

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

**Azione antibatterica di superfici funzionalizzate
con nanoparticelle di blu di Prussia e di argento**

Relatore: Chiar.mo Prof. Pietro Grisoli

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Letizia Pasini

Anno Accademico 2024/2025

INDICE

1. RIASSUNTO ANALITICO	1
2. INTRODUZIONE	2
2.1. Infezioni correlate all'assistenza sanitaria (ICA) e nosocomiali	2
2.2. Il biofilm batterico	4
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.3.1. Caratteristiche e morfologia	8
2.3.2. Isolamento ed identificazione.....	9
2.3.3. Epidemiologia e patogenesi	11
2.3.4. Fattori di virulenza	13
2.3.5. Terapia ed antibiotico-resistenza.....	14
2.3.6. <i>P. aeruginosa</i> ed infezioni nosocomiali.....	15
2.3.7. Metodi di immunizzazione.....	16
2.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
2.4.1. Caratteristiche e morfologia	17
2.4.2. Isolamento ed identificazione.....	20
2.4.3. Epidemiologia e patogenesi	22
2.4.4. Fattori di virulenza	24
2.4.5. Terapia ed antibiotico-resistenza.....	26
2.4.6. <i>S. epidermidis</i> ed infezioni nosocomiali	27
2.5. Le nanoparticelle: definizione e caratteristiche	29
2.6. Blu di Prussia	31
2.6.1. Storia e caratteristiche del materiale	31
2.6.2. Sintesi PBNPs: accenni	34
2.6.3. Effetto fototermico delle PBNPs.....	36

2.7. Argento	37
2.7.1. Storia e caratteristiche del materiale	37
2.7.2. Argento come agente antimicrobico: una storia di secoli	38
2.7.3. AgNPs: nanomedicina e applicazioni	40
2.7.4. Sintesi AgNPs: accenni	42
2.7.5. Effetto antimicrobico: meccanismo d'azione delle AgNPs	44
2.7.6. LPS ed effetto fototermico	49
2.7.7. L'attività dell'argento contro i virus: focus SARS-CoV-2	50
3. PREMESSA ALLA PARTE SPERIMENTALE	55
4. MATERIALI E METODI	57
4.1. Sintesi delle nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs)	57
4.2. Sintesi della nanoparticelle di argento (AgNPs).....	60
4.3. Preparazione dei campioni.....	60
4.3.1. Preparazione dei monostrati auto-assemblati PEI-silano	61
4.3.2. Innesto delle PBNPs sui PEI-SAMs.....	62
4.3.3. Addizione del rivestimento siliceo	63
4.3.4. Addizione dei PEI-silano SAMs sul rivestimento siliceo	63
4.3.5. Innesto delle AgNPs.....	64
4.3.6. Determinazione del contenuto totale di ferro (Fe) e argento (Ag) sui vetri funzionalizzati	64
4.4. Determinazione dell'effetto microbica (ME)	65
4.5. Determinazione dell'effetto microbica fototermico (PME)	68
4.6. Appendice tecnica: materiali e strumenti utilizzati.....	70
4.6.1. Materiali e strumenti utilizzati nella sintesi chimica.....	70
4.6.2. Materiali e strumenti utilizzati nella valutazione microbiologica.....	72
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	74

5.1. Scelta della strategia di funzionalizzazione	74
5.2. Caratterizzazione dei singoli steps sintetici	75
5.2.3. Analisi del contenuto totale di ferro ed argento nei campioni	78
5.2.4. Valutazione SEM degli steps sintetici più critici	79
5.2.5. Effetto fototermico	82
5.3. Valutazione dell'attività antibatterica	83
5.3.1. Il valore di riferimento CEN	85
5.3.2. Risultati ME	86
5.3.3. Risultati PME	89
5.3.4. Risultati complessivi <i>Staphylococcus epidermidis</i>	94
5.3.5. Risultati complessivi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97
6. CONCLUSIONI	100
7. BIBLIOGRAFIA	102
8. RINGRAZIAMENTI	110

1. RIASSUNTO ANALITICO

Nel contesto dell'aumento delle infezioni nosocomiali e della crescente antibiotico-resistenza, lo studio ha avuto come obiettivo la valutazione dell'effetto antimicrobico di materiali innovativi destinati a impianti, protesi, dispositivi medici e materiale chirurgico, con l'intento di individuare soluzioni efficaci per limitarne l'insorgenza. Il materiale oggetto di analisi consiste in superfici silicee derivatizzate con polietilenimina, su cui è stato auto-assemblato un monostrato di nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) e di nanoparticelle di argento (AgNPs). La sintesi è stata realizzata tramite un approccio "strato per strato", in cui il rivestimento intermedio siliceo, è risultato funzionale alla protezione delle PBNPs e alla loro possibile ed indesiderata interazione con le nanoparticelle di argento. L'attività antimicrobica è stata testata nei confronti di due ceppi batterici, rappresentativi, dei Gram-negativi (*Pseudomonas aeruginosa*) e dei Gram-positivi (*Staphylococcus epidermidis*). Per la modalità a contatto diretto, i batteri sono stati incubati con i campioni per 5 e 24 ore e la carica microbica residua è stata quantificata mediante conteggio delle unità formanti colonia (UFC/mL). Per la modalità fototermica, i campioni sono stati esposti per 30 minuti a radiazione nel vicino infrarosso ($\lambda = 808 \text{ nm}$, 200 mW corrispondenti a $0,26 \text{ W/cm}^2$) al fine di attivare le PBNPs. Successivamente la carica batterica è stata nuovamente determinata tramite UFC/mL. I risultati hanno evidenziato che, nella condizione di contatto diretto, l'azione antimicrobica si è rivelata più marcata su *P. aeruginosa*, in linea con la maggiore suscettibilità dei Gram-negativi all'azione microbica dell'argento, e che i campioni contenenti sia PBNPs sia AgNPs hanno mostrato un'efficacia superiore rispetto a quelli con sole PBNPs. Nel caso dell'irraggiamento NIR, i vetrini con PBNPs avendo beneficiato in modo significativo dell'effetto fototermico, presentano un potenziamento

