



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Chimica

Direttore: Ch.mo Prof. Mauro Freccero

Corso di Laurea Magistrale in Chimica

NANOCUBI DI BLU DI PRUSSIA, POLIDOPAMINA E VERDE
INDOCIANINA: UN APPROCCIO MULTISTRATO PER SUPERFICI
CON ATTIVITA' FOTOTERMICA E FOTODINAMICA

Relatore:

Prof. Angelo Maria Taglietti

Correlatore:

Laura Ghidoni

Tesi di Laurea Magistrale di
Lorenzo Zuccotti

Anno accademico 2025/2026

Sommario

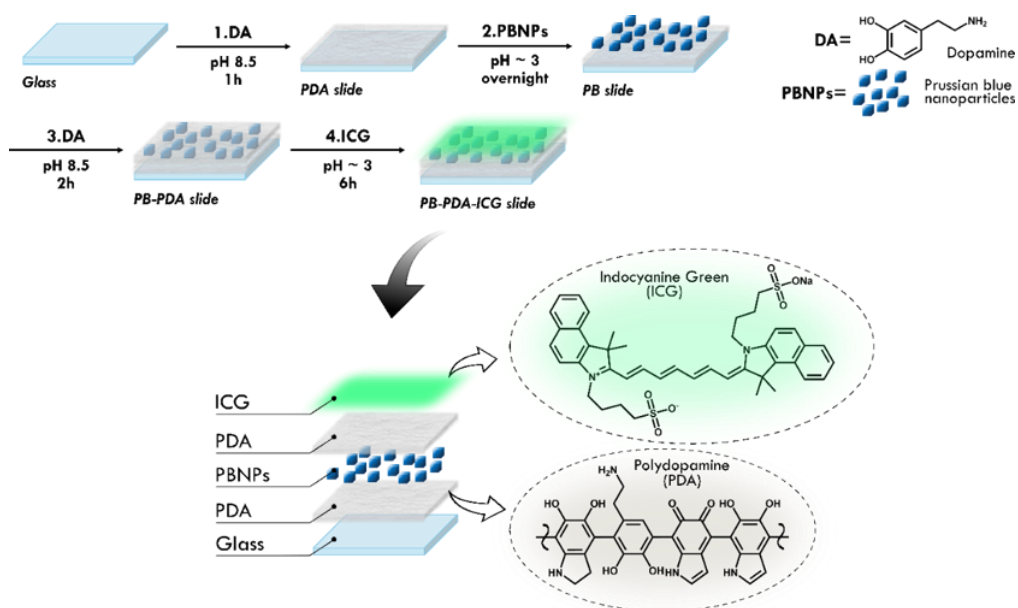
ABSTRACT	4
1. Introduzione	7
1.1 Metodi antimicrobici farmaco-indipendenti	8
1.2. Effetto Fototermico	9
1.3. Blu di Prussia	14
1.3.1. Preparazione del Blu di Prussia	16
1.3.2. Utilizzo in ambito biomedico	18
1.4. Dopamina e Polidopamina.....	20
1.4.1. Polidopamina come rivestimento per la funzionalizzazione superficiale	22
1.5. Verde indocianina: struttura e proprietà fotofisiche	25
1.5.1. Fotoattivazione dell'ICG e produzione di specie reattive dell'ossigeno.....	28
1.6. Progetto di tesi	30
2. Materiali e metodi	31
2.1. Reagenti e Materiali	31
2.2. Caratterizzazione e strumentazioni.....	32
2.3. Procedure	34
2.3.1. Sintesi di nanoparticelle di Blu di Prussia (PBNPs):	34
2.3.2. Preparazione di vetrini ricoperti di polidopamina (glass@PDA) ..	34
2.3.3. Caricamento di PBNPs sulla PDA (glass@PDA@PBNPs):	35
2.3.4 Copertura PBNPs con PDA (glass@PDA@PBNPs@PDA).....	35
2.3.5. Funzionalizzazione con Verde Indocianina (ICG) di glass@PDA@PBNPs@PDA:	35
2.3.6. Preparazione dei vetrini glass@PDA@ICG	35
2.3.7. Studio e confronti di stabilità in H ₂ O e soluzione salina tampone fosfato (PBS)	36
3. Risultati e discussione.....	36
3.1 Sintesi e caratterizzazione PBNPs	36
3.2 Preparazione multistrato	38
3.2.1 Preparazione e caratterizzazione glass@PDA.....	39

3.2.2 Preparazione e caratterizzazione glass@PDA@PBNPs.....	40
3.2.3 Preparazione e caratterizzazione glass@PDA@PBNPs@PDA.....	41
3.2.4 Glass@PDA@ICG	42
3.2.5. Preparazione e caratterizzazione glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG.....	49
3.3. Studio fototermico	53
4. Conclusioni.....	56
5. Bibliografia.....	58

ABSTRACT

The increasing concern associated with antimicrobial resistance has promoted the development of alternative, drug-independent strategies for the control of microbial contamination. Among these, photoactive materials represent a promising approach, as light irradiation can be used to activate photothermal and photodynamic processes in a spatially and temporally controlled manner.

In this work, a multilayer photoactive coating was developed on glass substrates with the aim of combining photothermal and photodynamic functionalities within the same surface architecture. The system was prepared through the sequential deposition of polydopamine (PDA), Prussian Blue nanoparticles (PBNPs), a second PDA layer and indocyanine green (ICG).



nanoparticles with a predominantly cubic morphology and an average size of approximately 54 ± 16 nm. The nanoparticles were subsequently immobilized onto PDA-coated glass substrates, and a second PDA layer was deposited to provide an additional functional interface for the subsequent immobilization of ICG.

The interaction between ICG and PDA was investigated by varying the pH, dye concentration and functionalization time. The optimized conditions allowed the reproducible immobilization of ICG on the surface, with a surface density on the order of 10^{14} molecules per unit area. UV-Vis spectroscopy was used throughout the different preparation steps to monitor the progressive construction of the multilayer architecture and the optical contribution of each photoactive component.

The stability of the different coating configurations was also investigated in aqueous media. In phosphate-buffered saline at pH 7.4, the complete glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG system retained approximately 80% of its initial optical response after 24 h, while the presence of the second PDA layer improved the stability of the PBNP-containing coating.

Photothermal characterization under 808 nm NIR irradiation showed a rapid increase in surface temperature, with the complete multilayer system reaching a maximum temperature increase of approximately 31 °C. Repeated irradiation and cooling cycles produced comparable thermal responses, indicating good photothermal stability and reproducibility of the coating.

Overall, these results demonstrate the successful preparation of a stable NIR-responsive multilayer surface with a marked photothermal response. The incorporation of ICG was designed to provide an additional photodynamic contribution through photoinduced generation of reactive oxygen species, which could be triggered using the same excitation

wavelength (808 nm) used for photothermal action, whose evaluation is currently under investigation.

1. Introduzione

Negli ultimi anni, la ricerca nel campo dei materiali antimicrobici ha assunto crescente importanza, spinta dalla necessità di sviluppare strategie efficaci per il controllo delle infezioni e di contrastare la diffusione di microrganismi patogeni. In questo contesto, particolare attenzione è stata rivolta allo sviluppo di superfici dotate di proprietà antimicrobiche, poiché superfici e dispositivi contaminati possono contribuire alla diffusione dei microrganismi mediante contatto [1]. Dispositivi medici, materiali impiegati in ambito sanitario e altre superfici frequentemente manipolate rappresentano infatti alcuni dei contesti nei quali il controllo della contaminazione microbica assume particolare rilevanza.

Un ulteriore fattore che rende particolarmente complesso il trattamento delle infezioni è rappresentato dalla capacità di numerosi microrganismi di organizzarsi in biofilm, comunità cellulari aderenti a una superficie e inglobate all'interno di una matrice extracellulare polimerica autoprodotta [2]. All'interno di tali strutture, i microrganismi possono coordinare comportamenti collettivi attraverso sistemi di comunicazione cellulare, tra cui il *quorum sensing* [3]. La crescita in forma di biofilm determina inoltre una maggiore tolleranza nei confronti degli agenti antimicrobici rispetto alla condizione planctonica, rendendo più difficile l'eradicazione delle comunità microbiche mediante antibiotici e biocidi convenzionali [2,4].

A questo scenario si aggiunge il crescente fenomeno della resistenza antimicrobica (AMR, *Antimicrobial Resistance*), riconosciuto come una delle principali minacce per la salute pubblica a livello mondiale. Con il termine AMR si indica la capacità di un microrganismo di resistere all'azione di un agente antimicrobico che dovrebbe inibirne la crescita o determinarne l'eliminazione [5]. La comparsa e la diffusione delle resistenze possono essere associate sia a mutazioni genetiche sia all'acquisizione di determinanti di resistenza mediante trasferimento

genico orizzontale. L'impiego eccessivo o inappropriato degli antimicrobici esercita inoltre una pressione selettiva che favorisce l'emergere e la proliferazione di ceppi resistenti [5,6]. La progressiva perdita di efficacia dei trattamenti disponibili comporta rilevanti conseguenze cliniche e socioeconomiche e rende necessario lo sviluppo di strategie coordinate su scala globale [6,7].

Per tali ragioni, la ricerca scientifica si sta orientando verso approcci alternativi o complementari alle tradizionali terapie antibiotiche. Tra le strategie più promettenti rientrano la progettazione di superfici dotate di proprietà antimicrobiche intrinseche e l'impiego di nanomateriali funzionali, capaci di agire mediante meccanismi differenti rispetto a quelli dei farmaci convenzionali [1,4]. In questo ambito, la chimica dei materiali e la nanochimica offrono la possibilità di sviluppare sistemi in grado di limitare la colonizzazione microbica e di esercitare un'azione antimicrobica controllabile mediante stimoli esterni, come la radiazione luminosa. Tra questi, particolare interesse è rivolto ai materiali fotoattivi capaci di convertire la luce in calore o di promuovere la formazione di specie reattive dell'ossigeno, alla base rispettivamente di approcci fototermici e fotodinamici.

1.1 Metodi antimicrobici farmaco-indipendenti

Le strategie convenzionali per il controllo della contaminazione microbica si basano principalmente sull'impiego di agenti antimicrobici e su procedure fisiche di sterilizzazione. Gli agenti antimicrobici trovano largo impiego in numerosi ambiti, tra cui il settore sanitario, il trattamento delle acque e la conservazione degli alimenti. Tuttavia, gli antimicrobici a basso peso molecolare possono presentare alcuni limiti, quali una possibile tossicità residua e una durata limitata dell'attività antimicrobica. Per superare tali problematiche, è stato proposto l'impiego di materiali nei quali la funzione antimicrobica sia direttamente incorporata o stabilmente

associata alla struttura del materiale [8]. Kenawy et al., ad esempio, descrivono proprio l'introduzione di gruppi funzionali antimicrobici all'interno di strutture polimeriche come strategia per prolungarne l'attività e ridurre alcuni degli inconvenienti associati agli agenti antimicrobici convenzionali.

In questo contesto, particolare interesse è stato rivolto allo sviluppo di materiali antimicrobici funzionali, capaci di contrastare la colonizzazione microbica attraverso meccanismi che non dipendono dall'impiego di antibiotici convenzionali. Tra questi rientrano i polimeri antimicrobici, ottenuti mediante l'introduzione di gruppi bioattivi nella struttura macromolecolare, e i sistemi basati su nanomateriali inorganici fotoattivi [1][8]. In particolare, negli ultimi anni sono stati studiati approcci fisici basati sull'effetto fototermico, nei quali l'energia della radiazione assorbita viene convertita in calore, inducendo un aumento locale della temperatura in grado di compromettere la vitalità dei microrganismi. Tali strategie risultano di particolare interesse anche nei confronti di batteri antibiotico-resistenti e biofilm [4].

L'integrazione di nanomateriali fotoattivi su superfici solide consente inoltre di ottenere rivestimenti la cui attività antimicrobica può essere attivata mediante uno stimolo luminoso esterno. Questo approccio permette di combinare le proprietà del substrato con la risposta fototermica del materiale funzionale e rappresenta una strategia promettente per la realizzazione di superfici antimicrobiche attivabili e potenzialmente riutilizzabili [1].

1.2. Effetto Fototermico

L'effetto fototermico consiste nella conversione dell'energia della radiazione elettromagnetica assorbita da un materiale in energia termica. In seguito all'assorbimento della luce, il sistema viene promosso a uno stato energetico eccitato e può successivamente ritornare allo stato

fondamentale attraverso differenti vie di rilassamento. Quando prevalgono i processi non radiativi rispetto a quelli emissivi, l'energia assorbita viene dissipata sotto forma di calore, determinando un aumento della temperatura del materiale e dell'ambiente circostante [9][10].

L'interazione di una nanoparticella con la radiazione incidente può essere descritta mediante le sezioni d'urto di assorbimento e di *scattering*. La sezione d'urto di estinzione, (σ_{ext}), rappresenta complessivamente la capacità della particella di attenuare la radiazione incidente ed è data dalla somma dei contributi di assorbimento e *scattering*:

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca}$$

dove σ_{abs} e σ_{sca} rappresentano rispettivamente la sezione d'urto di assorbimento e quella di *scattering*. Ai fini della conversione fototermica è principalmente la componente assorbita a risultare rilevante, poiché la radiazione diffusa per *scattering* non viene direttamente convertita in calore. La potenza ottica assorbita da una singola nanoparticella può essere espressa come:

$$P_{abs} = I \cdot \sigma_{abs}$$

dove I rappresenta l'irradianza della radiazione incidente. Non tutta l'energia assorbita viene necessariamente trasformata in calore: introducendo quindi l'efficienza di conversione fototermica η , la potenza termica generata può essere descritta, in forma semplificata, come:

$$P_{heat} = I \cdot \eta \cdot \sigma_{abs}$$

La capacità di un materiale di produrre calore dipende pertanto sia dalla quantità di radiazione assorbita sia dall'efficienza con cui tale energia viene successivamente dissipata attraverso processi non radiativi [10,11]. La distinzione tra capacità di assorbimento ed efficienza di conversione

luce-calore è importante: un elevato assorbimento non implica necessariamente che tutta l'energia assorbita venga convertita in calore.

Il meccanismo responsabile della conversione fototermica varia in funzione della natura del materiale. Nel caso delle nanoparticelle di metalli nobili, come oro e argento, l'interazione con la radiazione può determinare l'eccitazione della risonanza plasmonica di superficie localizzata (*Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR), associata all'oscillazione collettiva degli elettroni di conduzione. L'energia associata allo stato eccitato viene successivamente dissipata attraverso processi di rilassamento elettronico e di interazione con il reticolo cristallino, determinando il riscaldamento della nanoparticella e il successivo trasferimento di calore al mezzo circostante [9,10].

Nei materiali non plasmonici, la conversione della radiazione in calore può invece derivare da altri tipi di transizioni elettroniche. Nel caso del Blu di Prussia (PB), l'intenso assorbimento ottico è associato a una transizione di trasferimento di carica tra i centri Fe(II) e Fe(III) presenti nel reticolo. Tale transizione origina una banda di assorbimento centrata approssimativamente intorno a 700 nm e caratterizzata da un'importante estensione nella regione del vicino infrarosso. Il rilassamento dello stato eccitato avviene prevalentemente attraverso processi non radiativi, con conseguente dissipazione dell'energia sotto forma di calore [13]. Questa proprietà è alla base dell'impiego delle nanoparticelle di Blu di Prussia come agenti fototermici.

Una volta generato, il calore viene trasferito dal materiale fotoattivo all'ambiente circostante. In un modello semplificato, considerando una singola nanoparticella come una sorgente puntiforme immersa in un mezzo omogeneo e assumendo condizioni stazionarie, l'incremento di temperatura a una distanza $\backslash(r\backslash)$ può essere descritto dall'espressione:

$$\Delta T(r) = \frac{P_{heat}}{4\pi kr}$$

dove P_{heat} rappresenta la potenza termica generata e k la conducibilità termica del mezzo [11,12]. Tale relazione evidenzia come l'incremento locale di temperatura diminuisca rapidamente all'aumentare della distanza dalla sorgente. Il modello è particolarmente utile per comprendere i principi fondamentali della dissipazione termica a livello nanometrico; nel caso di sistemi costituiti da numerose nanoparticelle, tuttavia, la risposta termica macroscopica deriva dal contributo collettivo delle diverse sorgenti di calore.

