

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*

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 $PEG(MMA-AAEMA)_n$.

Sommario

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 films 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 films 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 $PEG(MMA-AAEMA)_n$.