dell'attività microbica, rispetto al solo contatto, mentre nei campioni contenenti anche AgNPs il contatto prolungato ha fornito un risultato di gran lunga superiore all'irraggiamento. Complessivamente, tali dati suggeriscono che la combinazione di blu di Prussia e argento rappresenta una strategia promettente per la prevenzione delle infezioni associate ai dispositivi medici, con un'efficacia maggiore nei confronti dei patogeni Gram-negativi.

2. INTRODUZIONE

2.1. Infezioni correlate all'assistenza sanitaria (ICA) e nosocomiali

Il termine ICA indica le infezioni contratte dai pazienti durante l'assistenza sanitaria in ospedale, in ambiente domestico, in caso di assistenza domiciliare, in residenze sanitarie assistenziali (RSA) ed in strutture diverse dove vengono erogate cure mediche. In questa categoria rientra il sottogruppo delle infezioni nosocomiali, ovvero le infezioni contratte durante la degenza ospedaliera e non in corso prima del ricovero, causate da microrganismi patogeni e/o patogeni opportunisti. Queste possono presentarsi tipicamente dopo 48 ore dall'ingresso in ospedale, fino a 3 giorni dopo la dimissione del paziente e fino a 30 giorni dopo l'esecuzione di un intervento chirurgico. L'European Center for Disease, Prevention and Control (ECDC) ha dichiarato che in Europa, ogni anno, sono circa 2 milioni i cittadini che contraggono infezioni nosocomiali e che mediamente il 2% di questi va incontro ad esito fatale. La penisola italiana invece, sebbene non sia dotata di un vero e proprio sistema di sorveglianza nazionale per la valutazione della prevalenza delle infezioni ospedaliere, registra annualmente, tramite la conduzione di studi multicentrici, un totale di circa 400.000 pazienti affetti da ICA. L'antibiotico-resistenza è una delle cause principali di questo scenario nazionale ed

europeo e nel novembre 2024 l'Agenzia Italia del Farmaco (AIFA) ha pubblicato un dossier dove ha dichiarato che l'antibiotico-resistenza (AMR) diventerà la prima causa di morte in Italia nel 2050, superando i tumori (1). Tali problematiche riguardano sia i pazienti ricoverati, sia gli operatori sanitari soggetti ad un elevato rischio occupazionale, sia gli amministratori che devono fronteggiare elevate spese gestionali. I patogeni in grado di causare infezioni nosocomiali sono innumerevoli e variano in relazione alle diverse popolazioni di pazienti; quelli che si riscontrano più frequentemente sono: batteri appartenenti all'*Enterobacteriaceae* tra cui *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococchi, *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) e stafilococchi coagulasi negativi (CNS) (2). *Escherichia coli* ed enterococchi sono i principali agenti eziologici delle infezioni delle vie urinarie, mentre *Staphylococcus aureus* è più frequentemente coinvolto nelle infezioni delle ferite chirurgiche. *Pseudomonas aeruginosa*, invece, è comunemente isolato nei casi di infezioni respiratorie. Le infezioni nosocomiali più comuni includono batteriemie, infezioni delle vie respiratorie (IVR), infezioni del sito chirurgico (ISC), infezioni delle vie urinarie (IVU) ed infezioni correlate a cateteri intravascolari centrali (CIC). Queste ultime sono tra le più critiche, soprattutto in relazione al crescente utilizzo di dispositivi protesici come protesi vascolari, cardiache, ortopediche, cateteri per emodialisi e dialisi peritoneale, nonché dispositivi intrauterini. Il rischio di infezione aumenta proporzionalmente con la diffusione di questi impianti, che possono infettarsi sia poco dopo il posizionamento, sia a distanza di tempo. Nella maggior parte dei casi, il sito di inserimento del catetere rappresenta il punto di origine dell'infezione, e spesso la rimozione dell'impianto risulta necessaria per la guarigione del paziente. Per contrastare queste problematiche, la ricerca si è orientata, negli ultimi anni, verso lo sviluppo di materiali biocompatibili innovativi. Il principale obiettivo consiste

nella realizzazione di dispositivi refrattari all'adesione microbica, costituiti da biomateriali le cui superfici sono modificate con sostanze in grado di ritardare e/o eliminare la colonizzazione da parte di microrganismi (3). Nonostante l'introduzione di nuovi materiali biocompatibili, le complicate infettive restano un problema rilevante, soprattutto a causa di microrganismi capaci di colonizzare le superfici attraverso la formazione di biofilm batterici. Queste strutture proteggono i batteri dagli antibiotici e dai disinfettanti, rendendo le infezioni particolarmente difficili da eradicare.