Nel caso specifico di nanomateriali immobilizzati su una superficie, come quelli utilizzati nel presente lavoro, la risposta fototermica deve quindi essere considerata come una proprietà complessiva del rivestimento piuttosto che come il risultato del riscaldamento di una singola nanoparticella. L'energia assorbita dai componenti fotoattivi viene convertita in calore e successivamente trasferita al substrato e all'ambiente a contatto con la superficie. Di conseguenza, oltre alle proprietà ottiche intrinseche dei materiali, possono assumere importanza anche la quantità di materiale depositato, la distribuzione delle nanoparticelle sulla superficie e le interazioni tra i differenti componenti del rivestimento. L'immobilizzazione di nanomateriali fototermici su substrati solidi rappresenta infatti una strategia di particolare interesse per la preparazione di superfici antimicrobiche attivabili mediante irraggiamento esterno [1].

La possibilità di utilizzare la luce come stimolo esterno ha favorito lo sviluppo di numerose applicazioni dell'effetto fototermico. In ambito biomedico, la terapia fototermica (*Photothermal Therapy*, PTT) sfrutta l'aumento di temperatura generato da materiali fotoattivi per indurre un danno termico a cellule tumorali o microrganismi. Lo stesso principio può essere applicato alla preparazione di superfici antimicrobiche, nelle quali

l'agente fotoattivo rimane immobilizzato sul substrato e l'attività viene indotta solamente in seguito all'irraggiamento [1,4,9]. Le superfici fototermiche risultano particolarmente interessanti poiché permettono di confinare il materiale attivo sul substrato e di ottenere un'azione antimicrobica localizzata e controllabile.

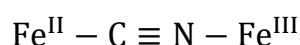
Per applicazioni biomediche vengono frequentemente utilizzate lunghezze d'onda comprese nella regione del vicino infrarosso (NIR), nella quale numerosi materiali fototermici presentano bande di assorbimento significative. In particolare, nella prima finestra biologica (approssimativamente compresa tra 700 e 950 nm), l'assorbimento da parte di numerosi componenti biologici risulta relativamente ridotto rispetto ad altre regioni dello spettro. Ciò rende queste lunghezze d'onda particolarmente adatte alla fotoattivazione di materiali per applicazioni biologiche che prevedano, ad esempio, l'utilizzo all'interno di tessuti [9].

Nel presente lavoro, tali principi sono stati applicati alla realizzazione di una superficie fotoattiva multistrato, ottenuta mediante la successiva funzionalizzazione di un substrato di vetro con polidopamina (PDA), nanoparticelle di Blu di Prussia (PBNPs), un secondo strato di PDA e verde indocianina (ICG). In tale architettura, le PBNPs rappresentano un importante componente fototermico grazie al loro assorbimento nel NIR e alla successiva dissipazione non radiativa dell'energia assorbita [13]. Anche la PDA possiede proprietà di conversione fototermica, mentre l'ICG, oltre a contribuire all'assorbimento nella regione NIR e alla dissipazione termica, è stata introdotta principalmente per conferire al sistema una componente fotodinamica, attraverso la generazione fotoindotta di specie reattive dell'ossigeno. L'associazione dei diversi componenti consente quindi di sviluppare una superficie multistrato nella quale possono coesistere processi fototermici e fotodinamici.

1.3. Blu di Prussia

Il Blu di Prussia (*Prussian Blue*, PB) è un composto di coordinazione a valenza mista, noto storicamente come uno dei primi pigmenti sintetici. La sua preparazione risale all'inizio del XVIII secolo a Berlino ed è tradizionalmente attribuita al colorista Diesbach. Dall'originario impiego come pigmento, il PB è diventato un materiale di notevole interesse scientifico grazie alle sue proprietà strutturali, ottiche, magnetiche ed elettrochimiche [13,14].

Dal punto di vista strutturale, il PB è un polimero di coordinazione tridimensionale costituito da centri di ferro presenti nei due stati di ossidazione Fe(II) e Fe(III), collegati da ligandi cianuro secondo la sequenza:



Gli ioni Fe(II), presenti in configurazione basso spin, sono coordinati attraverso l'atomo di carbonio del cianuro, mentre i centri Fe(III) alto spin sono coordinati attraverso l'estremità azotata. Entrambi i centri metallici presentano una geometria di coordinazione sostanzialmente ottaedrica e si organizzano in un reticolo tridimensionale cubico [13,15].

Tradizionalmente vengono distinte una forma definita “**solubile**”, rappresentabile come $\text{MFe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$, dove M è generalmente un catione alcalino, e una forma “**insolubile**”, convenzionalmente descritta dalla formula $\text{Fe}_4^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Tali denominazioni non devono essere interpretate in senso strettamente molecolare: il PB cosiddetto “solubile” tende infatti a formare cristalli di dimensioni ridotte e dispersioni colloidali stabili, mentre la forma “insolubile” dà origine più facilmente a cristalli di maggiori dimensioni che aggregano e precipitano [13].

Nella forma “insolubile”, la necessità di mantenere l’elettroneutralità del reticolo comporta l’assenza di circa un quarto delle unità $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ idealmente presenti. In corrispondenza di tali vacanze, parte della sfera di coordinazione dei centri $\text{Fe}(\text{III})$ viene completata da molecole d’acqua; ulteriori molecole d’acqua possono inoltre occupare le cavità del reticolo. La composizione effettiva del PB può pertanto dipendere dalle condizioni di preparazione, dal contenuto di acqua e dalla presenza di cationi alcalini all’interno delle cavità [13,15].

L’intensa colorazione del Blu di Prussia è riconducibile a una transizione di trasferimento di carica di intervalenza tra i centri metallici a diverso stato di ossidazione, associata al trasferimento elettronico da $\text{Fe}(\text{II})$ a $\text{Fe}(\text{III})$. Tale transizione dà origine a un’ampia banda di assorbimento centrata approssimativamente intorno a 700 nm e caratterizzata da un’estesa coda nella regione del vicino infrarosso. Il rilassamento dello stato eccitato avviene prevalentemente attraverso processi non radiativi, determinando la dissipazione dell’energia assorbita sotto forma di calore. Questa proprietà costituisce la base del comportamento fototermico delle nanoparticelle di Blu di Prussia [13].

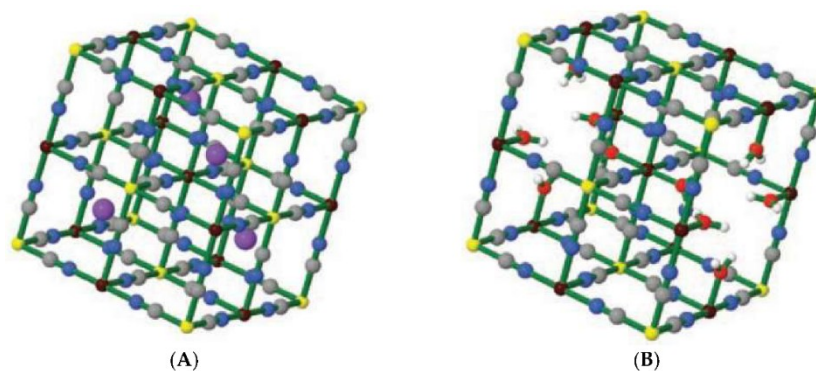
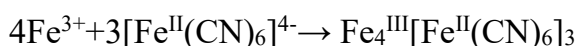


Figura 1 a) Rappresentazione del reticolo del PB 'solubile', $\text{KFe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$, con metà dei centri delle celle cubiche occupati da K^+ . Colori: Fe^{II} giallo, Fe^{III} marrone, C grigio, N blu, K viola; **b)** Rappresentazione del reticolo del PB 'insolubile', $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$, con la sfera di coordinazione di Fe^{III} completata da molecole d'acqua (O rosso, H bianco)

1.3.1. Preparazione del Blu di Prussia

La preparazione del Blu di Prussia si basa generalmente sulla reazione di coordinazione tra ioni Fe(III) e lo ione esacianoferrato(II), $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$.

Una delle procedure più semplici consiste quindi nella miscelazione, in ambiente acquoso, di un sale di Fe(III), quale FeCl_3 , con ferrocianuro di $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$. Nel caso ideale della forma priva di cationi alcalini, la reazione può essere schematizzata come:



Le condizioni stechiometriche e sperimentali possono determinare la presenza di quantità differenti di cationi alcalini e acqua all'interno del reticolo, dando origine alle diverse formulazioni comunemente attribuite al PB “solubile” e “insolubile” [13].

Il PB può essere ottenuto anche facendo reagire Fe(II) con ferricianuro, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$. In questo caso avviene un processo di trasferimento elettronico che conduce comunque alla formazione della struttura a valenza mista Fe(II)/Fe(III); il prodotto storicamente indicato come *Turnbull Blue* è infatti strutturalmente riconducibile al Blu di Prussia [13].

1.3.1.1. Nanoparticelle di Blu di Prussia: sintesi colloidale

Le stesse reazioni di coordinazione utilizzate per ottenere il Blu di Prussia macroscopico possono essere condotte in condizioni tali da controllare nucleazione e crescita del materiale, permettendo così la formazione di Blu di Prussia in forma nanoparticellare (PBNPs).

La sintesi delle PBNPs può essere effettuata in ambiente acquoso e in condizioni relativamente blande. Durante la formazione delle particelle, i processi di nucleazione e crescita devono essere opportunamente controllati, poiché la bassa solubilità del Blu di Prussia può favorire una rapida precipitazione e l'aggregazione del materiale. Parametri quali concentrazione e rapporto tra i precursori, temperatura, pH, modalità di

miscelazione e presenza di agenti stabilizzanti influenzano quindi dimensioni, morfologia e distribuzione dimensionale delle nanoparticelle [13,14].

Una delle strategie più utilizzate prevede l'impiego di acido citrico/citrato durante la sintesi. Il citrato può svolgere una duplice funzione: coordinare gli ioni Fe(III) presenti nei precursori e agire come agente di *capping* sulla superficie delle nanoparticelle formate, limitandone l'aggregazione e favorendone la stabilità colloidale. Shokouhimehr et al. hanno infatti descritto esplicitamente l'acido citrico sia come chelante degli ioni ferrici sia come agente cappante *in situ* delle PBNPs [16]. Questo approccio consente di ottenere particelle facilmente disperdibili e la cui superficie rimane disponibile per successive modificazioni [13,16].

Oltre alla precipitazione diretta in presenza di stabilizzanti, sono state sviluppate diverse strategie per controllare dimensione e morfologia delle PBNPs. Tra queste rientrano sintesi da singolo precursore, microemulsioni inverse e metodi idrotermici. Nelle microemulsioni, il confinamento della reazione all'interno di nanodomini consente di limitare lo spazio disponibile per nucleazione e crescita; nei processi idrotermici, invece, temperatura, tempo di reazione e concentrazione dei precursori possono essere modulati per controllare dimensioni e morfologia del prodotto [13,17].

Nel contesto della funzionalizzazione di superfici, non è però sufficiente controllare soltanto la dimensione delle nanoparticelle: risultano particolarmente importanti anche la chimica e la carica superficiale, poiché queste determinano l'interazione delle PBNPs con il substrato. Questo aspetto è particolarmente rilevante per il presente lavoro, nel quale le nanoparticelle vengono immobilizzate su uno strato di polidopamina. Ghidoni et al. hanno recentemente mostrato che, su vetro funzionalizzato con PDA, la densità superficiale delle PBNPs può essere modulata

attraverso il pH e la complementarità delle cariche superficiali tra PDA e nanoparticelle [18].

1.3.2. Utilizzo in ambito biomedico

L'interesse biomedico nei confronti del Blu di Prussia deriva dalla combinazione delle sue proprietà strutturali, ottiche e chimiche. Nel 2003 la *Food and Drug Administration* statunitense ha approvato *Radiogardase*, una formulazione orale contenente ferrocianuro ferrico, per aumentare l'eliminazione dall'organismo di cesio radioattivo e tallio. Il PB agisce sequestrando tali specie nel tratto gastrointestinale e favorendone l'eliminazione attraverso le feci [20]. È tuttavia importante sottolineare che tale autorizzazione riguarda quella specifica formulazione farmaceutica, somministrata per via orale, e non deve essere estesa a nanoparticelle di PB destinate ad altre vie di somministrazione o ad altre applicazioni [20,21].

La preparazione del PB su scala nanometrica ne ha ampliato le possibilità di impiego in ambito diagnostico e terapeutico. Le PBNPs sono state studiate come agenti di contrasto per risonanza magnetica e imaging fotoacustico, oltre che come substrati per il trasporto di molecole bioattive [14,16]. In particolare, la presenza di centri metallici e le proprietà ottiche del reticolo consentono di combinare tecniche di imaging con altre funzioni terapeutiche, rendendo le PBNPs potenziali piattaforme teranostiche.

Particolare interesse è rivolto alle loro proprietà fototermiche. La banda di trasferimento di carica del PB si estende infatti nella regione NIR e, in seguito all'irraggiamento, l'energia assorbita viene dissipata prevalentemente attraverso processi non radiativi. Le PBNPs sono state quindi studiate come agenti per terapia fototermica e per sistemi nei quali imaging e trattamento possono essere integrati nella stessa piattaforma [13,14].

La superficie delle PBNPs può inoltre essere modificata con polimeri o biomolecole, sia per aumentarne la stabilità sia per introdurre nuove funzionalità. Questa versatilità rende possibile la progettazione di sistemi per il trasporto di farmaci, il riconoscimento molecolare o l'assemblaggio di strutture multicomponente [14,16]. Nel caso del presente lavoro, tale possibilità è particolarmente importante poiché le PBNPs non vengono utilizzate come colloide libero, ma come componente di un rivestimento multistrato su vetro.

Un'applicazione particolarmente vicina a quella sviluppata in questa tesi è rappresentata dalle superfici antimicrobiche fototermiche. Dacarro et al. hanno immobilizzato nanocubi di Blu di Prussia su vetro funzionalizzato, ottenendo un rivestimento in grado di esercitare un'attività antibatterica fotoattivabile mediante irraggiamento NIR [19]. Più recentemente, è stato dimostrato che la PDA può essere utilizzata direttamente come strato di ancoraggio per la deposizione controllata di PBNPs su vetro [18]. Questi risultati supportano l'impiego del Blu di Prussia come componente fotoattivo di rivestimenti superficiali, oltre al suo più tradizionale utilizzo in dispersione colloidale.

Infine, la stabilità delle PBNPs deve essere valutata in relazione all'ambiente nel quale vengono impiegate. Doveri et al. hanno mostrato che PBNPs non protette sono intrinsecamente instabili a pH pari o superiore a 7, con una rapida diminuzione della caratteristica banda di assorbimento intorno a 700 nm dovuta alla formazione di complessi idrossilati dei centri Fe(III). Lo stesso studio ha tuttavia evidenziato che la presenza di rivestimenti polimerici o di una corona proteica può rallentare significativamente tale degradazione [21]. Questo aspetto risulta particolarmente rilevante per sistemi multistrato, nei quali il rivestimento delle PBNPs può influenzarne sia la stabilità sia la risposta fototermica.

1.4. Dopamina e Polidopamina

La dopamina (DA), il cui nome IUPAC è 4-(2-amminoetil)benzene-1,2-diolo, è una catecolammina caratterizzata dalla presenza, nella stessa molecola, di un gruppo catecolico e di un'ammina primaria. Oltre al noto ruolo biologico come neurotrasmettitore, questa particolare combinazione di gruppi funzionali ha reso la dopamina un importante precursore per la preparazione della **polidopamina (PDA)**, un materiale di tipo melaninico ampiamente utilizzato per la modificazione di superfici.

Lo sviluppo dei rivestimenti di PDA trae ispirazione dalle proteine adesive prodotte dai mitili, nelle quali sono presenti elevate quantità di residui contenenti 3,4-diidrossi-L-fenilalanina (DOPA) e lisina. La presenza combinata di gruppi catecolici e amminici è stata associata alla capacità di tali proteine di aderire efficacemente a substrati di diversa natura anche in ambiente acquoso. A partire da questa osservazione, Lee et al. hanno dimostrato che la dopamina può essere utilizzata come semplice precursore per ottenere rivestimenti aderenti su un'ampia varietà di materiali organici e inorganici [22].

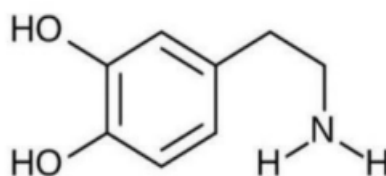


Figura 2: Struttura della dopamina

La PDA viene comunemente preparata attraverso l'ossidazione spontanea della dopamina in ambiente acquoso moderatamente alcalino. Nel protocollo originariamente proposto da Lee et al., i substrati vengono immersi in una soluzione di dopamina tamponata con Tris a pH 8,5; in presenza dell'ossigeno atmosferico si osserva progressivamente la formazione di un rivestimento aderente sulla superficie [22]. Il pH alcalino favorisce l'ossidazione del catecolo e rappresenta quindi uno dei parametri

fondamentali che controllano il processo di formazione del film. La cinetica e le caratteristiche del rivestimento dipendono tuttavia anche dalla natura del tampone, dall'ossidante, dalla concentrazione della dopamina, dalla temperatura e dal tempo di deposizione [23–25].

