial properties of polymers containing quaternary ammonium groups. *Pharm. Chem. J.* **5**, 406–408.
- Pasquier N., Keul H., Heine E., Moeller M., Angelov B., Linser S., Willumeit R. **2008**. Amphiphilic branched polymers as antimicrobial agents. *Macromol Biosci.* **8**, 903–15.
- Pereira M.O., Machado I., Simões M. and Vieira M.J. **2007**. Preventing biofilm formation using surfactants. *BiofilmClub.* 167-174.
- Ponti, A.; Mella, M. **2003**. Three-Fragment Counterpoise Correction of Potential Energy Curves for Proton-Transfer Reactions. *J. Phys. Chem. A.* **107**, 7589–7596.
- Qiu L. Y and Bae Y.H. **2006**. Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.* **23**, 1–30.
- Rodriguez G. G., Phipps D., Ishiguro K. and Ridgway H. F. **1992**. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1801–1808.
- Rojas E., Theriot J. A., Huang K. C. **2014**. Response of *Escherichia coli* growth rate to osmotic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **111**, 7807–7812.
- Salwiczek M., Qu Y., Gardiner J., Strugnell R. A., Lithgow T., McLean K. M., Thissen H. **2014**. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends in Biotechnology.* **32**, 82-90.
- Sambhy V., Peterson B.R., Sen A. **2008**. Multifunctional silane polymers for persistent surface derivatization and their antimicrobial properties. *Langmuir.* **24**, 7549-58.
- Sanches L.M., Petri D.F.S., Melo Carrasco L.D., Carmona-Ribeiro A.M. **2015**. The antimicrobial activity of free and immobilized poly (diallyldimethylammonium) chloride in nanoparticles of poly (methylmethacrylate). *J. Nanobiotechnol.* **13**, 1–13.
- Santos M.R.E., Fonseca A.C., Mendonça P.V., Branco R., Serra A.C., Morais P.V., Coelho J.F.J. **2016**. Recent Developments in Antimicrobial Polymers: A Review. *Materials* **9**, 599.
- Sauvet G., Dupond S., Kazmierski K., Chojnowski J. Biocidal polymers active by contact. **2000**. V. Synthesis of polysiloxanes with biocidal activity. *J Appl Polym Sci.* **75**, 1005-12.
- Sayed S., Jardine M.A. **2015**. Antimicrobial biopolymers. In *Advanced Functional Materials.* John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA; pp. 493–533.
- Sekiguchi M. and Lida S. **1967**. Mutants of *Escherichia coli* permeable to actinomycin. *Biochemistry.* **58**, 2315-2320

- Seyfriedsberger G., Rametsteiner K. and Kern, W. **2006**. Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. *Eur Polym J.* **42**, 3383–3389.
- Shai Y. **1999**. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell nonselective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**, 55–70.
- Siedenbiedel F. , Tiller J.C. **2012**. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: Overview and functional principles. *Polymers* **4**, 46–71.
- Simoncic B. and Tomsic B. **2010**, Structures of novel antimicrobial agents for textiles – a review, *Text. Res. J.* **80**, 1721–1737.
- Som A., Vemparala S., Ivanov I., Tew, G. N. **2008**. Synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Peptide Science.* **90**, 83-93.
- Song J., Kong H., Jang J. **2009**. Enhanced antibacterial performance of cationic polymer modified silica nanoparticles. *Chem Commun.* **36**, 5418–20.
- Sovadinova I., Palermo E.F., Huang R., Thoma L.M., Kuroda K. **2010**. Mechanism of polymer-induced hemolysis: Nanosized pore formation and osmotic lysis. *Biomacromolecules.* **12**, 260-8.
- Tashiro T. **2001**. Antibacterial and bacterium adsorbing macromolecules. *Macromol Mater Eng.* **286**, 63-87.
- Terada A., Yuasa A., Kushimoto T., Tsuneda S., Katakai A., Tamada M. **2006**. Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces. *Microbiology.* **152**, 3575–3583.
- Thölmann D., Kossmann B. and Sosna F. **2003**. Polymers with antimicrobial properties. *ECJ.* **1**, 16–33.
- Thomassin J.M., Lenior S., Riga J., Jérôme R. and Detrembleur C. **2007**. Grafting of poly[2-(tertbutylamino) ethyl methacrylate] onto polypropylene by reactive blending and antibacterial activity of the copolymer. *Biomacromolecules.* **8**, 1171–1177.
- Tiller J.C., Liao C.J., Lewis K., Klivanov A.M. **2001**. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 5981-5.
- Tiller J.C. **2010**. Antimicrobial surfaces. *Adv Polym Sci.* **240**, 193-217.
- Timofeeva L.M., Kleshcheva N.A., Moroz A.F., Didenko L.V. **2009**. Secondary and tertiary polydiallylammonium salts: novel polymers with high antimicrobial activity. *Biomacromolecules.* **10**, 2976–86.
- Timofeeva L., Kleshcheva N. **2011**. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **89**, 475–92.