2.2. Il biofilm batterico

Il biofilm batterico è una biocenosi microbica consorziata, ovvero un consorzio di microrganismi circondati ed uniti da una matrice extracellulare autoprodotta di natura polisaccaridica (Figura 1). Le specie microbiche che danno luogo alla formazione di biofilm producono in misura maggiore o minore, a seconda dei ceppi e delle condizioni ambientali, sostanze polimeriche esocellulari lasse note come *slime* o più compatte e strutturate indicate come glicocalice. Il biofilm non è una struttura a carattere continuo a causa della presenza di spazi interstiziali e canali acquosi che permettono il passaggio di fluido, la cui funzione è quella di apportare sostanze nutritive al batterio e rimuovere eventuali prodotti di scarto. La composizione e struttura di un biofilm maturo varia con la localizzazione, la natura dei microrganismi costituenti e la disponibilità nell'ambiente di sostanze nutritive. In generale si distinguono due diverse parti costituenti: l'EPS (Extracellular Polymeric Substances), *slime* o glicocalice, che rappresenta l'80% del peso totale del biofilm, e i microrganismi. L'EPS è una matrice gelatinosa costituita da acqua (97%), polisaccaridi neutri o polianionici (1-2%), glicoproteine prodotte da lisi cellulare

ed enzimi (< 1-2%), sali e ioni in forma libera (< 1%), DNA extracellulare (eDNA) e RNA prodotti da lisi cellulare (< 1%), lipidi (< 1%), (4) (5) e cellule morte (6).

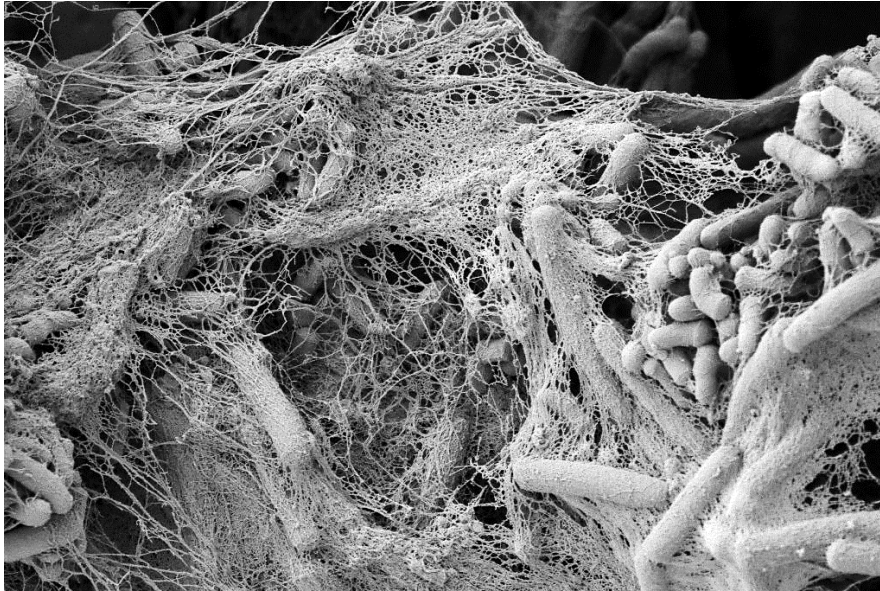


Figura 1: Biofilm batterico. Immagine ottenuta tramite microscopio elettronico a scansione (SEM) per conto dell'azienda Zeiss. Data: 10 agosto 2022.

La formazione del biofilm è suddivisa in 4 fasi principali (Figura 2): la prima fase dura da pochi secondi, con l'adsorbimento reversibile dei microrganismi al supporto solido, a qualche minuto con l'adesione permanente degli stessi alla superficie. La seconda fase è costituita dalla colonizzazione che avviene entro 12 - 48h e che consiste nella crescita microbica con autoproduzione della matrice extracellulare polisaccaridica. Fondamentale è il *quorum sensing* ovvero un sistema di regolazione trascrizionale, basato sul rilascio di molecole segnale, che batteri della stessa specie adottano per comunicare tra loro quando raggiungono una certa densità cellulare. Le molecole segnale attivano determinati geni che sono preposti a funzioni metaboliche precise. In ultimo, la terza e la quarta fase consistono nella maturazione del biofilm, con formazione di strati multipli, e nella

dispersione di batteri planctonici e di aggregati microbici nell'ambiente, che fungono da inoculo per nuovi siti di colonizzazione.