I primi stadi del processo sono generalmente descritti come l'ossidazione della dopamina a **dopamina-o-chinone**, seguita da ciclizzazione intramolecolare e successive reazioni di ossidazione e riarrangiamento che portano alla formazione di specie di tipo indolico, tra cui il 5,6-diidrossiindolo e le corrispondenti forme chinoniche. Tali intermedi possono successivamente reagire e associarsi attraverso differenti vie, dando origine sia a specie aggregate presenti in soluzione sia al materiale che si deposita sulla superficie [23]. La struttura finale della PDA non è stata tuttavia ancora descritta da un unico modello universalmente accettato.

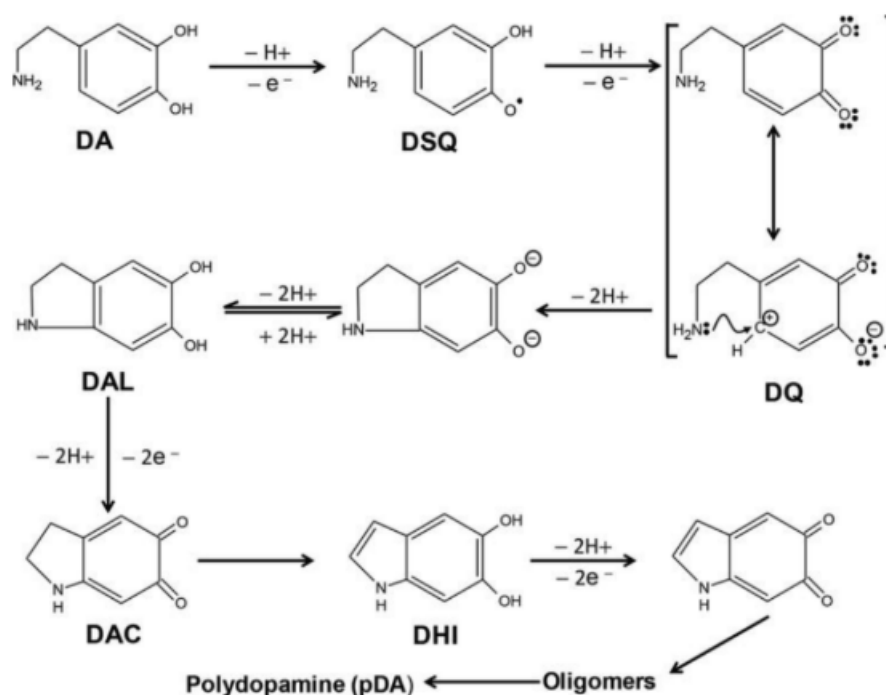


Figura 3: Schema di polimerizzazione della dopamina [24]

La PDA non deve quindi essere considerata un polimero convenzionale costituito da una singola unità ripetitiva ben definita. Le evidenze

disponibili descrivono piuttosto un materiale chimicamente eterogeneo, simile alle eumelanine, nel quale unità catecoliche, chinoniche e indoliche sono associate attraverso una combinazione di legami covalenti e interazioni non covalenti. Tra queste ultime possono contribuire interazioni π - π , legami a idrogeno e interazioni catione- π . Di conseguenza, composizione, organizzazione e proprietà del film possono cambiare sensibilmente in funzione delle condizioni utilizzate per la deposizione [23,24].

La scelta delle condizioni di preparazione assume pertanto un ruolo rilevante. Il protocollo in Tris a pH circa 8,5 rimane uno dei più utilizzati per ottenere film di PDA mediante ossidazione con ossigeno atmosferico; tuttavia, è stato dimostrato che modificando il tampone o il tipo di ossidante si possono ottenere variazioni significative nella cinetica di deposizione e nelle caratteristiche finali del rivestimento [25]. Durante il processo, la soluzione assume progressivamente la tipica colorazione bruno-scura associata alla formazione delle specie ossidate e aggregate della dopamina.

1.4.1. Polidopamina come rivestimento per la funzionalizzazione superficiale

Una delle proprietà più importanti della PDA è la capacità di formare film aderenti su substrati chimicamente molto differenti. Il metodo introdotto da Lee et al. è stato applicato a metalli, ossidi, semiconduttori, materiali ceramici e numerosi polimeri, senza richiedere una specifica funzionalizzazione preliminare del substrato [22]. Questa relativa indipendenza dalla natura del materiale, unita alla semplicità della deposizione in ambiente acquoso, ha reso la PDA una piattaforma particolarmente versatile per la modificazione superficiale.

L'adesione della PDA non è riconducibile a un singolo meccanismo, ma deriva dalla combinazione di interazioni che possono variare in funzione

della superficie considerata. Possono contribuire legami a idrogeno, interazioni π - π , interazioni elettrostatiche, coordinazione con centri metallici e altre interazioni tra i gruppi catecolici, chinonici e amminici del materiale e il substrato [23,24]. Nel caso di superfici ossidiche come vetro e silice, le interazioni polari e i legami a idrogeno con i gruppi superficiali rappresentano alcuni dei contributi proposti; è tuttavia preferibile non attribuire l'adesione della PDA a un unico tipo di legame.

Una volta depositato, il rivestimento conserva numerosi gruppi funzionali disponibili per successive modificazioni. In particolare, le forme chinoniche possono reagire con specie contenenti gruppi amminici o tiolici attraverso reazioni di addizione di Michael o formazione di basi di Schiff. A queste reazioni che portano alla formazione di legami covalenti si aggiungono coordinazione di ioni metallici, formazione di legami idrogeno, di interazioni elettrostatiche e π - π . La PDA rappresenta quindi non soltanto uno strato adesivo, ma un substrato funzionale per la preparazione di sistemi multicomponente [22,23].

Questa caratteristica risulta particolarmente rilevante nel presente lavoro di tesi. Un primo strato di PDA depositato sul vetro viene infatti utilizzato come interfaccia per l'immobilizzazione delle nanoparticelle di Blu di Prussia. La deposizione di nanoparticelle inorganiche su strati di PDA può essere fortemente influenzata dalle proprietà superficiali e, in particolare, dalla carica delle due componenti. Ghidoni et al. hanno recentemente dimostrato anche nel caso di PBNPs depositate su film di PDA che il pH e il potenziale zeta possono modulare la quantità di nanoparticelle immobilizzate sulla superficie [18].

Nel sistema multistrato sviluppato in questa tesi, dopo la deposizione delle PBNPs viene introdotto un secondo strato di PDA. Tale strato consente di ricoprire ulteriormente la superficie contenente le nanoparticelle e di ottenere una nuova interfaccia chimicamente funzionalizzabile per

l'introduzione del componente fotoattivo successivo. In questo senso, la PDA svolge quindi una duplice funzione: favorisce la costruzione dell'architettura multistrato e contemporaneamente contribuisce alle proprietà ottiche complessive del rivestimento.

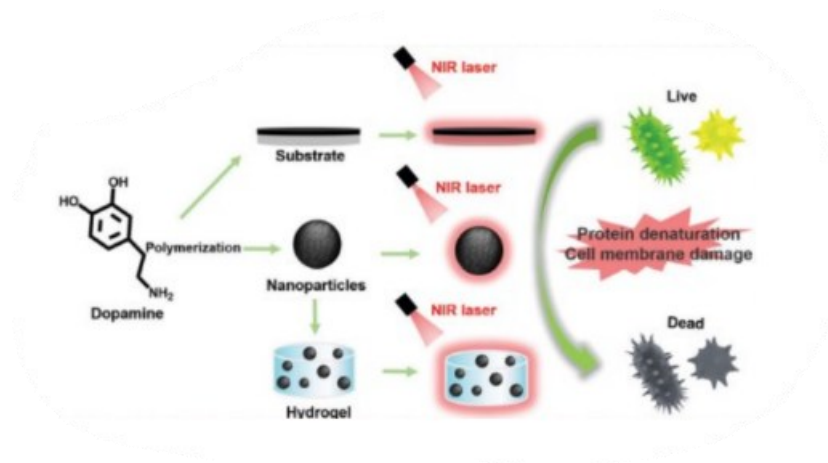


Figura 4: schematica dell'attività antibatterica fototermica della polidopamina sotto irraggiamento NIR.

Oltre alle proprietà adesive e alla reattività superficiale, la PDA presenta infatti un assorbimento ottico ampio, che si estende dalla regione UV-visibile fino al vicino infrarosso. Una parte significativa dell'energia assorbita può essere dissipata attraverso processi non radiativi sotto forma di calore, conferendo alla PDA proprietà di conversione fototermica. Per questo motivo la PDA è stata studiata sia come agente fototermico sia come componente di materiali compositi fotoattivi [26].

Sotto irraggiamento NIR, il conseguente aumento di temperatura può determinare alterazioni della membrana batterica e compromettere l'integrità cellulare, contribuendo all'inattivazione dei microrganismi. Le proprietà fototermiche della PDA sono pertanto state ampiamente sfruttate nella progettazione di materiali antimicrobici fotoattivabili [26].

Per quanto riguarda invece una possibile attività antibatterica intrinseca della PDA in assenza di irraggiamento, è opportuno adottare un atteggiamento prudente. In letteratura sono stati proposti diversi

meccanismi per materiali contenenti PDA, comprese interazioni con la superficie batterica e processi associati alla generazione di specie reattive; tuttavia, l'efficacia dipende fortemente dalla forma del materiale, dalla chimica superficiale e dalle condizioni sperimentali. Non è pertanto corretto attribuire automaticamente una significativa attività battericida a qualsiasi film di PDA non modificato [26].

1.5. Verde indocianina: struttura e proprietà fotofisiche

L'indocianina verde (*Indocyanine Green*, ICG) è un colorante organico appartenente alla famiglia delle tricarbocianine, caratterizzato da un esteso sistema π -coniugato responsabile delle sue proprietà ottiche nella regione del vicino infrarosso (NIR). La molecola presenta due unità benzoindoliche collegate da una catena polimetinica e gruppi solfonato, che contribuiscono alla sua solubilità in ambiente acquoso. Grazie alla presenza del sistema coniugato, l'ICG mostra un'intensa banda di assorbimento nel NIR e un'emissione di fluorescenza a lunghezze d'onda maggiori. La posizione e l'intensità di tali bande dipendono tuttavia fortemente dall'ambiente nel quale si trova il colorante, in particolare dal solvente, dalla concentrazione e dall'interazione con altre molecole [27][28]. Le proprietà ottiche dell'ICG sono infatti note per essere particolarmente sensibili al microambiente molecolare.

In soluzione acquosa sufficientemente diluita, l'ICG è presente principalmente in forma monomerica e presenta una banda di assorbimento con massimo intorno a 780 nm. All'aumentare della concentrazione, le molecole possono invece associarsi formando aggregati, con conseguenti modificazioni del profilo spettrale. In particolare, la formazione di H-aggregati è associata alla comparsa di una banda a lunghezze d'onda inferiori, intorno a 700 nm, e a una diminuzione dell'emissione di fluorescenza. Tale comportamento evidenzia come la quantità di colorante presente in un sistema non sia necessariamente

direttamente proporzionale alla sua risposta fotoattiva, poiché le interazioni intermolecolari possono modificare le vie di decadimento dello stato eccitato [28][29].

Oltre all'aggregazione, un ulteriore limite dell'ICG è rappresentato dalla sua ridotta stabilità in soluzione acquosa. L'esposizione prolungata alla luce può determinare fenomeni di *photobleaching* e fotodegradazione, accompagnati dalla diminuzione dell'assorbimento e dalla formazione di prodotti di degradazione. Anche il solvente e la disponibilità di ossigeno possono influenzare significativamente questi processi [30][31]. Per tali ragioni sono stati sviluppati numerosi sistemi di immobilizzazione, incapsulamento e associazione con nanomateriali allo scopo di migliorare la stabilità del colorante e modularne le proprietà fotofisiche.

Le caratteristiche di assorbimento ed emissione nel NIR hanno reso l'ICG un fluoroforo di particolare interesse in campo biomedico. Il colorante è utilizzato clinicamente come agente per imaging ottico e trova applicazione, tra le altre, nella valutazione della perfusione vascolare, nell'angiografia e nell'imaging intraoperatorio. In ambiente biologico, il legame con le proteine plasmatiche modifica ulteriormente le proprietà spettrali dell'ICG; per l'ICG legata alle proteine plasmatiche sono riportati un massimo di assorbimento prossimo a 805 nm e un massimo di emissione intorno a 830 nm.

Oltre all'impiego come fluoroforo, l'ICG può essere utilizzata come agente fotoattivo, poiché l'assorbimento di radiazione NIR può essere seguito sia dalla conversione dell'energia assorbita in calore sia dall'avvio di processi fotochimici che portano alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Questa duplice risposta permette quindi all'ICG di contribuire sia a fenomeni fototermici sia a processi fotodinamici [27][32].

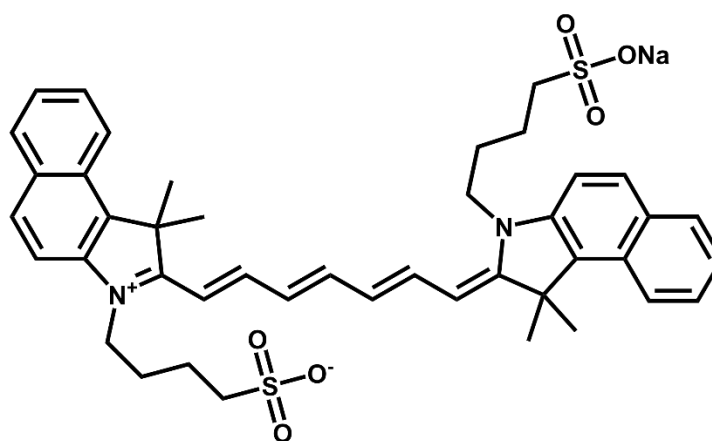


Figura 5: Struttura dell'ICG.

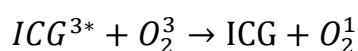
Un fotosensitizzatore è una specie capace di assorbire radiazione luminosa e, una volta raggiunto uno stato elettronico eccitato, trasferire energia o elettroni alle specie presenti nell'ambiente circostante, promuovendo reazioni fotochimiche. In presenza di ossigeno, tali processi possono portare alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), responsabili dell'effetto fotodinamico. In questo lavoro di tesi, l'ICG è stata scelta proprio per la sua capacità di agire come fotosensitizzatore nella regione del vicino infrarosso e di generare ROS in seguito a irraggiamento NIR [27][32]. La sua introduzione nel sistema multistrato PB-PDA-ICG è stata quindi finalizzata a conferire alla superficie una componente fotodinamica, complementare alla risposta fototermica associata agli altri componenti del sistema, entrambe eccitabili con la stessa radiazione Laser alla lunghezza di 808 nm.

1.5.1. Fotoattivazione dell'ICG e produzione di specie reattive dell'ossigeno

In seguito all'assorbimento di radiazione NIR, l'ICG viene promossa dallo stato elettronico fondamentale S_0 a uno stato eccitato di singoletto S_1 . Da questo stato sono possibili differenti vie di decadimento. Una parte dell'energia può essere emessa sotto forma di fluorescenza, mentre i processi di rilassamento non radiativo determinano la dissipazione dell'energia sotto forma di calore, contribuendo alla risposta fototermica dell'ICG. Una frazione delle molecole eccitate può inoltre raggiungere uno stato eccitato di tripletto mediante *intersystem crossing*, rendendo possibili reazioni fotochimiche con le specie presenti nell'ambiente circostante [29][31]. La formazione dello stato di tripletto e, di conseguenza, l'efficienza di produzione delle ROS dell'ICG libera sono tuttavia relativamente limitate e fortemente dipendenti dalle condizioni sperimentali.

La produzione di ROS da parte di un fotosensibilizzatore può avvenire secondo due principali meccanismi, convenzionalmente definiti tipo I e tipo II. Nel meccanismo di tipo I, il fotosensibilizzatore eccitato partecipa a processi di trasferimento elettronico o di atomi di idrogeno con le molecole circostanti, determinando la formazione di specie radicaliche. La successiva reazione con l'ossigeno può portare alla formazione dell'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) e, attraverso reazioni successive, di altre specie ossidanti quali perossido di idrogeno e radicali ossidrilici.