- Vaara M. **1992**. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. *Microbiological Reviews*, **56**, 395-411.
- Venkataraman S., Zhang Y., Liu L., Yang Y.Y. **2010**. Design, syntheses and evaluation of hemocompatible pegylated-antimicrobial polymers with well-controlled molecular structures. *Biomaterials*. **31**, 1751-6.
- Ventola C.L. **2015**. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics* **40**, 277–283.
- Vicsek T., Cserző M., Horváth V. K. **1990**. Self-affine growth of bacterial colonies. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. **167**, 315-321.
- Vigliotta G., Mella M., Rega D., Izzo L. **2012**. Modulating Antimicrobial Activity by Synthesis: Dendritic Copolymers Based on Nonquaternized 2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylate by Cu-Mediated ATRP. *Biomacromolecules*. **13**, 833-841
- Wang J., Lewis K., Klibanov A.M. **2005**. Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed, *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 715–722.
- Waschinski C.J. and Tiller J.C. **2005**. Poly(oxazoline)s with Telechelic Antimicrobial Functions. *Biomacromolecules*. **6**, 235-43.
- Waschinski C.J., Zimmermann J., Salz U., Hutzler R., Sadowski G., Tiller J.C. **2008**. Design of contact active antimicrobial acrylate-based materials using biocidal macromers. *Adv Mater.* **20**, 104-8.
- Wessman P., Stromstedt A.A, Malmsten M., Edwards K. **2008**. Melittin-lipid bilayer interactions and the role of cholesterol. *Biophys J.* **95**, 4324-4336.
- Westman E.H., Ek M., Enarsson L.E., Wagberg L. **2009**. Assessment of antibacterial properties of polyvinylamine (PVAm) with different charge densities and hydrophobic modifications. *Biomacromolecules*. **10**, 1478–83.
- Wiley J. M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. **2008**. Microbiology 7th edition. New York: McGraw-Hill. Whitehead K.A., Verran J., **2006**. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food Bioprod. Process.* **84**, 253–259.
- Wong S.Y., Li Q., Veselinovic J., Kim B.S., Klibanov A.M, Hammond PT. **2010**. Bactericidal and virucidal ultrathin films assembled layer by layer from polycationic N-alkylated polyethylenimines and polyanions. *Biomaterials*. **31**, 4079-87.
- Worley B.V., Slomberg D.L., Schoenfisch M.H. **2014**. Nitric Oxide-Releasing Quaternary Ammonium-Modified Poly(amidoamine) Dendrimers as Dual Action Antibacterial Agents. *Bioconjugate Chem.* **25**, 918–927.
- Worsfold D. J., Zilliox, J.-G., Rempp P. **1969**. Préparation et caractérisation de polymères-modèle à structure en étoile, par copolymérisation séquencée anionique. *Can. J. Chem.* **47**, 337.

Wright N.E., Gilbert P. **1987**. Influence of specific growth rate and nutrient limitation upon the sensitivity of *Escherichia coli* towards chlorhexidine diacetate. *J App Bacteriol.* **62**, 309-14.

Wu M. H. and Hancock R.E.W. **1999**. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *Journal of Biological Chemistry.* **274**, 29-35.

Xue Y., Xiao H. **2015**. Characterization and antipathogenic evaluation of a novel quaternary phosphonium tri-polyacrylamide and elucidation of the inactivation mechanisms. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **104**, 747-757.

Yeaman M. R. and N. Y. Yount **2003**. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* **55**, 27-55.

Yu K., Mei Y., Hadjesfandiari N., Kizhakkedathu J.N. **2014**. Engineering biomaterials surfaces to modulate the host response. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **124**, 69–79.

Zhang C., Cui F., Zeng G.M., Jiang M., Yang Z.Z., Yu Z.G., Zhu M.Y., Shen LQ. **2015**. Quaternary ammonium compounds (QAC): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Sci Total Environ.* **518**, 352–362.

Zuo H., Wu D. and Fu, R. **2012**. Preparation of antibacterial poly(methyl methacrylate) by solution blending with water-insoluble antibacterial agent poly [(tert-butylamino) ethyl methacrylate]. *J Appl Polym Sci.* **125**, 3537–3544.

Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M., Van't Riet, K. **1990**. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology* **56**, 1875-1881.