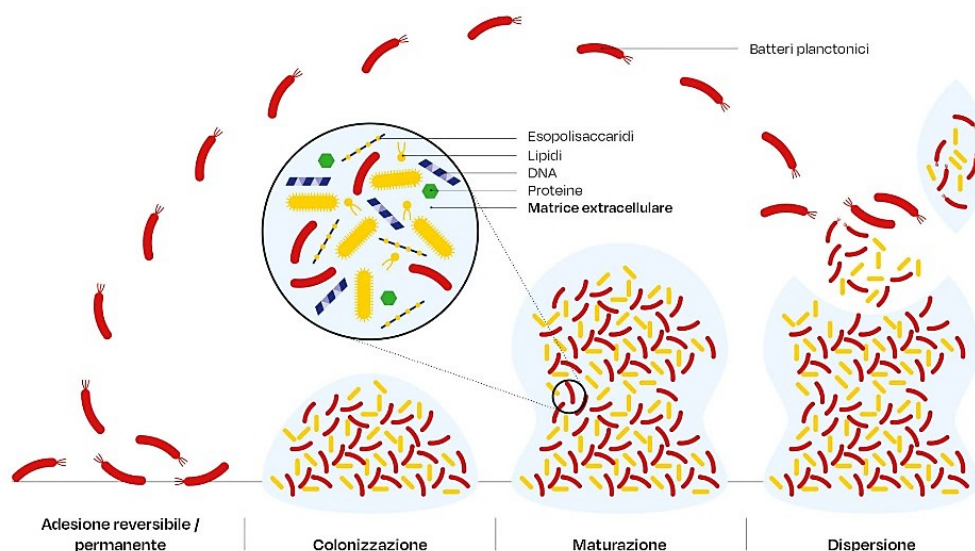


Figura 2: schema delle quattro fasi principali di formazione del biofilm batterico. Crediti immagine: Rivista Italiana Igiene Dentale.

Come accennato nel paragrafo 2.1., i biofilm rappresentano una delle principali cause di infezioni microbiche nosocomiali. Secondo una recente stima dei Centers for Disease Control and Prevention (CDC) degli Stati Uniti, circa il 65% delle infezioni ospedaliere diagnosticate nei Paesi industrializzati è attribuibile alla presenza di biofilm. Questa elevata incidenza è strettamente legata al crescente utilizzo, in ambito clinico, di dispositivi medici a scopo diagnostico o terapeutico, in particolare quelli impiantabili. L'introduzione di tali dispositivi all'interno dell'organismo ne espone le superfici alla deposizione di proteine e materiale organico da parte dell'ospite, creando un ambiente favorevole alla colonizzazione da parte dei microrganismi. (7). Le infezioni da biofilm tendono a svilupparsi principalmente su superfici inerti, come dispositivi medici e residui di tessuti necrotici o frammenti ossei in necrosi. Tuttavia, possono insediarsi anche su tessuti vivi, dando origine a patologie gravi, come le endocarditi. All'interno dei biofilm,

la penetrazione degli antibiotici risulta ostacolata e rallentata a causa della barriera costituita dalla matrice esopolisaccaridica, che limita l'efficacia dei farmaci. Questo fenomeno favorisce lo sviluppo di tolleranza agli antibiotici, aggravata dalla presenza di cataboliti microbici in grado di interagire con i principi attivi, neutralizzandone l'azione. Nonostante ciò, in molti casi il trattamento antibiotico riesce comunque a rallentare la formazione del biofilm, soprattutto eliminando le cellule batteriche in fase planctonica (8). Sono quindi state sviluppate diverse strategie per impedire l'adesione iniziale delle cellule planctoniche e la loro successiva trasformazione in cellule sessili, caratterizzate da una maggiore capacità di colonizzazione. Per contrastare la formazione del biofilm microbico, sono stati progettati nuovi materiali destinati alla realizzazione di dispositivi medici impiantabili, in grado di incorporare agenti antimicrobici sia nella matrice che sulla superficie. Negli ultimi decenni, si è registrato un notevole impegno nella produzione di materiali dotati di rivestimenti antibatterici: tra questi, alcuni rilasciano ioni di argento, altri prevedono un rilascio controllato di antibiotici, mentre altri ancora presentano superfici con proprietà intrinseche capaci di inibire l'adesione e la proliferazione microbica (8) (9). È ormai ampiamente riconosciuto che, a causa dell'insorgenza di fenomeni di resistenza, l'uso degli antibiotici a scopo profilattico debba essere evitato, limitandone l'impiego esclusivamente al trattamento terapeutico. Inoltre, è stato dimostrato che anche i disinfettanti possono favorire lo sviluppo di resistenza verso sostanze antimicrobiche comunemente utilizzate. Di conseguenza, diventa fondamentale individuare metodi alternativi per la funzionalizzazione delle superfici dei dispositivi, impiegando agenti microbicidi efficaci che non inducano resistenza. In quest'ottica, argento e rame si profilano come candidati ideali (10).

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

2.3.1. Caratteristiche e morfologia

Pseudomonas aeruginosa è un batterio Gram-negativo, aerobio stretto, asporigeno, acido-resistente ed ubiquitario, ovvero comunemente presente nell'ambiente. Presenta una forma bastoncellare diritta o leggermente curva ed è dotato di un singolo flagello polare che gli consente di muoversi (Figura 3). Nella struttura morfologica, il microrganismo presenta dei pili di tipo IV che gli permettono l'adesione alle superfici e gli conferiscono un particolare movimento cellulare detto *twitching* o movimento a scatto.

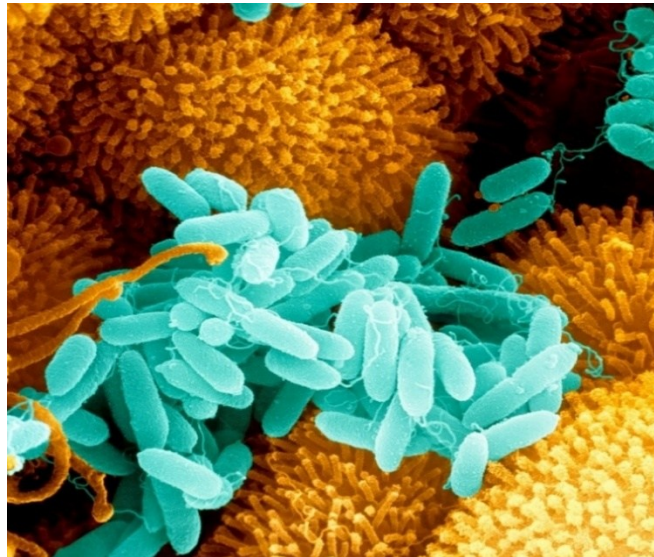


Figura 3: *Pseudomonas aeruginosa*. Immagine acquisita tramite l'utilizzo di microscopio elettronico a scansione (SEM) del microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* prelevato dalle cellule cigliate dell'epitelio nasale umano. Crediti: Juergen Berger. Archivio fotografico: Science photo library.