Nel meccanismo di tipo II, invece, l'energia dello stato eccitato di tripletto viene trasferita direttamente all'ossigeno molecolare, che passa dal proprio stato fondamentale di tripletto allo stato eccitato di singoletto:



L'ossigeno singoletto O_2^1 è una specie elettronica eccitata altamente reattiva e rappresenta una delle principali ROS coinvolte nei processi fotodinamici. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'irraggiamento dell'ICG nel NIR è in grado di determinare la formazione di specie reattive dell'ossigeno, confermandone il possibile utilizzo come fotosensibilizzatore [32].

Il contributo relativo dei meccanismi di tipo I e di tipo II non è però costante, ma dipende dallo stato molecolare dell'ICG e dal suo microambiente. Fan et al. hanno mostrato, ad esempio, che l'ICG monomerica presenta una modesta efficienza complessiva di produzione di ROS ed è associata prevalentemente a un comportamento di tipo II, mentre particolari condizioni di aggregazione possono favorire una maggiore componente di tipo I e incrementare la capacità foto-ossidante del sistema [29]. Tale osservazione è particolarmente importante quando l'ICG viene immobilizzata o confinata su un materiale, poiché le interazioni intermolecolari e il grado di aggregazione possono modificare significativamente il suo comportamento fotochimico.

Le ROS prodotte in seguito alla fotoattivazione possono reagire con diverse componenti cellulari, determinando l'ossidazione di lipidi, proteine e altre biomolecole. In ambito antimicrobico, il conseguente danno ossidativo può compromettere l'integrità della membrana e alterare processi cellulari essenziali. L'efficacia della risposta fotodinamica dipende pertanto da diversi parametri, tra cui la concentrazione e lo stato di aggregazione dell'ICG, la disponibilità di ossigeno e le condizioni di irraggiamento (lunghezza d'onda, irradianza, tempo di esposizione e fluenza [$J(\text{cm}^{-2})$]). [29][32][33].

L'attività antimicrobica dell'ICG fotoattivata è stata dimostrata, tra gli altri, da Topaloglu et al. È stato studiato l'effetto dell'ICG durante irraggiamento con laser a 809 nm su ceppi di *Staphylococcus aureus* e

Pseudomonas aeruginosa, comprendendo anche ceppi antibiotico-resistenti. Nelle condizioni sperimentali adottate, la combinazione tra ICG e irraggiamento determinava una marcata riduzione della vitalità batterica, mentre né il solo colorante né il solo irraggiamento producevano un effetto comparabile [33].

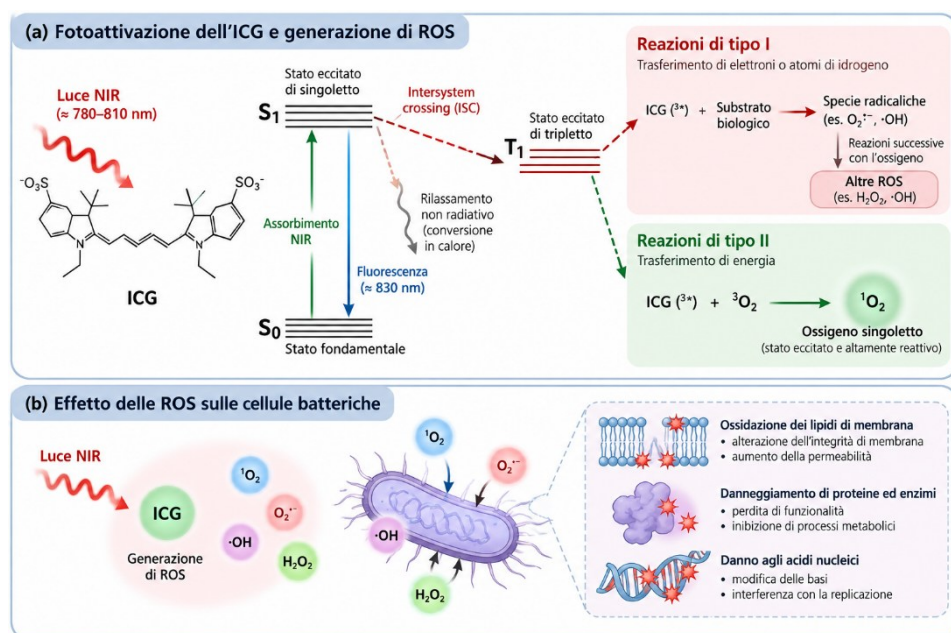


Figura 6: a) fotoattivazione dell'ICG, dei meccanismi di tipo I e II per la generazione di ROS. b) Principali effetti delle specie reattive dell'ossigeno sulle cellule batteriche.

1.6. Progetto di tesi

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la realizzazione di una superficie fotoattiva multistrato, sviluppata su substrati di vetro e progettata per combinare una risposta fototermica e una risposta fotodinamica mediante irraggiamento laser alla stessa lunghezza d'onda.

A tale scopo è stata progettata un'architettura costituita dalla deposizione sequenziale di polidopamina (PDA), nanoparticelle di Blu di Prussia (PBNPs), un secondo strato di PDA e verde indocianina (ICG). In questo sistema, le PBNPs e la PDA contribuiscono principalmente alla componente fototermica, convertendo l'energia luminosa assorbita in

calore, mentre l'ICG è stata introdotta come fotosensibilizzatore per conferire al rivestimento una componente fotodinamica attraverso la generazione fotoindotta di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

La scelta dei componenti è stata effettuata in modo da ottenere un significativo assorbimento nella stessa regione spettrale del vicino infrarosso, con l'obiettivo di utilizzare un'unica sorgente di irraggiamento per attivare contemporaneamente entrambi i processi fotoindotti. La combinazione di effetto fototermico e produzione di ROS è stata quindi proposta come strategia per la realizzazione di una superficie potenzialmente antimicrobica attivabile mediante luce.

Il lavoro ha inoltre previsto la caratterizzazione delle diverse fasi di funzionalizzazione, al fine di verificare la corretta costruzione dell'architettura multistrato e valutarne le proprietà ottiche e fotoattive.

2. Materiali e metodi

2.1. Reagenti e Materiali

Acido citrico monoidrato, potassio esacianoferrato (II) triidrato, cloruro di ferro (III) esaidrato ($\geq 98\%$), acido nitrico ($\geq 65\%$), 2-propanol ($\geq 99.5\%$), idrossido di sodio ($\geq 99\%$), Trizma base $\geq 99.9\%$ (TRIS), acido cloridrico ($\geq 37\%$), tampone fosfato salino (PBS) pastiglie, verde indocianina (*Indocyanine Green*, ICG), citrato di sodio tribasico diidrato ($\geq 99.0\%$) sono stati acquistati da Sigma Aldrich ed utilizzati senza ulteriori purificazioni. Dopamina cloridrato ($\geq 99\%$) è stata acquistata da Thermo Scientific ed utilizzata come fornita. Vetrini coprioggetto 21 mm $\times$ 26 mm sono stati acquistati da Carlo Erba. Per tutti gli esperimenti e le sintesi è stata utilizzata acqua Milli-Q.

Prima dell'utilizzo, tutta la vetreria impiegata con NP è stata trattata con acqua regia (soluzione 3:1 HCl concentrato/HNO₃ concentrato) e

successivamente lavata tre volte per tre minuti in bagno ad ultrasuoni con acqua Milli-Q. Infine, la vetreria pulita è stata asciugata in stufa a 140 °C finché completamente asciutta.

2.2. Caratterizzazione e strumentazioni

- **Spettroscopia UV-Visibile (UV-Vis):** Gli spettri di assorbimento UV-Vis delle sospensioni colloidali sono stati acquisiti mediante uno spettrofotometro Varian Cary 60 nell'intervallo 300 - 1100 nm, utilizzando cuvette in vetro ottico con cammino ottico di 1 cm. Gli spettri dei campioni solidi sono stati registrati sullo stesso strumento e nello stesso intervallo di lunghezze d'onda, utilizzando un apposito portacampioni.
- **pH:** Le misure di pH e le eventuali correzioni sono state effettuate mediante un pH-metro da banco XS Instruments pH 50, equipaggiato con un elettrodo combinato a vetro Thermo Scientific Orion 912 BNWP oppure, con microelettrodo Mettler-Toledo.
- **Dynamic Light Scattering (DLS):** Il diametro idrodinamico delle nanoparticelle è stato determinato su 1 mL di sospensione colloidale impiegando uno strumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments), equipaggiato con un laser He-Ne polarizzato verticalmente, con potenza in uscita pari a 30 mW. Le misure di potenziale-Z sono state effettuate su 800 µL di sospensione colloidale utilizzando una cella capillare per misure di potenziale-Z sullo stesso strumento.
- **Centrifugazione:** le operazioni di centrifugazione sono state effettuate utilizzando un'ultracentrifuga VWR Mega Star 1.6, impiegando provette in polipropilene.
- **Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM):** Le immagini di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) sono state acquisite presso il Centro Grandi Strumenti dell'Università degli Studi di

Pavia, Pavia, mediante un microscopio JEOL JEM-1200 EX II. I campioni sono stati preparati depositando 8 μL di sospensione colloidale su griglie di rame rivestite con Collodion, successivamente lasciate essiccare all'aria prima dell'analisi.

- **Microscopia Elettronica a scansione (SEM):** le immagini SEM per le analisi di morfologia di superficie sono state acquisite con un microscopio Tescan Mira XMU Variable Pressure Field Emission Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) (Tescan USA Inc., Warrendale, PA, USA), disponibile presso il laboratorio Arvedi del CISRiC – Università degli Studi di Pavia, Pavia. Le immagini sono state ottenute con un rivelatore di elettroni secondari *In-Beam*. I vetri, tagliati di dimensione 8mm×8mm, sono stati montati su *stub* di alluminio tramite *carbon tape* biadesivo e sono stati resi elettricamente conduttivi mediante copertura con un film sottile di platino.
- **Effetto fototermico sotto irraggiamento nel NIR:** i campioni sono stati irraggiati a 808 nm con un diodo laser multimodale AlGaAs (L808P1WJ, Thorlabs GmbH, Germania), utilizzando una potenza di irraggiamento di 250 mW (irradianza sul campione: 0.318 W/cm²). L'incremento di temperatura è stato monitorato tramite termocamera FLIR E40 e il software FLIR Tools+ (FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA), con una frequenza di acquisizione di un'immagine ogni tre secondi, una sensibilità di 0.1 °C e un'accuratezza di ± 0.2 °C.
- **Elaborazione dati:** L'elaborazione degli spettri UV-Vis e la costruzione dei relativi grafici sono state eseguite con il software SigmaPlot, mentre l'analisi dimensionale delle nanoparticelle a partire dalle immagini TEM è stata effettuata mediante il software ImageJ.

2.3. Procedure

2.3.1. Sintesi di nanoparticelle di Blu di Prussia (PBNPs):

Le PBNPs sono state sintetizzate secondo una procedura riportata in letteratura [18]. Una soluzione 1 mM in $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 5 mM in acido citrico è stata portata a 70 °C in bagno termostato sotto agitazione magnetica. In parallelo, una soluzione 1 mM in $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 5 mM in acido citrico è stata riscaldata alla medesima temperatura. Raggiunti i 70 °C, la soluzione di $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ è stata aggiunta velocemente e in maniera continua alla soluzione di FeCl_3 , portando alla formazione di una sospensione colloidale blu intenso. Il colloide è stato mantenuto sotto agitazione magnetica a 70 °C per 5 minuti e successivamente lasciato raffreddare, sempre sotto agitazione, fino a temperatura ambiente. La sospensione colloidale ottenuta è stata purificata tramite centrifugazione a 13 000 rpm per 45 minuti e il pellet è stato ri-disperso in acido citrico 5 mM nel volume iniziale.

2.3.2. Preparazione di vetrini ricoperti di polidopamina (glass@PDA)

I vetrini (21 × 26 mm) sono stati preliminarmente sottoposti a un processo di pulizia mediante trattamento in bagno a ultrasuoni. In particolare, i vetri, posti in una vasca, sono stati sottoposti a sonicazione per una volta per tre minuti in 2-propanolo e successivamente la procedura è stata ripetuta per due volte utilizzando H_2O , al fine di rimuovere eventuali contaminanti superficiali. I substrati puliti sono stati quindi immersi in una soluzione 2 mg/mL di dopamina in Tris 10 mM (pH ~ 8.6) e mantenuti sotto agitazione mediante agitatore oscillante per 60 minuti.

Dopo 60 minuti, la soluzione è stata rimossa e i vetrini sono stati lavati tre volte con acqua bidistillata. Infine, i campioni sono stati asciugati mediante un flusso di azoto.

2.3.3. Caricamento di PBNPs sulla PDA (glass@PDA@PBNPs):

I vetrini glass@PDA sono stati trasferiti in un contenitore pulito, sono stati ricoperti con 40 mL di sospensione colloidale di PBNPs e sono stati lasciati su agitatore oscillante a temperatura ambiente per una notte. Al termine dell'incubazione, la soluzione colloidale è stata rimossa e i campioni, lavati tre volte con H₂O, sono stati asciugati con azoto, ottenendo così i vetri glass@PDA@PBNPs.

2.3.4 Copertura PBNPs con PDA (glass@PDA@PBNPs@PDA)

I vetri glass@PDA@PBNPs sono stati ricoperti completamente con una soluzione 2mg/ml di dopamina in Tris 10mM (pH ~ 8.6) e mantenuti sotto agitazione mediante agitatore oscillante a temperatura ambiente per 2 ore. I campioni sono stati quindi lavati tre volte con H₂O e asciugati con flusso di azoto, ottenendo così i vetri glass@PDA@PBNPs@PDA.

Al termine della polimerizzazione la soluzione è stata allontanata e i campioni sono stati lavati 3 volte con acqua bidistillata e asciugati.

2.3.5. Funzionalizzazione con Verde Indocianina (ICG) di glass@PDA@PBNPs@PDA:

I campioni glass@PDA@PBNPs@PDA, posti in una vasca Coplin, sono stati ricoperti completamente con una soluzione 5×10^{-6} M di ICG in citrato di sodio 5×10^{-3} M, il cui pH è stato precedentemente portato a 3 mediante aggiunte di HCl. Le vasche sono state mantenute al buio a temperatura ambiente per 6 h; dopo questo intervallo di tempo i campioni sono stati lavati tre volte con H₂O e sono stati fatti asciugare sotto flusso di azoto, mantenendoli sempre al buio.

2.3.6. Preparazione dei vetrini glass@PDA@ICG

I vetrini rivestiti con PDA sono stati immersi in una soluzione di ICG 5×10^{-6} M preparata in citrato di sodio 5 mM, il cui pH era stato precedentemente portato a circa 3 mediante aggiunta di HCl. I contenitori

sono stati mantenuti a temperatura ambiente e al buio per 6 h. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati lavati tre volte con H₂O e asciugati sotto flusso di azoto, mantenendoli al riparo dalla luce, ottenendo così i vetrini glass@PDA@ICG.

2.3.7. Studio e confronti di stabilità in H₂O e soluzione salina tampone fosfato (PBS)

Al fine di valutare la stabilità dei campioni (glass@PDA@PBNPs, glass@PDA@PBNPs@PDA, glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG) e il possibile rilascio dei suoi componenti nel tempo, i campioni sono stati immersi in tre differenti mezzi: acqua bidistillata, acqua bidistillata acidificata a pH 3 mediante HCl (37% m/m) e soluzione tampone fosfato (PBS) a pH 7.4.

A intervalli di tempo prestabiliti (1 h, 5 h, 24 h e 6 giorni), i substrati sono stati rimossi dalle rispettive soluzioni, sottoposti alla procedura di lavaggio e asciugatura descritta in precedenza e infine caratterizzati mediante spettroscopia UV-Vis.

3. Risultati e discussione

3.1 Sintesi e caratterizzazione PBNPs

Le PBNPs sono state sintetizzate seguendo una procedura nota [18], che prevede l'utilizzo di due sali di ferro, FeCl₃·6H₂O e K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O.

Una prima soluzione 1 mM di FeCl₃·6H₂O e 5mM di acido citrico è stata portata a 70°C in bagno termostato. Una seconda soluzione 5mM di acido citrico è stata riscaldata a 70°C anch'essa, e al termine della rampa di temperatura è stato aggiunto K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O in modo da ottenere una concentrazione pari a 1 mM. Una volta disciolto completamente il

sale, la soluzione è stata aggiunta alla prima con flusso veloce e continuo, in modo da innescare un evento di nucleazione unico e uniforme.

