

Abstract

Questo progetto di dottorato ha come obiettivo lo sviluppo di nuovi materiali antimicrobici e in particolar modo si concentra su due categorie, sulla progettazione e realizzazione di polimeri con attività antimicrobica intrinseca e di polimeri resi attivi dall'aggiunta di composti organici antimicrobici.

Nella prima parte del lavoro mi sono dedicata alla sintesi e all'inclusione di un amminoacido modificato in una sequenza di un peptide antimicrobico (AMP), con l'obiettivo di mimarne il meccanismo d'azione su membrane batteriche, ma di ridurne l'inattivazione *in vivo*.

La comprensione del meccanismo d'azione di un peptide antimicrobico è la base per la progettazione di nuovi farmaci. Per tale motivo, ho dedicato parte del lavoro alla raccolta, da dati pubblicati, di un elevato numero di sequenze peptidiche attive, dei corrispondenti valori di attività antimicrobica, di proprietà strutturali e di dati tassonomici. Ho calcolate le più rilevanti proprietà chimico fisiche come carica, momento idrofobico, propensione a formare una α -elica, flessibilità, punto isoelettrico, indice di Boman, instabilità e capacità di penetrare una membrana. I dati raccolti ci hanno permesso di creare una banca dati, YADAMP, contenente il maggior numero di sequenze attive con comprovata attività antimicrobica, accessibile al sito www.yadamp.unisa.it.

Ho utilizzato il database YADAMP per selezionare una defensina da utilizzare come template per lo sviluppo di un nuovo peptide fotosensibile. Il peptide individuato, indicato come ALY, è un peptide ad α -elica contenente l'amminoacido tirosina e il cui meccanismo di azione prevede l'interazione con la membrana. L'analogo modificato (azo-ALY) presenta la sostituzione dell'amminoacido tirosina con una tirosina modificata per aggiunta, in catena laterale, di un gruppo azobenzene. L'amminoacido modificato, definito Fmoc-azoTyr, è stato sintetizzato secondo il classico schema di una reazione di diazocopulazione. Entrambi i peptidi (ALY e azo-ALY) sono stati sintetizzati seguendo la procedura di sintesi in fase solida.

Ho scelto il gruppo azobenzene perché possiede attività antimicrobica, come descriverò in seguito, e perché grazie all'isomerizzazione reversibile cis-trans che

subisce può fornire all'operatore la possibilità di disattivare/attivare il polimero irradiandolo con luce di opportuna lunghezza d'onda. Alla luce di quanto appena scritto, il peptide modificato potrebbe avere uno spettro di azione più ampio dovuto alla presenza del gruppo azobenzene, e inoltre, potrebbe agire come prodrug, generando *in vivo* la porzione azobenzenica anch'essa in possesso di attività antimicrobica. Presso il laboratorio del Prof. Peter Walde al Swiss Federal Institute of Technology (ETH Zurigo), mi sono occupata di effettuare studi di permeabilità di membrana per valutare eventuali differenze da attribuire all'introduzione dell'amminoacido modificato nella sequenza del peptide ALY.

Saggi di rilascio di calceina da una sospensione di giant unilamellar vesicles (GUV) hanno mostrato che l'amminoacido modificato inserito in una sequenza peptidica attiva, incrementa la permeabilità di membrana rispetto al peptide non modificato e nelle stesse condizioni.

Ho inoltre preparato per estrusione delle large unilamellar vesicles (LUVET) formate da POPC/POPG (90:10 mol/mol), contenenti l'enzima HRPC. In tale saggio la permeabilità di membrana è stata associata all'incremento dell'attività enzimatica monitorata con misure spettrofotometriche. I risultati preliminari di rilascio di enzima dopo interazione con i peptidi ALY e azo-ALY hanno messo in evidenza che c'è stata una maggiore perturbazione della membrana di LUVET, tempo dipendente, dopo interazione con il peptide modificato.

La seconda parte del lavoro di ricerca è stata dedicata alla progettazione e sintesi di molecole a basso peso molecolare con attività antimicrobica e antifungina.

Ho usato il resveratrolo come template per progettare una nuova classe di composti attivi con struttura azobenzene. Ho selezionato i candidati migliori effettuando uno studio *in silico* di predizione delle proprietà ADMET e poi ho sintetizzato gli azocomposti con la minore tossicità *in silico* (A1, A2, A3, A4, A5, B10 e B11) seguendo il classico schema di una reazione di diazocopolazione. Le molecole purificate sono state poi testate microbiologicamente ed è stato valutata la loro stabilità termica. La maggior parte dei composti sintetizzati ha mostrato attività antimicrobica verso *S. aureus* e antifungina verso *C. albicans*, ma sono risultati inattivi verso i batteri Gram-negativi come *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium*. La differente attività mostrata dai composti sintetizzati suggerisce che tali molecole

possono esplicitare la loro azione in seguito ad interazioni con proteine e recettori, mentre le interazioni con la membrana potrebbero avere minore importanza.

Per validare questa ipotesi ho effettuato delle modifiche strutturali degli azocomposti per aumentare la loro attività microbiologica. Ho usato il miglior azo composto, A4 (4'-hydroxy-(4-hydroxy-3,5-dimethyl)-azobenzene), come lead compound per sintetizzare una serie di analoghi ottenuti effettuando delle modifiche strutturali sul primo e sul secondo anello della struttura azobenzenica. Tali modifiche hanno interessato lo spostamento del gruppo idrossilico fenolico dalla posizione *para*- alla posizione *meta*-, l'eliminazione del gruppo idrossilico fenolico e la sostituzione di tale gruppo con un gruppo metossilico o metilico.

I risultati di attività antimicrobica hanno poi rivelato che gli analoghi strutturali mostrano una attività maggiore rispetto alla molecola A4 utilizzata come lead compound.

Le attività antimicrobiche e la stabilità termica rende gli azo composti sintetizzati in questo lavoro dei candidati per applicazioni terapeutiche. Una delle possibili applicazioni che ho preso in considerazione è stata l'inserimento degli azocomposti in matrici polimeriche per produrre dei materiali con buona lavorabilità, bassi costi di produzione e una potenziale attività antimicrobica da conferire all'agente antimicrobico disperso in matrice.

Utilizzando la tecnica del solvent casting e del mold casting, ho realizzato dei film sottili formati da poliolefine (come PP e LLDPE) e polimeri biodegradabili (come PLA, PVA e Mater-B), contenenti diverse percentuali di agente antimicrobico disperso in matrice polimerica.

I film ottenuti mantengono le proprietà delle matrici polimeriche pure come le proprietà termiche, la flessibilità e la trasparenza. Inoltre, i film si presentano amorfi e pertanto trasparenti, come confermato da analisi ai raggi-X.

I materiali preparati esibiscono attività antimicrobica e capacità di inibire la formazione di biofilm di *S. aureus* e *C. albicans*. Concentrazioni dello 0.01% (w/w) di azo composto permettono di preparare film attivi, incolore e trasparenti. Attualmente sono in corso studi spettroscopici per valutare il rilascio degli azo composti dalle matrici polimeriche.

Questa è la prima volta che agenti antimicrobici con struttura azobenzenica sono inseriti in film polimerici. I test preliminari confermano che i nuovi materiali realizzati in questa tesi sono promettenti per future applicazioni in campi dove è richiesta una attività antimicrobica intrinseca, come ad esempio per la produzione di dispositivi biomedicali, superfici antimicrobiche e nel food packaging.