La parete cellulare e le membrane (Figura 4) sono simili a quelle di altri batteri Gram-negativi, sebbene prive di porine trimeriche tipiche degli enterobatteri (11). *Pseudomonas aeruginosa* è un batterio saprofita ambientale e patogeno delle piante. È in grado di metabolizzare i carboidrati attraverso vie ossidative e non fermentative ed è catalasi- ed ossidasi-positivo.

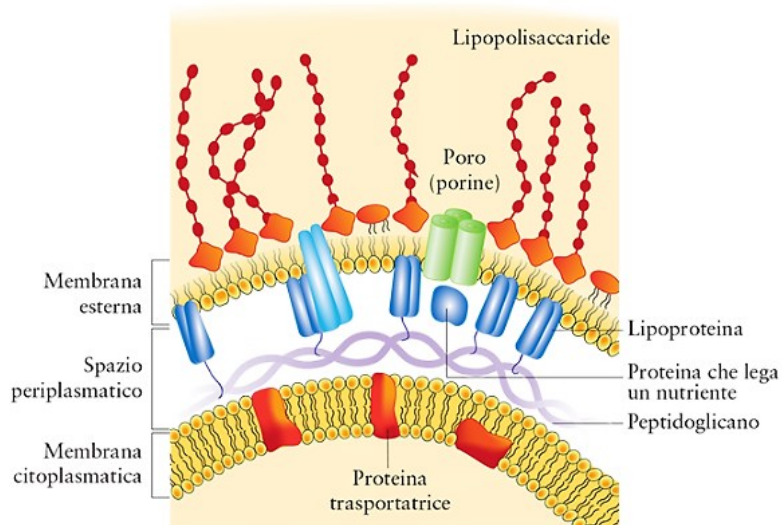


Figura 4: parete cellulare dei batteri Gram-negativi. Crediti e proprietà immagine: libro di testo Microbiologia Farmaceutica; N. Carlone, R. Pompei, V. Tullio; III edizione, anno 2021.

2.3.2. Isolamento ed identificazione

Pseudomonas aeruginosa cresce in terreni di coltura comuni come Tryptic Soy Agar (TSA), MacConkey agar e agar sangue a valori di temperatura compresi tra i 5 e i 42°C. Il terreno di coltura selettivo e differenziale denominato Cetrimide agar è utilizzato quando il batterio deve essere isolato ed identificato in campioni polimicrobici, ovvero che contengono più tipologie microbiche. Le colonie di *Pseudomonas aeruginosa* possono essere di morfologia varia: piccole e circolari, irregolari, coliformi-simili, dalla superficie opaca o rugosa. Anche la pigmentazione delle stesse varia in relazione ai pigmenti che il microrganismo è in grado di produrre e al terreno di coltura utilizzato. Le colonie possono assumere un colore verde-blu (Figura 5) se il pigmento prodotto è la piocianina, la cui struttura chimica è sotto riportata (Figura 6), fluorescente per la presenza di pioverdina (Figura 7), rosso per la produzione di piorubina ed infine nera se il microrganismo sintetizza piomelanina (11). Anticamente questo batterio era denominato *Bacillus pyocyaneus* in riferimento al colore blu osservato dall'essudato di

pazienti infetti. Nel XX secolo è stato modificato a *Pseudomonas aeruginosa* dal latino “*aeruginosus*” che significa “arrugginito”, con riferimento al colore verde-blauastro dell’ottone ossidato.



Figura 5: colonie verdi-blu di *Pseudomonas aeruginosa* dovute alla produzione del pigmento piocianina. Crediti: Daniela Beckmann.

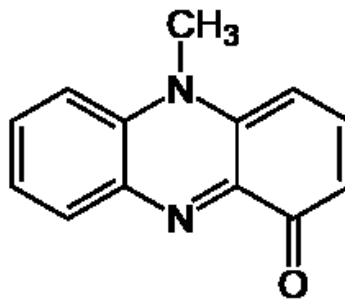


Figura 6: struttura chimica del pigmento piocianina, responsabile della colorazione verde-blu delle colonie del batterio *Pseudomonas aeruginosa*.