La sospensione colloidale di PBNPs ottenuta è stata caratterizzata mediante spettroscopia UV-Vis, Dynamic Light Scattering (DLS) e microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

La sospensione colloidale di PBNPs ottenuta ha mostrato la caratteristica banda di assorbimento UV-Vis (**Figura 7a**) dovuta al trasferimento di carica tra gli atomi di ferro (Trasferimento di carica di intervalenza)[34], con una lunghezza d'onda media del massimo compresa tra 700 nm e 715 nm. Le misure DLS hanno permesso di determinare il diametro idrodinamico medio delle PBNPs e il relativo potenziale-Z (ZP). Tramite utilizzo di DLS è stato possibile ottenere lo ZP medio delle diverse sintesi che è risultato essere -30 ± 2 mV, indicando una buona stabilità colloidale dovuta alla repulsione elettrostatica tra le particelle, mentre la dimensione la media è risultata essere 87.3 ± 0.3 nm.

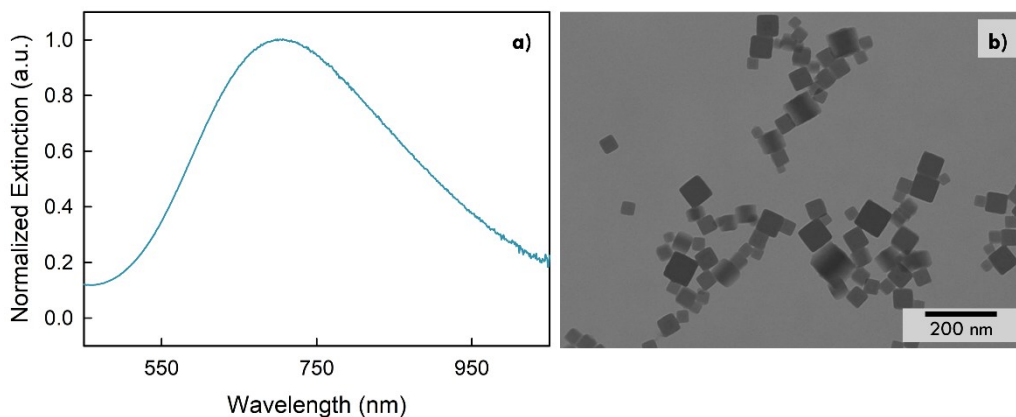


Figura 7: *a) Spettro UV-Vis rappresentativo normalizzato delle PBNPs. b) Immagine TEM rappresentativa del colloide, con dimensione media delle nanoparticelle di 54 ± 16 nm.*

La morfologia e le dimensioni delle PBNPs sono state inoltre investigate mediante TEM (vedi **Figura 7b** per un'immagine TEM rappresentativa del colloide). La dimensione media, misurata come spigolo del cubo in diverse immagini TEM, è risultata essere di 54 ± 16 nm. Le dimensioni

ottenute mediante DLS risultano superiori rispetto a quelle ricavate dalle immagini TEM, e tale differenza è attribuibile alla diversa natura delle due tecniche. Il DLS, infatti, misura il diametro idrodinamico delle particelle, che comprende anche il cappante citrato e la sfera di solvatazione. Inoltre, l'algoritmo di elaborazione dei dati assume una geometria sferica delle PBNPs cubiche e, il diametro atteso, che coincide con la diagonale del cubo, è quindi $\sqrt{3}$ per il lato dello stesso. Di conseguenza, i valori ottenuti mediante DLS risultano sistematicamente maggiori rispetto a quelli determinati mediante TEM.

3.2 Preparazione multistrato

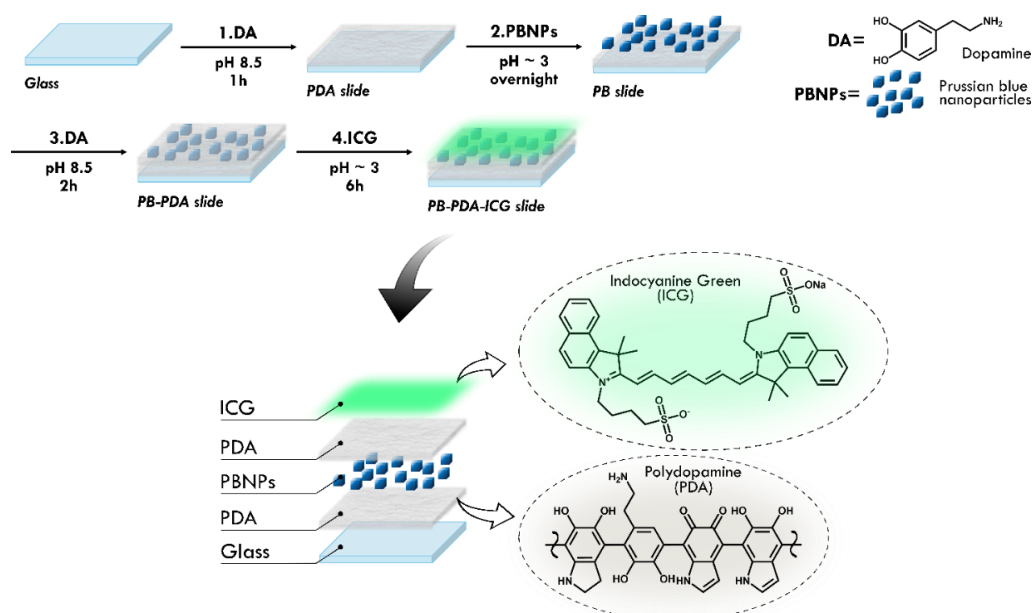


Figura 8: Rappresentazione schematica della preparazione del sistema multistrato $glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG$

Le superfici antibatteriche sono state preparate come descritto nella sezione sperimentale e come schematizzato in **Figura 8**. Come substrato è stato utilizzato il vetro (vetrini coprioggetto 21×26 mm), in modo da consentire la caratterizzazione ottica e spettroscopica. Sono state poi sfruttate le proprietà adesive della polidopamina (PDA) per ricoprire i vetrini, e le interazioni elettrostatiche tra PDA e PBNPs oppure tra PDA e Verde Indocianina (ICG) per la preparazione del multistrato completo.

3.2.1 Preparazione e caratterizzazione glass@PDA

I film di PDA sono stati preparati sulla superficie dei vetri seguendo una procedura nota in letteratura [22]. È stata preparata una soluzione di tampone TRIS a pH ~8-6 a cui è stata poi aggiunta dopamina, che in ambiente debolmente basico e in presenza di ossigeno va incontro ad autopolimerizzazione.

Al termine dell'incubazione, i substrati hanno assunto una colorazione giallo-brunastra, indicativa della formazione del rivestimento di polidopamina. La presenza del film è stata verificata mediante spettroscopia UV-Vis. Lo spettro non presenta bande di assorbimento particolarmente intense o ben definite, in quanto la PDA ha un assorbimento esteso su tutto il *range* spettrale.

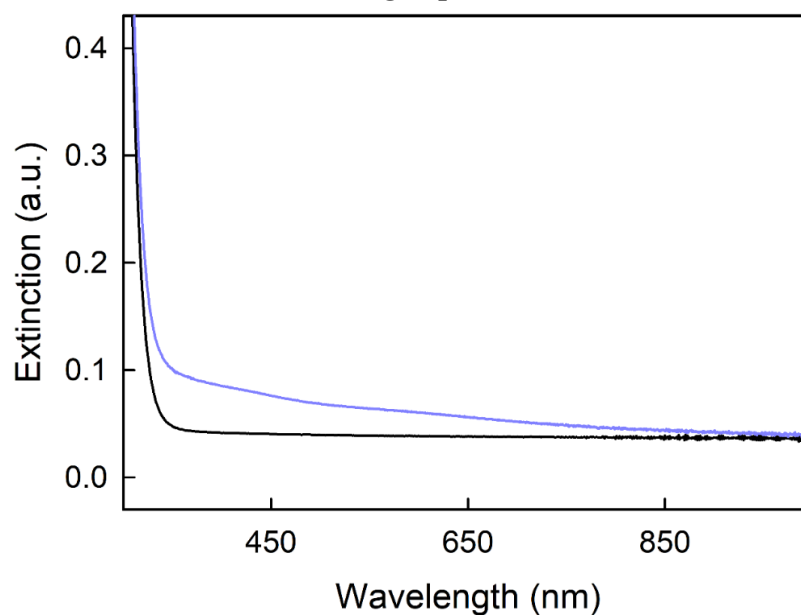


Figura 9: Spettri UV-Vis rappresentativi di glass@PDA (linea viola) e di un vetro pulito non funzionalizzato (linea nera).

In **Figura 9** è riportato lo spettro UV-Vis di glass@PDA, a confronto con lo spettro di un vetro pulito non funzionalizzato: si osserva soltanto un innalzamento dell'assorbanza nel *range* 400-700 nm, che conferma tuttavia l'avvenuta polimerizzazione. Questo è in accordo anche con quanto riportato in letteratura per i film di polidopamina, la cui risposta

ottica è caratterizzata da un assorbimento ampio e crescente verso le basse lunghezze d'onda, attribuibile alla natura eterogenea della struttura polimerica [35].

3.2.2 Preparazione e caratterizzazione glass@PDA@PBNPs

Le PBNPs precedentemente sintetizzate, purificate e ridisperse in acido citrico 5 mM, sono state fatte aderire alla PDA come descritto nel **paragrafo 2.3.3**. I campioni glass@PDA@PBNPs così ottenuti hanno assunto un colore azzurro più o meno intenso a seconda della quantità di nanoparticelle attaccate sulla superficie. La caratterizzazione spettroscopica di 7 diverse preparazioni ha evidenziato un massimo di estinzione ad una lunghezza d'onda media di 701 ± 4 nm riconducibile alle PBNPs, a conferma dell'effettivo ancoraggio delle nanoparticelle. Uno spettro UV-Vis rappresentativo è riportato in **Figura 10**. L'estinzione media alla lunghezza d'onda del massimo risulta essere 0.17 ± 0.03 a.u.. Questo denota una discreta variabilità tra le varie sintesi, che può essere dovuta a fattori come la disomogeneità della PDA o alle possibili differenze tra le sintesi delle PBNPs.

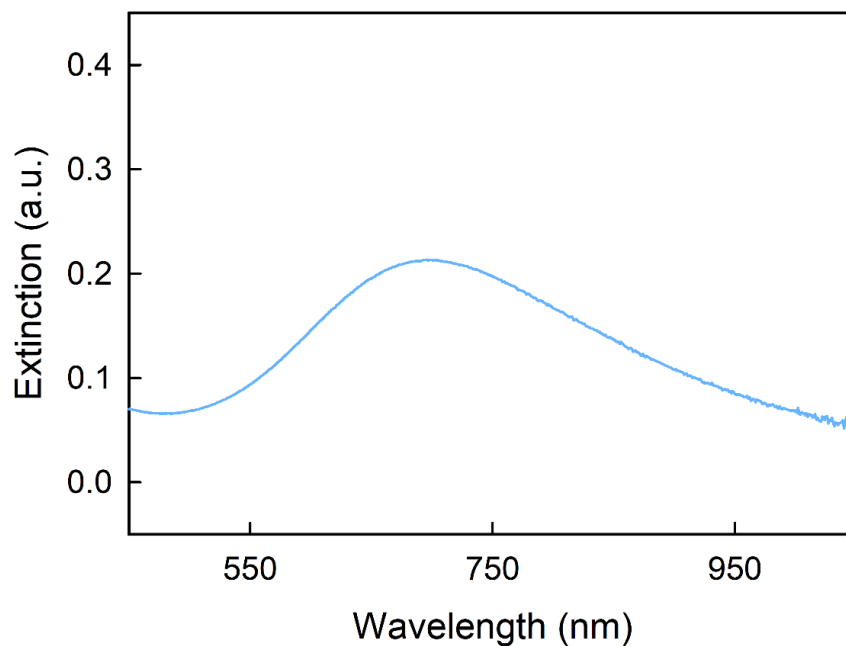


Figura 10: Spettro UV-Vis rappresentativo di glass@PDA@PBNPs con massimo a 700 ± 3 nm (estinzione: 0.21 ± 0.03 a.u.).

3.2.3 Preparazione e caratterizzazione glass@PDA@PBNPs@PDA

I vetrini glass@PDA@PBNPs sono stati ricoperti con un secondo strato di PDA, utilizzando la procedura precedentemente descritta per il primo strato di PDA [22]. I campioni sono stati nuovamente immersi in una soluzione di dopamina 2 mg/mL in Tris per 2 h, ottenendo così i vetrini glass@PDA@PBNPs@PDA. Utilizzando O_2 come agente ossidante, lo spessore del film di PDA è previsto essere di 6-8 nm dopo 1 h di polimerizzazione, mentre dovrebbe approssimativamente raddoppiare in 2 h [25]. Uno spettro UV-Vis rappresentativo dei campioni ottenuti è riportato in **Figura 11.a**, dove si nota un aumento generale dell'assorbanza su tutto il *range* spettrale analizzato dovuto all'assorbimento ampio della PDA nel campo del visibile [35]. Resta evidente il picco caratteristico delle PBNPs, se pur leggermente spostato verso destra: tale variazione può essere attribuita alla modifica dell'ambiente superficiale delle nanoparticelle in seguito al rivestimento con PDA. È stato infatti riportato

che l'interazione delle PBNPs con rivestimenti polimerici può influenzare la posizione della banda di trasferimento di carica $\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Fe(III)}$ [36].

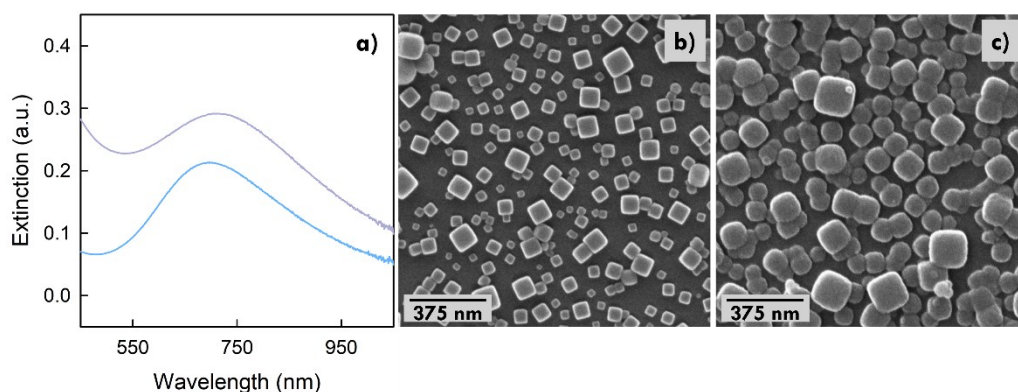


Figura 11: *a)* Spettri UV-Vis di glass@PDA@PBNPs (linea azzurra) e $\text{glass@PDA@PBNPs@PDA}$ (linea grigia). Immagini SEM di *b)* glass@PDA@PBNPs e *c)* $\text{glass@PDA@PBNPs@PDA}$.

Figura 11.b e **Figura 11.c** mostrano delle immagini SEM rappresentative rispettivamente di glass@PDA@PBNPs e $\text{glass@PDA@PBNPs@PDA}$. Come si può notare, il film di PDA ha ricoperto in modo uniforme le PBNPs, aumentandone la dimensione ma preservandone la morfologia.

3.2.4 Glass@PDA@ICG

Per la sintesi del sistema “ glass@PDA@ICG ” sono stati sintetizzati dei campioni glass@PDA descritti precedentemente nel paragrafo 3.2.1 ai quali è stata aggiunta una soluzione 5×10^{-6} M di ICG (Indocianina green) in citrato di sodio 5×10^{-3} M, il cui pH è stato precedentemente portato a 3 mediante aggiunte di HCl.

La soluzione di ICG risulta essere di colore verde smeraldo, questo colore è dovuto all'elevato grado di coniugazione che la molecola presenta, responsabile del suo intenso assorbimento nella regione del visibile e del vicino infrarosso [27,28].

L'analisi spettroscopica della soluzione ha evidenziato un picco di assorbanza in corrispondenza di 778 nm come evidenziato in **figura 12a**, Il grafico in **Figura 12b** mostra invece uno spettro UV-Vis rappresentativo di un vetrino ICG-PDA ottenuto nelle condizioni più favorevoli (linea viola). Lo spettro mantiene caratteristiche spettrali simili a quelle osservate per la soluzione di ICG, confermando l'avvenuta immobilizzazione dell'ICG sulla PDA. Tuttavia, si osserva uno spostamento batocromico (*red shift*) del massimo di assorbimento, da 778 nm a 835 nm, attribuibile alla variazione dell'intorno dell'ICG. Variazioni delle proprietà di assorbimento dell'ICG in seguito all'adsorbimento su superfici sono state precedentemente riportate in letteratura [40], evidenziando la forte dipendenza delle caratteristiche spettroscopiche del colorante dal microambiente circostante.

Per individuare le condizioni ottimali di interazione tra ICG e PDA sono state condotte diverse prove sperimentali, valutando l'influenza di tre principali parametri: il pH della soluzione, la concentrazione di ICG e la durata del processo di funzionalizzazione.

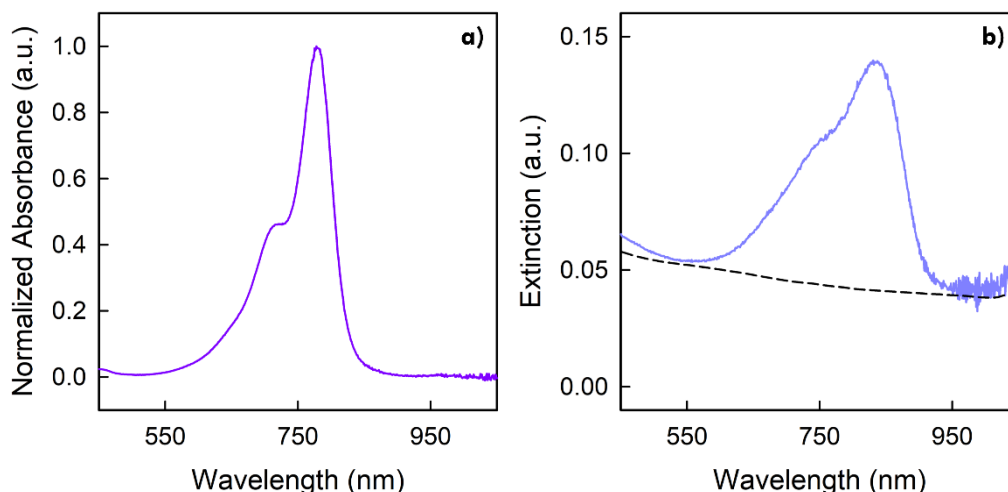


Figura 12: *a)* Spettro UV-Vis normalizzato di una soluzione di ICG 5×10^{-6} M. *b)* Confronto tra lo spettro UV-Vis medio di un vetrino rivestito con PDA (linea nera tratteggiata) e quello di un campione PDA-ICG (linea viola) ottenuto nelle condizioni di funzionalizzazione selezionate come ottimali.

Considerando che l'ICG presenta una carica negativa, mentre la carica superficiale della PDA varia in funzione del pH, inizialmente è stato

analizzato l'effetto del pH sull'adsorbimento del colorante. A tale scopo, sono state impiegate soluzioni di ICG a differenti concentrazioni preparate a due valori di pH (circa 3 e circa 7) e il tempo di funzionalizzazione è stato arbitrariamente fissato a 4 h.

I risultati hanno evidenziato una maggiore quantità di ICG associata alla superficie dei vetrini di PDA quando il trattamento veniva effettuato a pH ~ 3 rispetto a quanto osservato a pH ~ 7 (**Figura 13, Figura 14.a**). Tale differenza è attribuibile alla diversa carica superficiale della PDA nelle due condizioni: in ambiente acido, intorno a pH 3, la superficie della PDA assume una carica positiva, mentre all'aumentare del pH essa diventa progressivamente negativa [18]. A pH ~ 3 possono quindi instaurarsi interazioni elettrostatiche favorevoli tra la superficie protonata della PDA e l'ICG anionica. Al contrario, a pH ~ 7 , la presenza di cariche prevalentemente negative sia sulla PDA sia sull'ICG rende il contributo elettrostatico meno favorevole. All'interazione tra ICG e PDA possono inoltre contribuire altre interazioni intermolecolari, tra cui legami a idrogeno e interazioni π - π [38].

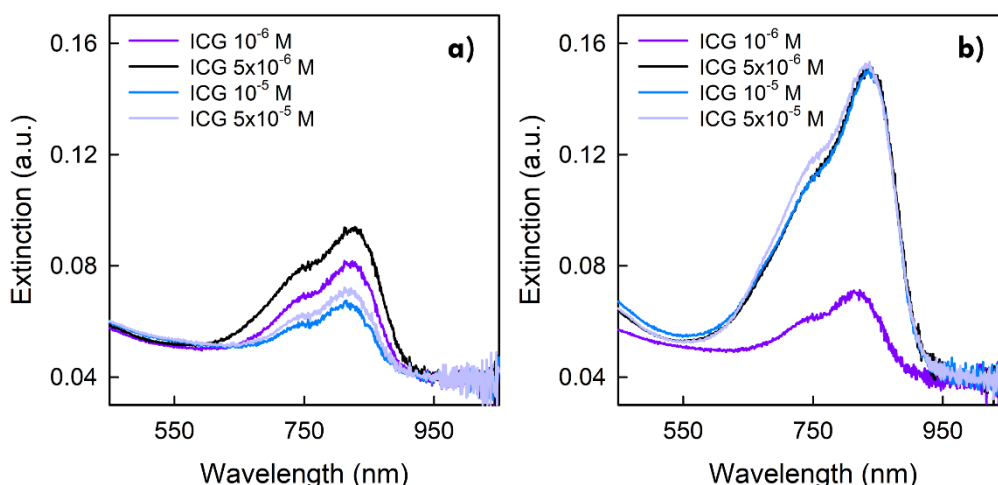


Figura 13: *a) Funzionalizzazione superficie glass@PDA@ICG a diverse concentrazioni a pH ~ 7 . b) Funzionalizzazione superficie glass@PDA@ICG a diverse concentrazioni a pH ~ 3 .*

Sulla base di questi risultati, le prove successive sono state effettuate in tampone citrato a pH 3, variando la concentrazione di ICG. Sono state

testate concentrazioni pari a 10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 10^{-5} M, 2×10^{-5} M e 5×10^{-5} M. Come mostrato in **Figura 14.b**, ad eccezione della concentrazione più bassa, pari a 10^{-6} M, tutti gli altri valori hanno portato a campioni caratterizzati da livelli di estinzione simili, indicando quantità comparabili di ICG presenti sulla superficie. Di conseguenza, per le prove successive è stata selezionata la concentrazione di 5×10^{-6} M.

Dopo aver definito il pH e la concentrazione di ICG, è stata studiata l'influenza del tempo di contatto tra la soluzione di ICG e i vetrini rivestiti di PDA. I campioni sono stati quindi immersi in una soluzione di ICG 5×10^{-6} M in citrato di sodio a pH ~ 3 per intervalli di tempo pari a 0.5, 1, 3, 6, 9, 22 e 24 h. L'andamento dell'estinzione media in funzione del tempo di funzionalizzazione è riportato in **Figura 14.c**. È stato osservato un progressivo aumento dell'estinzione fino a circa 6–9 h, intervallo oltre il quale i valori tendevano a stabilizzarsi. Per ragioni pratiche, è stato perciò scelto un tempo di funzionalizzazione pari a 6 h.

Per ottenere una stima quantitativa della quantità di ICG immobilizzata sui diversi campioni, è stata successivamente determinata la densità superficiale delle molecole di colorante a partire dal valore massimo di estinzione.

Il coefficiente di estinzione molare dell'ICG, indicato con ϵ , è stato ricavato mediante una curva di calibrazione ottenuta registrando gli spettri UV-Vis di soluzioni acquose di ICG a concentrazione nota. L'interpolazione lineare dei dati sperimentali ha fornito la seguente relazione:

$$y = 151985x + 0,0196$$

Dal momento che il coefficiente angolare della retta corrisponde al coefficiente di estinzione molare, è stato ottenuto un valore di:

$$\epsilon = 151985 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Per i calcoli successivi tale valore è stato approssimato a **$1.52 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$** , risultato compatibile con quelli precedentemente riportati in letteratura [39].

La densità superficiale di ICG, indicata con n_s , è stata infine calcolata utilizzando una forma modificata della legge di Lambert-Beer, adattata per la caratterizzazione di campioni solidi bidimensionali [41][42]:

$$n_s(\text{cm}^{-2}) = \frac{6 \cdot 10^{20} \times A}{2\varepsilon}$$

dove **A** rappresenta il valore di estinzione corretto misurato per i campioni PDA-ICG, mentre ε corrisponde al coefficiente di estinzione molare precedentemente determinato. Il termine **2** è stato introdotto per tenere conto del fatto che la funzionalizzazione interessa entrambe le superfici del vetrino.

Nelle condizioni sperimentali individuate come ottimali, ovvero pH ~ 3 , $[\text{ICG}] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ e 6 h di funzionalizzazione, è stata ottenuta una densità superficiale di ICG pari a:

$$n_s(\text{cm}^{-2}) = (2.01 \pm 0.02) \times 10^{14}$$

Questo è un valore compatibile con la formazione di uno strato monomolecolare su una superficie piana, come dimostrato da Pallavicini et al. nel caso della funzionalizzazione di vetri e quarzi con alcossisilani e successiva reazione con un opportuno cromoforo [41].

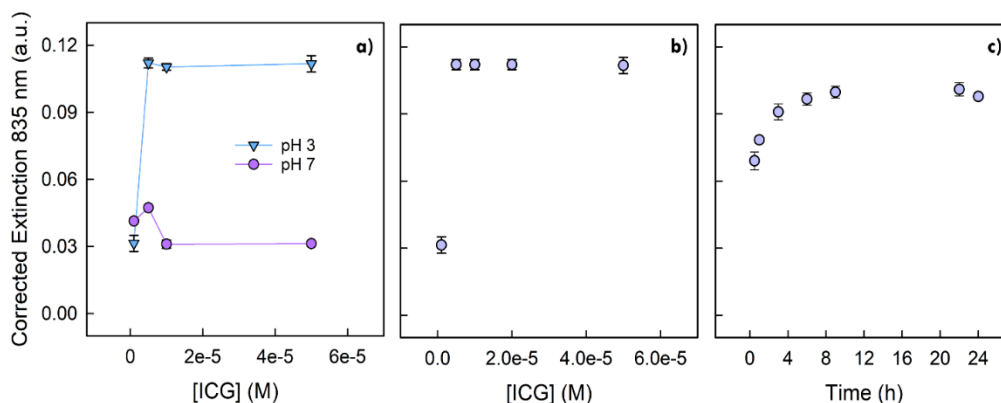


Figura 14: **a)** Estinzione corretta in funzione della concentrazione di ICG per i campioni preparati a pH 3 (triangoli azzurri) o a pH 7 (triangoli viola). **b)** Valori corretti di estinzione dei campioni preparati a pH 3 utilizzando diverse concentrazioni di ICG, che mostrano valori simili per tutte le concentrazioni $\geq 5 \times 10^{-6}$ M. **c)** Valori corretti di estinzione in funzione del tempo di funzionalizzazione per campioni preparati con una soluzione di ICG 5×10^{-6} M, che mostrano un plateau dopo 6-9 h.

A livello macroscopico, i campioni glass@PDA@ICG hanno mostrato una colorazione verde tenue, qualitativamente coerente con la presenza di ICG immobilizzata sulla superficie. Essendo l'ICG fotosensibile [30,31], durante la preparazione delle soluzioni, la funzionalizzazione e le successive manipolazioni, i campioni sono stati mantenuti al buio.

3.2.4.1. Studio della stabilità di Glass@PDA@ICG

La stabilità dei campioni glass@PDA@ICG è stata valutata in H₂O (pH ~ 3 e pH ~ 7) e in PBS (pH ~ 7.4) monitorando per via spettroscopica l'andamento del massimo dell'ICG a ~835 nm nel tempo.

I valori normalizzati di estinzione in funzione del tempo sono riportati in **figura 15**: mentre in H₂O a pH~3 è stata osservata una diminuzione drastica del picco di estinzione, i campioni tenuti a pH intorno a 7 (sia in H₂O che in PBS) hanno mantenuto un valore di estinzione paria circa il 75% di quello iniziale, dimostrando buona stabilità in condizioni che mimano quelle fisiologiche.

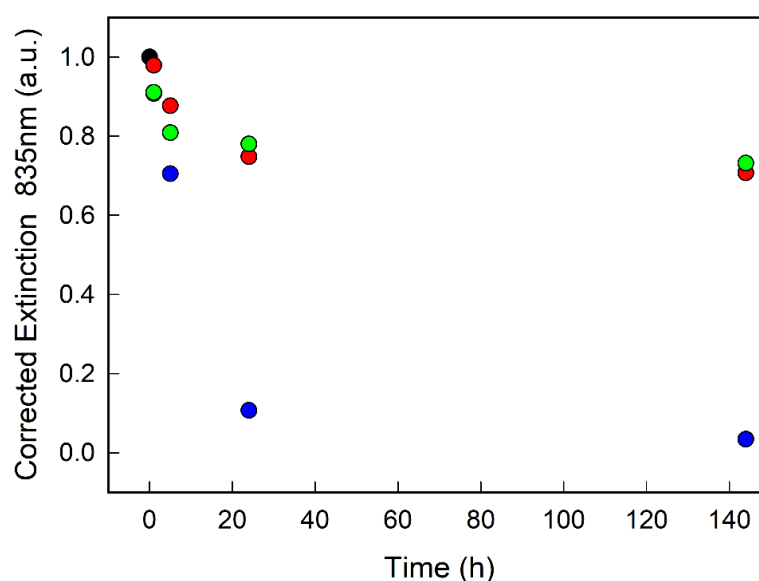


Figura 15: Stabilità del sistema glass@PDA@ICG nel tempo in differenti mezzi: tampone PBS a pH ~7,4 (punti verdi), H₂O a pH ~7 (punti rossi) e H₂O a pH ~3 (punti blu). I valori riportati rappresentano l'estinzione corretta a 777 nm normalizzata rispetto al valore iniziale.

L'ICG su PDA è risultata inoltre essere più stabile dell'ICG libera in soluzione, che, al contrario, mantiene solo il 10% della propria assorbanza iniziale (**Figura 16**).

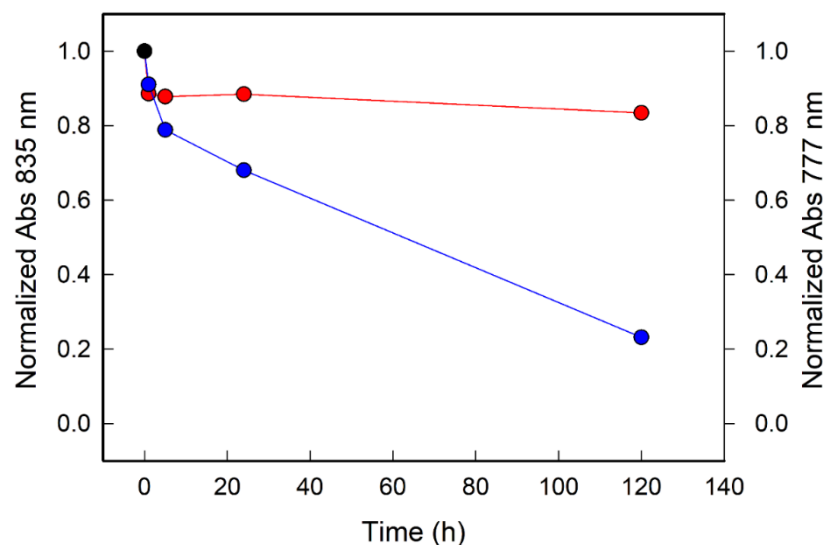


Figura 16: Confronto della stabilità nel tempo dell'ICG libera in soluzione e dell'ICG immobilizzata sui campioni glass@PDA. Sono riportati i valori di assorbanza normalizzata misurati in corrispondenza dei rispettivi massimi di assorbimento: 777 nm per l'ICG libera in soluzione (blu) e 835 nm per l'ICG immobilizzata sulla superficie (rosso).

3.2.5. Preparazione e caratterizzazione glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG

Una volta definite le condizioni ottimali per la funzionalizzazione della PDA con ICG, sono stati preparati i campioni glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG.

I vetrini glass@PDA@PBNPs@PDA, ottenuti tramite procedura descritta nel paragrafo 3.2.3, sono stati immersi in una soluzione di ICG preparata in tampone citrato 5 mM a pH circa 3 e lasciati reagire al buio per 6 ore. Al termine dell'incubazione, la soluzione di ICG è stata rimossa e i campioni sono stati sottoposti alle procedure di lavaggio e asciugatura precedentemente descritte.

Lo spettro UV-Vis rappresentativo del sistema multistrato è riportato in **figura 17**.