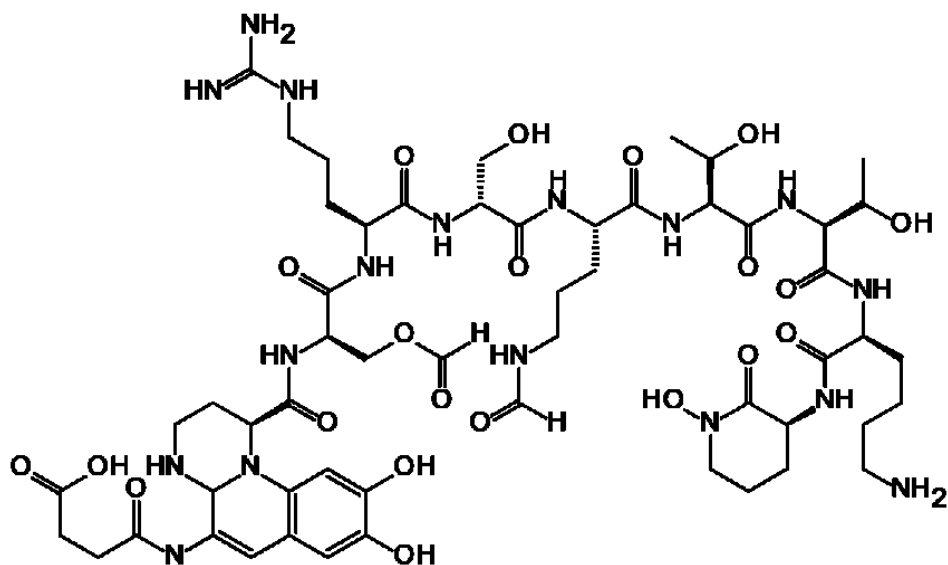


Figura 7: struttura chimica del pigmento pioverdina, siderofo, responsabile della colorazione fluorescente delle colonie del batterio *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3.3. Epidemiologia e patogenesi

Pseudomonas aeruginosa è un batterio patogeno opportunista che, in particolari condizioni predisponenti, come la presenza nei pazienti di impianti o dispositivi medici o condizioni di deficit immunitari dati da patologie quali cancro, fibrosi cistica, ustioni o traumi, è in grado di indurre infezioni. La sua ubiquitarietà, soprattutto in ambiente ospedaliero, unita a fenomeni sempre più emergenti di antibiotico-resistenza, rappresentano un problema nosocomiale per la società. Le patologie maggiormente riscontrate sono otiti, polmoniti, meningiti, osteomieliti, cheratiti ulcerose ed infezioni a carico della cute e delle vie urinarie. *Pseudomonas aeruginosa* è in grado di sviluppare biofilm, una biocenosi microbica consorziata, ovvero un consorzio di microrganismi circondati ed uniti da una matrice extracellulare di natura polisaccaridica (Figura 8). Questo fattore di virulenza predispone il batterio all'adesione e alla colonizzazione di

dispositivi medici, impianti protesici, cateteri, materiale chirurgico e materiale destinato all'intubazione di pazienti (11).

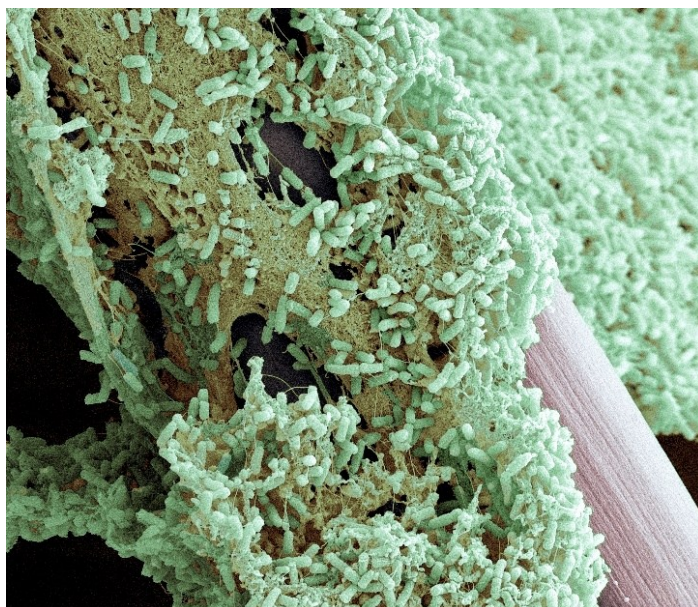


Figura 8: Biofilm di Pseudomonas aeruginosa. Immagine acquisita tramite l'utilizzo di microscopio elettronico a scansione (SEM). Crediti immagine ed archivio fotografico: Science photo library.

P. aeruginosa è un importante patogeno nei pazienti con immunodeficienza sia primaria che acquisita. È stata infatti definita la causa più comunemente identificata di setticemia in una coorte di pazienti con immunodeficienza primaria. Il microrganismo è anche un'importante causa di batteriemia nei pazienti con leucemia acuta, rappresentando il 14-21% degli episodi batteriemici in questa popolazione di pazienti (12). L'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* può causare una vasta gamma di disturbi che interessano diversi sistemi corporei: tra questi, problemi respiratori come la polmonite; affezioni del sistema nervoso centrale, inclusi ascessi cerebrali e meningiti; infezioni all'orecchio, come le otiti; patologie oculari quali cheratite batterica ed endoftalmite; coinvolgimento di ossa e articolazioni con osteomielite; disturbi gastrointestinali quali enterite,

enterocolite e diarrea; infezioni delle vie urinarie; manifestazioni cutanee come l'ectima gangrenoso; nonché batteriemia ed endocardite. La sintomatologia associata a queste infezioni varia dipendentemente dall'organo coinvolto (13). L'acronimo E.S.K.A.P.E. è stato coniato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) con riferimento ai sei microrganismi maggiormente responsabili di infezioni correlate all'assistenza sanitaria (ICA) e nosocomiali, quali *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter spp.*