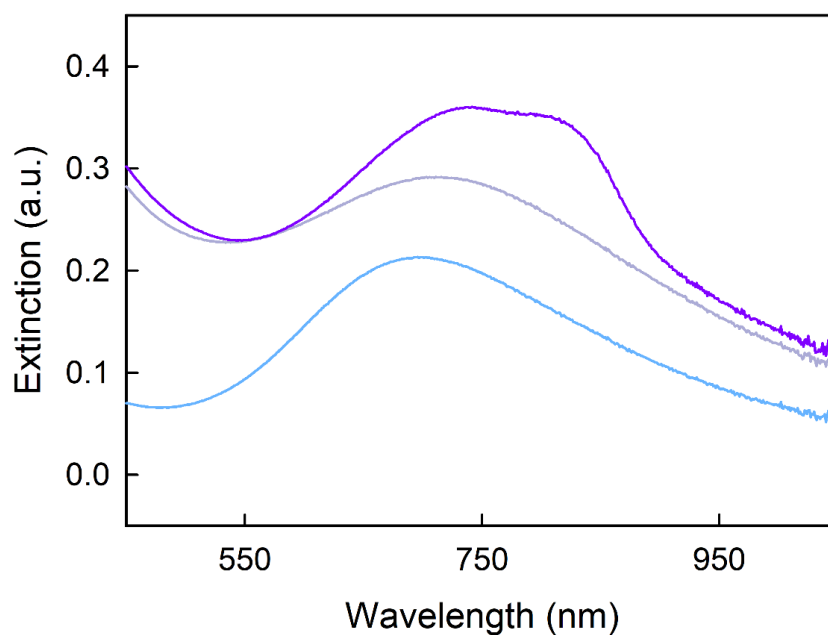


Figura 17: Spettro UV-Vis rappresentativo dei vari strati del sistema preparato: glass@PDA@PBNPs (linea azzurra), glass@PDA@PBNPs@PDA (linea grigia) e glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG (linea viola).

Per isolare il contributo spettrale dell'ICG all'estinzione complessiva del campione, lo spettro dei vetri glass@PDA@PBNPs@PDA è stato sottratto da quello dei vetri glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG, ottenendo uno spettro differenza riportato in **Figura 18** come linea rosa. Il profilo ottenuto presenta caratteristiche spettrali analoghe a quelle osservate per i vetrini glass@PDA@ICG, fornendo quindi un'ulteriore conferma dell'avvenuta immobilizzazione dell'ICG sulla superficie.

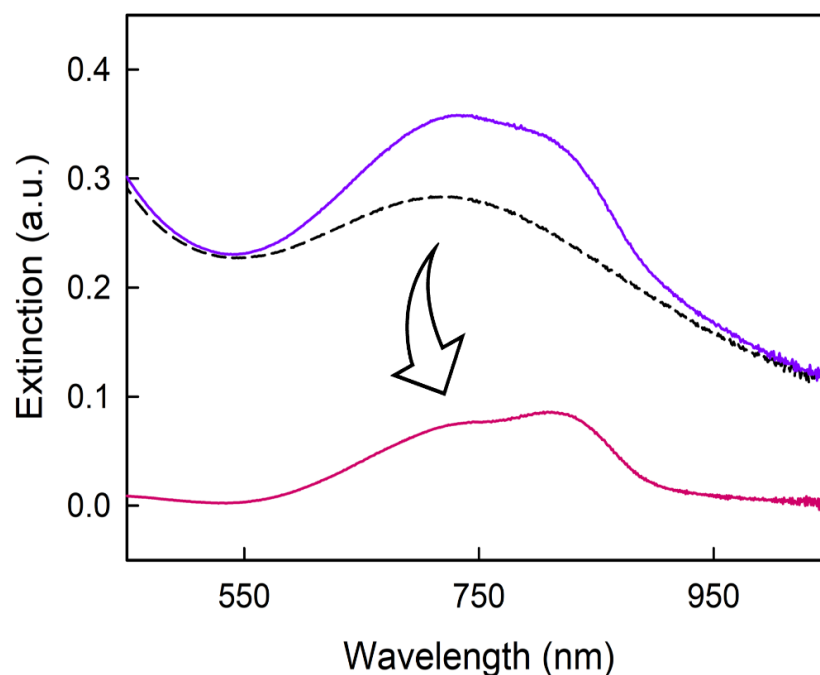


Figura 18: Confronto degli spettri UV-Vis del sistema *glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG* (linea viola) e del campione *glass@PDA@PBNPs@PDA* (linea nera tratteggiata). La linea rosa rappresenta lo spettro differenza ottenuto sottraendo il contributo di *glass@PDA@PBNPs@PDA* da quello del sistema multistrato completo, al fine di evidenziare il contributo spettroscopico attribuibile all'ICG immobilizzata sulla superficie.

Il valore massimo di assorbanza dello “spettro differenza” è stato successivamente utilizzato per stimare la quantità di ICG presente sulla superficie, ottenendo un valore pari a $1.8 \pm 0.2 \times 10^{14}$ molecole per unità di area, calcolato su tre *batch* preparati in modo indipendente. La variabilità tra i diversi *batch*, espressa come deviazione standard relativa (RSD), è risultata pari al 9,6%. Il valore ottenuto è dello stesso ordine di grandezza di quello misurato per i campioni *glass@PDA@ICG*, suggerendo che il sistema multistrato completo riproduce in maniera soddisfacente il comportamento osservato nel sistema modello *glass@PDA@ICG*.

La stabilità dei campioni nelle diverse fasi della preparazione è stata inoltre valutata in PBS a pH 7.4, monitorando nel tempo mediante

spettroscopia UV-Vis la variazione dell'estinzione caratteristica del sistema (**Figura 19**).

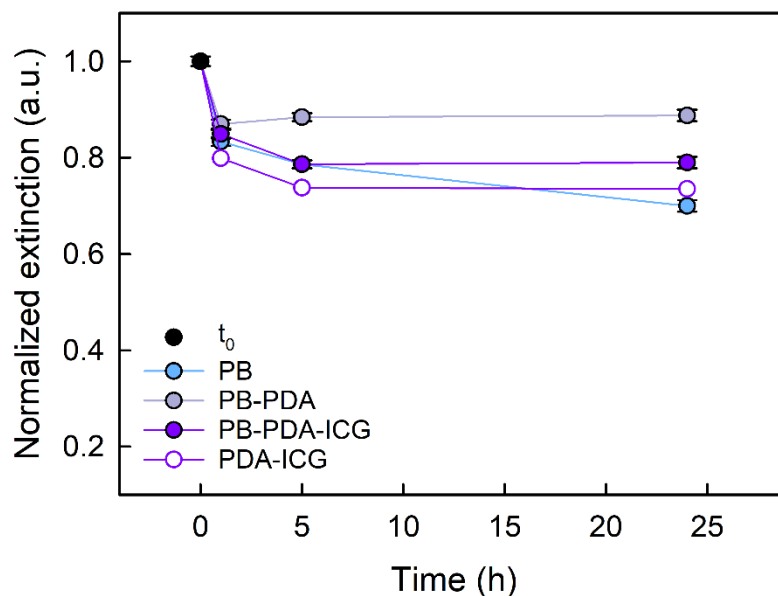


Figura 19: Valutazione della stabilità dei diversi sistemi fotoattivi in PBS a pH ~ 7.4 . I valori normalizzati di estinzione a 695 nm (glass@PDA@PBNPs), 706 nm (glass@PDA@PBNPs@PDA), 815 nm (glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG) e 835 nm (glass@PDA@ICG) sono riportati in funzione del tempo.

Tra i sistemi analizzati, i campioni glass@PDA@PBNPs hanno mostrato la diminuzione più marcata dell'estinzione. Tale comportamento è coerente con la nota instabilità delle PBNPs a pH neutro e debolmente alcalino: a $\text{pH} \geq 7$ è stata infatti riportata una progressiva degradazione del reticolo del Blu di Prussia, accompagnata dalla diminuzione della caratteristica banda di assorbimento, attribuita alla formazione di specie idrossilate a partire dai centri Fe(III) labili [21].

Al contrario, i campioni glass@PDA@PBNPs@PDA hanno mostrato una maggiore stabilità, suggerendo un possibile effetto protettivo esercitato dal secondo strato di PDA nei confronti delle PBNPs. Un aumento della stabilità del Blu di Prussia a pH neutro in seguito al rivestimento con PDA è stato precedentemente riportato in letteratura [44].

Infine, il sistema multistrato conserva circa l'80% del valore iniziale di estinzione dopo 24 ore, mostrando un comportamento comparabile a quello osservato per i campioni glass@PDA@ICG.

In **Figura 20** si trovano le immagini rappresentative dei campioni nelle diverse fasi di preparazione:

- Glass@PDA@PBNPs
- Glass@PDA@PBNPs@PDA
- Glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG

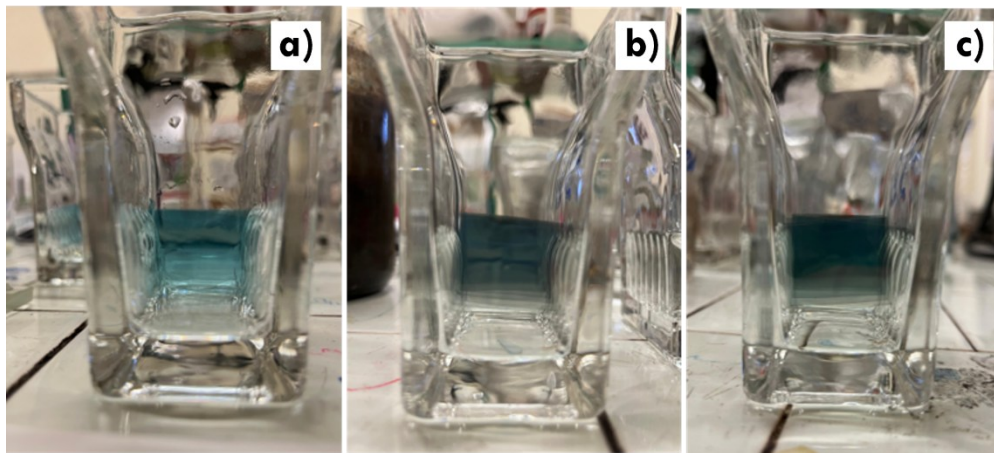


Figura 20: Immagini rappresentative dei campioni nelle diverse fasi di preparazione del sistema multistrato: a) glass@PDA@PBNPs, b) glass@PDA@PBNPs@PDA e c) glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG. La progressiva variazione della colorazione dei vetrini è qualitativamente coerente con la deposizione dei successivi strati del rivestimento.

3.3. Studio fototermico

Al fine di valutarne la risposta fototermica, i campioni sono stati irraggiati a 808 nm con un diodo laser multimodale utilizzando una potenza di irraggiamento di 250 mW (irradianza sul campione: 0.318 W/cm²). L'incremento di temperatura (**Figura 21**) monitorato di una delle diverse preparazioni dei vetri glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG è risultato essere di 32 ± 2 K.

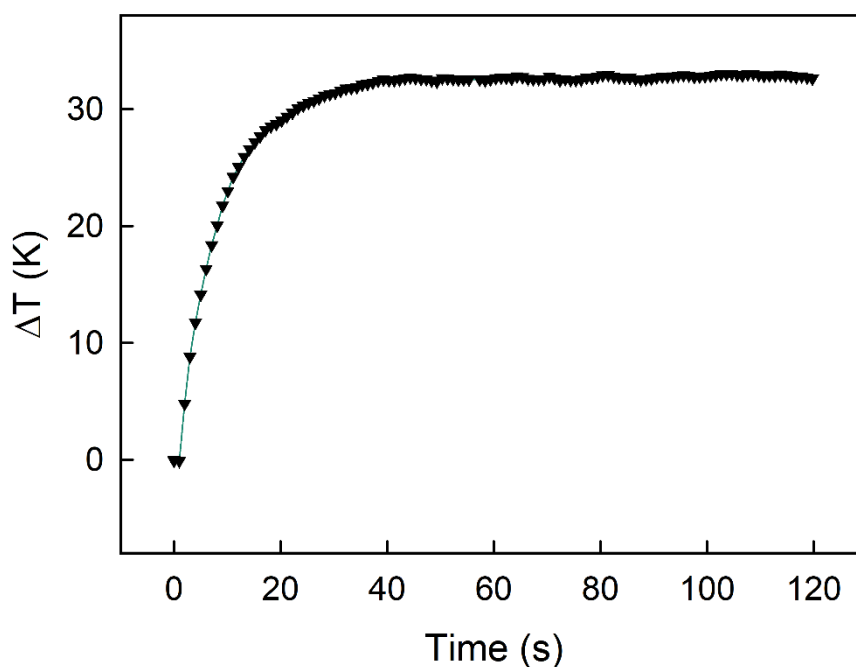


Figura 21: Termogramma rappresentativo ottenuto durante l'irraggiamento dei vetri glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG. La curva è stata ottenuta mediando le misure di 7 campioni analizzati derivanti da una delle diverse preparazioni.

È importante sottolineare che il ΔT (K) è fortemente dipendente dalla quantità di materiale depositata e/o ancorata sulla superficie, ne seguono quindi cambiamenti significativi di temperatura fra le varie sintesi.

Al fine di valutare la stabilità fototermica dei diversi sistemi, i campioni sono stati sottoposti a sei cicli consecutivi di irraggiamento NIR e raffreddamento. Come mostrato in **Figura 22**, in tutti i casi l'accensione del laser determina un rapido incremento della temperatura, seguito da un ritorno a valori prossimi a quelli iniziali durante la fase di raffreddamento. I valori massimi di ΔT (K) raggiunti nei diversi cicli risultano sostanzialmente riproducibili, senza evidenziare una progressiva diminuzione della risposta fototermica. In particolare, il sistema glass@PDA@PBNPs raggiunge incrementi di temperatura dell'ordine di circa 18–19 K, mentre l'introduzione del secondo strato di PDA porta il ΔT (K) a circa 25 ± 2 K. Il sistema multistrato completo mostra infine la risposta più elevata, raggiungendo valori di ΔT (K) di circa 32 ± 1 K. Tale

andamento è coerente con il contributo additivo dei diversi componenti fotoassorbenti presenti nel rivestimento.

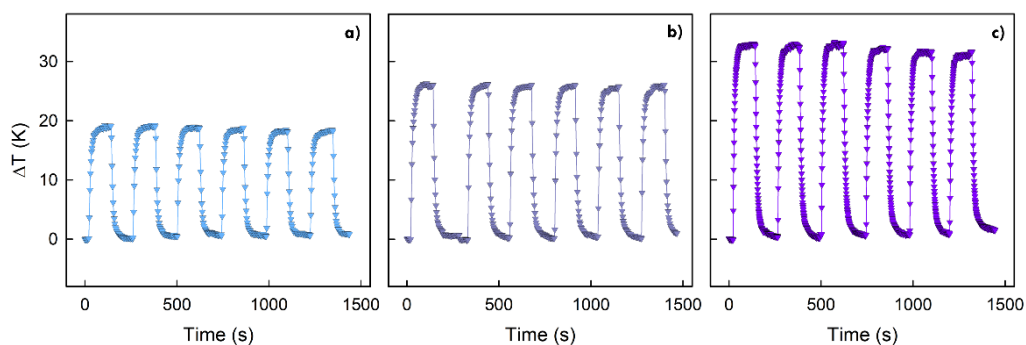


Figura 22: Cicli di irraggiamento di a) *glass@PDA@PBNPs*; b) *glass@PDA@PBNPs@PDA* e c) *glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG*.

Il confronto degli spettri UV-Vis acquisiti prima dell'irraggiamento e al termine del sesto ciclo mostra inoltre un profilo spettrale complessivamente conservato (**Figura 23**), con variazioni relativamente contenute. Analogamente, le immagini SEM (**figura 24**) registrate prima e dopo i cicli di irraggiamento non evidenziano modificazioni macroscopiche della morfologia superficiale. Nel complesso, questi risultati indicano una buona stabilità della risposta fototermica dei rivestimenti in seguito a ripetuti cicli di attivazione NIR.

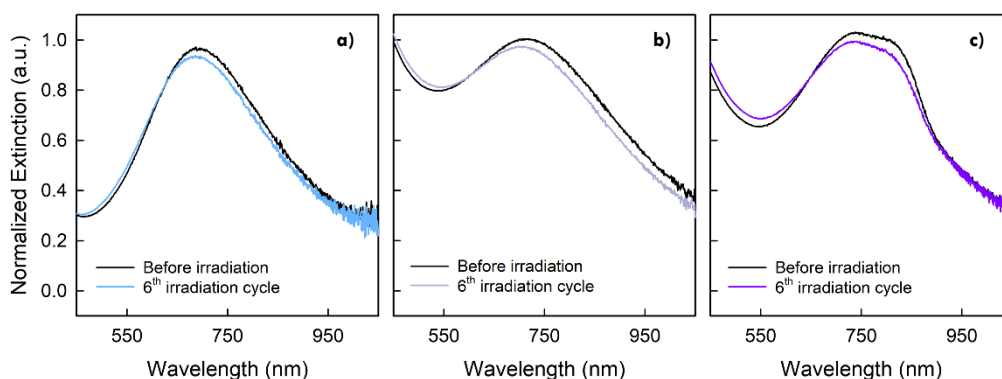


Figura 23: Spettri UV-Vis normalizzati di a) *glass@PDA@PBNPs*; b) *glass@PDA@PBNPs@PDA* e c) *glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG*.