2.3.4. Fattori di virulenza

I fattori di virulenza che concorrono alla patogenicità di *Pseudomonas aeruginosa* possono essere distinti in due diverse categorie: fattori di virulenza associati alla struttura del batterio e fattori di virulenza secreti dal batterio. La prima categoria comprende i flagelli e pili di tipo IV che consentono al microrganismo l'adesione alle superfici e il movimento, la capsula batterica costituita da alginato, un polimero di acido β -D-mannuronico e α -L-guluronico e il lipopolisaccaride (LPS), il cui lipide A presente nella struttura, è caratterizzato da un grado di tossicità minore rispetto ad altri enterobatteri (e.g. *E. coli*). Nel tratto respiratorio dell'essere umano aGM1 (asialoganglioside-GM1), è un bersaglio per il legame alla superficie delle cellule epiteliali (12). Inoltre, il lipopolisaccaride (LPS) attraverso il legame con aGM1 svolge un ruolo nell'adesione batterica. L'adesione reversibile alle cellule epiteliali è il primo passaggio nella colonizzazione dell'epitelio respiratorio e quello più critico. Una volta avvenuto il contatto con la cellula, viene attivato il sistema di secrezione di tipo III, uno dei principali determinanti della virulenza. Il sistema di secrezione di tipo III consente a *Pseudomonas aeruginosa* di iniettare le tossine, secrete attraverso un apparato simile ad una siringa,

direttamente nel citoplasma. Sono note quattro proteine effettrici: ExoY, ExoS, ExoT ed ExoU e tutte partecipano, a vari livelli, alla citotossicità del batterio. Altri fattori di virulenza secreti tramite il sistema di secrezione di tipo II nello spazio extracellulare sono l'elastasi, la fosfatasi alcalina, l'esotossina A e la fosfolipasi C, le quali partecipano anche allo sviluppo della colonizzazione, distruggendo il glicocalice protettivo dell'epitelio respiratorio ed esponendo i ligandi epiteliali al batterio (14). La seconda categoria quindi, comprende tutte le sostanze sopra citate e secrete dal batterio come l'esotossina A, che inibisce la sintesi proteica, e l'esotossina S, che agisce sulle proteine del citoscheletro, le proteasi e le emolisine ed i siderofori come la ferribactina e la piochelina, sostanze organiche che permettono, grazie ad un meccanismo di chelazione del ferro, la sopravvivenza e la crescita del microrganismo, anche in caso di carenza dello stesso. Il ferro infatti è fondamentale a *Pseudomonas aeruginosa* per la corretta formazione del biofilm: il microrganismo dunque produce siderofori che, con meccanismo competitivo nei confronti delle transferrine, gli consentono l'acquisizione del prezioso ione. La piocianina (Figura 6), insieme al suo derivato 1-idrossi-fenazina, e la pioverdina (Figura 7) sono pigmenti prodotti dal batterio e fattori di virulenza: la piocianina e il derivato inattivano gli enzimi presenti nei mitocondri delle cellule dei mammiferi ed impediscono alle cellule cigliate degli epitelii delle vie aeree di compiere il caratteristico movimento ondulatorio, mentre la pioverdina è un fattore di virulenza perché è una sostanza siderofora (11).

2.3.5. Terapia ed antibiotico-resistenza

Come accennato nel paragrafo 2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa* rappresenta, insieme ad altri microrganismi, un problema sanitario, a causa di una sempre più spiccata antibiotico-

resistenza che predispone un crescente numero di pazienti ad infezioni nosocomiali, difficilmente curabili e talvolta dagli esiti infausti. Il microrganismo è in grado di svilupparla verso categorie di antibiotici aventi meccanismo d'azione diverso come nel caso di tetracicline e macrolidi, che agiscono sulla sintesi proteica del batterio, e penicilline, aventi attività inibitoria nei confronti della sintesi del peptidoglicano, costituente importante della parete batterica. Sono stati registrati anche casi di resistenza nei confronti di sulfamidici e cefalosporine. La terapia di prima scelta vede l'utilizzo di antibiotici ancora efficaci, quali ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem e ciprofloxacina. La terapia combinata di piperacillina e tobramicina è utilizzata in caso di ceppi multiresistenti a più farmaci (11).

2.3.6. *P. aeruginosa* ed infezioni nosocomiali

P. aeruginosa, generalmente, provoca infezioni opportunistiche associate a condizioni predisponenti come deficit immunitario, tumori, traumi, ferite ed ustioni e ad interventi diagnostici o chirurgici, associati alla presenza di cateterismi, intubazioni ed impianti protesici. Si possono rilevare infezioni delle basse vie respiratorie come polmoniti, infezioni ossee o articolari, infezioni oculari come per la cheratite ulcerosa, infezioni auricolari, quali otiti, infezioni della cute ed infezioni urinarie (11). Per queste ragioni viene considerato uno dei principali agenti causa di infezioni acquisite in ambito nosocomiale. È stato riscontrato che i pazienti sottoposti a trapianti di organi solidi e molli e trapianti di midollo osseo hanno un aumento di probabilità di sviluppare batteriemia da *P. aeruginosa* rispetto alla popolazione ospedaliera generale. In una serie di pazienti sottoposti a trapianti di midollo osseo, di cuore o di polmone, *P. aeruginosa* è stata identificata come una causa comune di infezione nosocomiale. Quando i trapiantati di

polmone sviluppano bronchiolite obliterante, il batterio diventa un'importante causa di polmonite ad esordio tardivo (13).