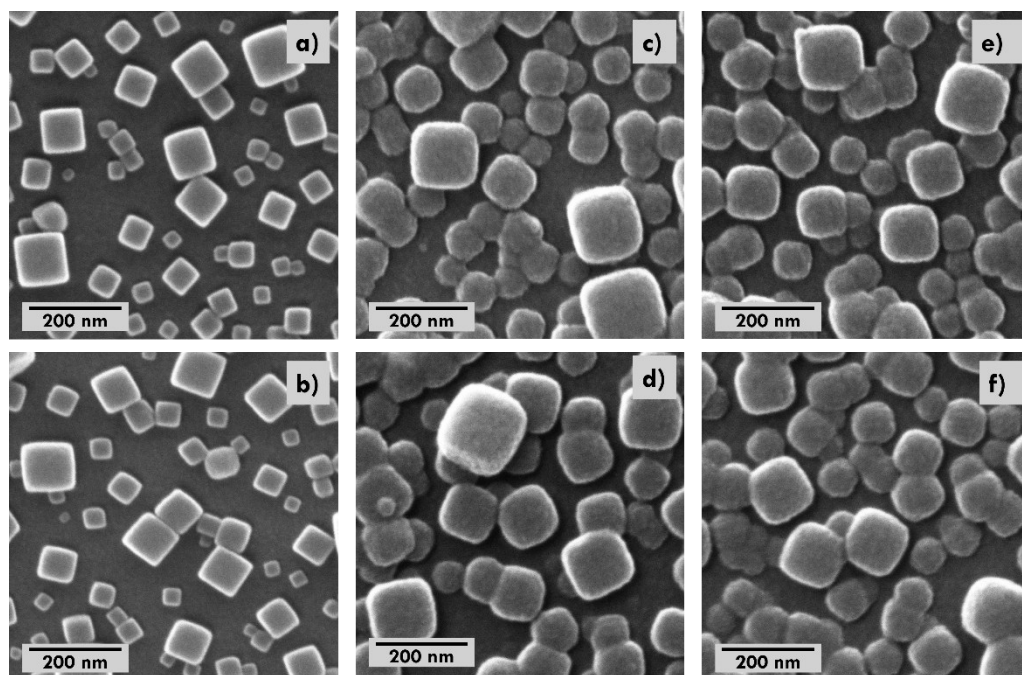


Figura 24: Immagini SEM dei campioni prima e dopo i 6 cicli di irraggiamento, rispettivamente, di a-b) glass@PDA@PBNPs; c-d) glass@PDA@PBNPs@PDA e e-f) glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG.

4. Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata preparata una superficie composita, con buona risposta fototermica, utilizzando la PDA come elemento chiave per la preparazione di questo multistrato. La PDA è stata utilizzata infatti sia come base per l'ancoraggio delle PBNPs, ottenendo così un substrato fototermico, sia come copertura delle PBNPs stesse, per essere ulteriormente funzionalizzata con ICG, ottenendo uno strato monomolecolare di quest'ultima sul secondo strato di PDA. La presenza del secondo strato di PDA e dell'ICG hanno incrementato la risposta fototermica dei campioni, portando il ΔT ottenuto durante l'irraggiamento nel NIR da 18 ± 1 K per glass@PDA@PBNPs a 32 ± 1 K per i vetri glass@PDA@PBNPs@PDA@ICG. Poiché sia la PDA che le PBNPs sono biocompatibili, questo sistema si presta alla preparazione di

superficie antibatteriche fototermiche con un possibile impiego anche in ambito medico. In tale direzione, si stanno effettuando ora studi per quantificare la produzione di ROS durante l'irraggiamento nel NIR, e saranno effettuati test antibatterici preliminari *in vitro*.

5. Bibliografia

- [1] L. Doveri, Y. A. Diaz Fernandez e G. Dacarro, «Nanomaterials for Photothermal Antimicrobial Surfaces», *ACS Omega*, vol. 9, fasc. 24, pp. 25575–25590, 2024, doi: **10.1021/acsomega.4c01449**.
- [2] H.-C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice e S. Kjelleberg, «Biofilms: an emergent form of bacterial life», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, fasc. 9, pp. 563–575, 2016, doi: **10.1038/nrmicro.2016.94**.
- [3] M. Whiteley, S. P. Diggle e E. P. Greenberg, «Bacterial quorum sensing: the progress and promise of an emerging research area», *Nature*, vol. 551, fasc. 7680, pp. 313–320, 2017, doi: **10.1038/nature24624**.
- [4] Y. Chen, Y. Gao, Y. Chen, L. Liu, A. Mo e Q. Peng, «Nanomaterials-based photothermal therapy and its potentials in antibacterial treatment», *J. Control. Release*, vol. 328, pp. 251–262, 2020, doi: **10.1016/j.jconrel.2020.08.055**.
- [5] C. Capozzi, M. Maurici e A. Panà, «Antimicrobico resistenza: è crisi globale, “un lento tsunami”», *Ig. Sanità Pubblica*, vol. 75, fasc. 6, pp. 429–450, 2019.
- [6] H. D. Marston, D. M. Dixon, J. M. Knisely, T. N. Palmore e A. S. Fauci, «Antimicrobial Resistance», *JAMA*, vol. 316, fasc. 11, pp. 1193–1204, 2016, doi: **10.1001/jama.2016.11764**.
- [7] C. E. Flynn e J. Guarner, «Emerging Antimicrobial Resistance», *Mod. Pathol.*, vol. 36, fasc. 9, 2023, doi: **10.1016/j.modpat.2023.100249**.
- [8] E.-R. Kenawy, S. D. Worley e R. Broughton, «The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review», *Biomacromolecules*, vol. 8, fasc. 5, pp. 1359–1384, 2007, doi: **10.1021/bm061150q**.
- [9] P. Pallavicini, G. Chirico e A. Taglietti, «Harvesting Light To Produce Heat: Photothermal Nanoparticles for Technological Applications and Biomedical Devices», *Chem. Eur. J.*, vol. 27, fasc. 62, pp. 15361–15374, 2021, doi: **10.1002/chem.202102123**.
- [10] X. Cui, Q. Ruan, X. Zhuo, X. Xia, J. Hu, R. Fu, Y. Li, J. Wang e H. Xu., «Photothermal Nanomaterials: A Powerful Light-to-Heat Converter»,

Chem. Rev., vol. 123, fasc. 11, pp. 6891–6952, 2023, doi: **10.1021/acs.chemrev.3c00159**.

[11] S. J. Norton e T. Vo-Dinh, «Photothermal effects of plasmonic metal nanoparticles in a fluid», J. Appl. Phys., vol. 119, fasc. 8, 2016, doi: **10.1063/1.4942623**.

[12] P. Keblinski, D. G. Cahill, A. Bodapati, C. R. Sullivan e T. A. Taton, «Limits of localized heating by electromagnetically excited nanoparticles», J. Appl. Phys., vol. 100, fasc. 5, 2006, doi: **10.1063/1.2335783**.

[13] G. Dacarro, A. Taglietti e P. Pallavicini, «Prussian Blue Nanoparticles as a Versatile Photothermal Tool», Molecules, vol. 23, fasc. 6, 2018, doi: **10.3390/molecules23061414**.

[14] M. A. Busquets e J. Estelrich, «Prussian blue nanoparticles: synthesis, surface modification, and biomedical applications», Drug Discov. Today, vol. 25, fasc. 8, pp. 1431–1443, 2020, doi: **10.1016/j.drudis.2020.05.014**.

[15] H. J. Buser, D. Schwarzenbach, W. Petter e A. Ludi, «The crystal structure of Prussian Blue: $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ », Inorg. Chem., vol. 16, fasc. 11, pp. 2704–2710, 1977, doi: **10.1021/ic50177a008**.

[16] M. Shokouhimehr, E. S. Soehnlen, J. Hao, M. Griswold, C. Flask, X. Fan, J. P. Basilion, S. Basu e S. D. Huang, «Dual purpose Prussian blue nanoparticles for cellular imaging and drug delivery: a new generation of T1-weighted MRI contrast and small molecule delivery agents», J. Mater. Chem., vol. 20, pp. 5251–5259, 2010, doi: **10.1039/B923184F**.

[17] K. Lu, X.-Y. Zhu, Y. Li e N. Gu, «Progress in the preparation of Prussian blue-based nanomaterials for biomedical applications», J. Mater. Chem. B, vol. 11, pp. 5272–5300, 2023, doi: **10.1039/D2TB02617A**.

[18] L. Ghidoni, S. Schiavi, P. Pallavicini, L. Doveri, Y. A. Diaz Fernandez, A. Taglietti e G. Dacarro, «Effect of surface Zeta potential on the deposition of inorganic nanoparticles on polydopamine (PDA) grafting layers», Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp., vol. 727, 2025, doi: **10.1016/j.colsurfa.2025.138460**.

[19] G. Dacarro, P. Grisoli, M. Borzenkov, C. Milanese, E. Fratini, G. Ferraro, A. Taglietti e P. Pallavicini, «Self-assembled monolayers of Prussian blue nanoparticles with photothermal effect», Supramol. Chem.,

vol. 29, fasc. 11, pp. 823–833, 2017, doi: **10.1080/10610278.2017.1372582**.

[20] U.S. Food and Drug Administration (FDA), «FDA Approves First New Drug Application for Treatment of Radiation Contamination due to Cesium or Thallium», 2 ott. 2003, online.

[21] L. Doveri, G. Dacarro, Y. A. Diaz Fernandez, M. Razzetti, A. Taglietti, G. Chirico, M. Collini, I. Sorzabal-Bellido, M. Esparza, C. Ortiz-de-Solorzano, X. Morales Urteaga, C. Milanese e P. Pallavicini, «Prussian Blue nanoparticles: An FDA-approved substance that may quickly degrade at physiological pH», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 227, 2023, doi: **10.1016/j.colsurfb.2023.113373**.

[22] H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller e P. B. Messersmith, «Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings», *Science*, vol. 318, fasc. 5849, pp. 426–430, 2007, doi: **10.1126/science.1147241**.

[23] Y. H. Ding, M. Floren e W. Tan, «Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization», *Biosurf. Biotribol.*, vol. 2, fasc. 4, pp. 121–136, 2016, doi: **10.1016/j.bsbt.2016.11.001**.

[24] M. L. Alfieri, T. Weil, D. Y. W. Ng e V. Ball, «Polydopamine at biological interfaces», *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 305, 2022, doi: **10.1016/j.cis.2022.102689**.

[25] F. Bernsmann, V. Ball, F. Addiego, A. Ponche, M. Michel, J. J. de Almeida Gracio, V. Toniazio e D. Ruch, «Dopamine-Melanin Film Deposition Depends on the Used Oxidant and Buffer Solution», *Langmuir*, vol. 27, fasc. 6, pp. 2819–2825, 2011, doi: **10.1021/la104981s**.

[26] Y. Fu, L. Yang, J. Zhang, J. Hu, G. Duan, X. Liu, Y. Li e Z. Gu, «Polydopamine antibacterial materials», *Mater. Horiz.*, vol. 8, fasc. 6, pp. 1618–1633, 2021, doi: **10.1039/D0MH01985B**.

[27] Z. Mahmut, C. Zhang, F. Ruan, N. Shi, X. Zhang, Y. Wang, X. Zheng, Z. Tang, B. Dong, D. Gao e J. Sun, «Medical Applications and Advancement of Near Infrared Photosensitive Indocyanine Green Molecules», *Molecules*, vol. 28, fasc. 16, 2023, doi: **10.3390/molecules28166085**.

[28] B. Chon W. Ghann, J. Uddin, B. Anvari e V. Kundra, «Indocyanine Green (ICG) Fluorescence Is Dependent on Monomer with Planar and

Twisted Structures and Inhibited by H-Aggregation», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, fasc. 17, 2023, doi: **10.3390/ijms241713030**.

[29] H. Fan, Y. Fan, W. Du, R. Cai, X. Gao, X. Liu, H. Wang, L. Wang e X. Wu, «Enhanced type I photoreaction of indocyanine green via electrostatic-force-driven aggregation», *Nanoscale*, vol. 12, pp. 9517–9523, 2020, doi: **10.1039/D0NR01208D**.

[30] E. Engel, R. Schraml, T. Maisch, K. Kobuch, B. König, R.-M. Szeimies, J. Hillenkamp, W. Bäuml e R. Vasold, «Light-induced decomposition of indocyanine green», *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, fasc. 5, pp. 1777–1783, 2008, doi: **10.1167/iovs.07-0911**.

[31] J. S. Díaz Tovar, G. Kassab, N. M. Inada, V. S. Bagnato e C. Kurachi, «Photobleaching Kinetics and Effect of Solvent in the Photophysical Properties of Indocyanine Green for Photodynamic Therapy», *ChemPhysChem*, vol. 24, 2023, doi: **10.1002/cphc.202300381**.

[32] D. Atta, A. Elarif e M. Al Bahrawy, «Reactive oxygen species creation by laser-irradiated indocyanine green as photodynamic therapy modality: an in vitro study», *Lasers Med. Sci.*, vol. 38, 2023, doi: **10.1007/s10103-023-03876-1**.

[33] N. Topaloglu, M. Gulsoy e S. Yuksel, «Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser», *Photomed. Laser Surg.*, vol. 31, fasc. 4, pp. 155–162, 2013, doi: **10.1089/pho.2012.3430**.

[34] M. B. Robin, «The Color and Electronic Configurations of Prussian Blue», *Inorg. Chem.*, vol. 1, fasc. 2, pp. 337–342, 1962, doi: **10.1021/ic50002a028**.

[35] F. Bernsmann, O. Ersen, J.-C. Voegel, E. Jan, N. A. Kotov e V. Ball, «Melanin-Containing Films: Growth from Dopamine Solutions versus Layer-by-Layer Deposition», *ChemPhysChem*, vol. 11, fasc. 15, pp. 3299–3305, 2010, doi: **10.1002/cphc.201000384**.

[36] T. Uemura, M. Ohba e S. Kitagawa, «Size and Surface Effects of Prussian Blue Nanoparticles Protected by Organic Polymers», *Inorg. Chem.*, vol. 43, fasc. 23, pp. 7339–7345, 2004, doi: **10.1021/ic0488435**.

[37] S. Schiavi, A. Taglietti, P. Galinetto, B. Albini e O. Prakash, «Polydopamine-coated flat glass surfaces for nanoplastics uptake and

Raman-based detection: a case study with polystyrene», *Nanoscale*, vol. 17, pp. 26855–26867, 2025, doi: **10.1039/D5NR02834E**.

[38] Q.-V. Le, S. Kang, J. Lee, H. Park, J. G. Sun, J. Lee e G. Shim, «Size-Dependent Effect of Indocyanine Green Nanoimaging Agent for Metastatic Lymph Node Detection», *Biomater. Res.*, vol. 28, 2024, doi: **10.34133/bmr.0022**.

[39] M. Millard, Y. Bernhard, N. Canilho, S. Grandemange, S. Parant, M. Mourer, H.-P. Lassalle e A. Pasc, «Enhanced stability and photothermal efficiency of Indocyanine Green J-aggregates by nanoformulation with Calix[4]arene for photothermal therapy of cancers», *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 230, 2023, doi: **10.1016/j.colsurfb.2023.113516**.

[40] C. Haritoglou, W. Freyer, S. G. Priglinger e A. Kampik, «Light absorbing properties of indocyanine green (ICG) in solution and after adsorption to the retinal surface: an ex-vivo approach», *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 244, fasc. 9, pp. 1196–1202, 2006, doi: **10.1007/s00417-005-0216-z**.

[41] P. Pallavicini, G. Dacarro, M. Galli e M. Patrini, «Spectroscopic evaluation of surface functionalization efficiency in the preparation of mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on glass», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 332, pp. 432–438, 2009, doi: **10.1016/j.jcis.2008.12.063**.

[42] A. Krasnoslobodtsev e S. Smirnov, «Surface assisted intermolecular interactions in self-assembled coumarin submonolayers», *Langmuir*, vol. 17, pp. 7593–7599, 2001, doi: **10.1021/la0111295**.

[44] B. Gao, L. Su, H. Yang, T. Shu e X. Zhang, «Current control by electrode coatings formed by polymerization of dopamine at Prussian blue-modified electrodes», *Analyst*, vol. 141, fasc. 6, pp. 2067–2071, 2016, doi: **10.1039/C6AN00132G**.