2.3.7. Metodi di immunizzazione

Da alcuni anni è stato dimostrato che l'immunizzazione delle galline ovaiole con antigeni di *Pseudomonas aeruginosa* può indurre una robusta risposta anticorpale. Gli anticorpi prodotti, appartenenti alla classe IgY, vengono trasferiti naturalmente nel tuorlo delle uova, da cui possono essere isolati e purificati. Tali anticorpi sono stati sperimentati come trattamento orale, sotto forma di gargarismi, in pazienti affetti da fibrosi cistica. I risultati di uno studio preliminare condotto su un campione ristretto di pazienti hanno mostrato un'efficace riduzione dell'infezione da *P. aeruginosa*, rispetto ai soggetti non sottoposti a trattamento (15). Si tratta di una forma di immunizzazione passiva basata su anticorpi specifici anti-*Pseudomonas*, che secondo gli autori dello studio potrebbe favorire l'eliminazione del batterio e ridurre l'infiammazione. Viene quindi proposta come possibile strategia per controllare la colonizzazione precoce del patogeno nei pazienti con fibrosi cistica, anche in combinazione con gli antibiotici attualmente utilizzati per eradicare l'infezione. Sebbene questi studi preliminari sull'immunizzazione profilattica passiva siano promettenti e abbiano suscitato notevole interesse, è necessario confermarne l'efficacia e la validità clinica mediante trial controllati e su un campione adeguato di pazienti (16). Un'altra strategia immunitaria prevede l'uso di un vaccino mirato contro un batteriofago specifico, noto come fago Pf, rappresentato in Figura 9. Questo batteriofago facilita l'adesione e la penetrazione del batterio attraverso lesioni cutanee e vive in simbiosi con il suo ospite, contribuendo alla sopravvivenza del batterio

nell'organismo umano. Somministrare un vaccino diretto contro questo fago può ridurre significativamente il rischio di infezione batterica.

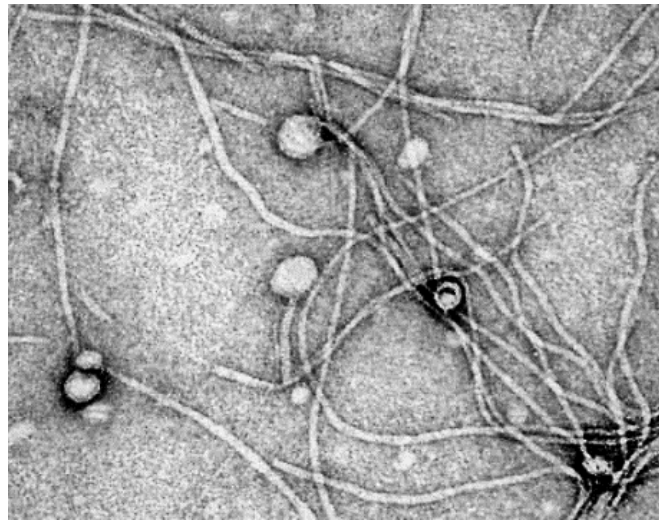


Figura 9: microfotografia elettronica di un gruppo di batteriofagi Pf. Crediti immagine: Francesco Centorrino, Microbiologia Italia.

Infatti, è stato dimostrato che il vaccino contro il fago Pf, se somministrato ai topi prima dell'infezione, permette di ottenere un aumento della protezione contro *P. aeruginosa*, anche in presenza del fago stesso. Un risultato analogo è stato ottenuto mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali, che hanno permesso di indurre immunizzazione passiva (17).

2.4. *Staphylococcus epidermidis*

2.4.1. Caratteristiche e morfologia

Staphylococcus epidermidis è un batterio Gram-positivo, aerobio-anaerobio facoltativo, piogeno, ovvero in grado di produrre pus, non sporigeno, catalasi-positivo, coagulasi-negativo, ubiquitario e commensale dell'uomo, localizzato prevalentemente a livello cutaneo in narici, ascelle, testa e placca dentale, la cui presenza a livello del cavo orale sembra essere associata all'insorgenza di parodontite, pulpite acuta e cronica e

pericoronite. Il termine catalasi-positivo fa riferimento alla capacità del microrganismo di produrre l'enzima catalasi che permette la scissione del perossido di idrogeno (H_2O_2) in acqua e ossigeno. L'effetto finale consiste nel blocco del sistema mieloperossidico dei fagociti, con la conseguente capacità del batterio di sopravvivere, crescere e moltiplicarsi negli stessi. Il termine coagulasi-negativo, invece, si riferisce alla non capacità del microrganismo di produrre l'enzima coagulasi. Altre specie di stafilococchi (e.g. *Staphylococcus aureus*) sono in grado di produrla sia in forma libera che in forma legata. Entrambe le tipologie enzimatiche trasformano il fibrinogeno in fibrina insolubile, proteggendo i microrganismi dalla fagocitosi e dai meccanismi di difesa dell'ospite. Gli stafilococchi coagulasi negativi vengono identificati con l'acronimo CNS (11). *Staphylococcus epidermidis*, essendo un batterio Gram-positivo, presenta una parete cellulare caratterizzata da uno spesso strato di peptidoglicano e priva di membrana esterna. All'interno di questa parete si trovano gli acidi teicoici, composti da glicerolo, glucosio e N-acetilglucosammina, che sono legati covalentemente al peptidoglicano. Questi componenti svolgono la funzione di ancoraggio per vari fattori di virulenza, i quali contribuiscono alla capacità patogena del microrganismo (Figura 10).

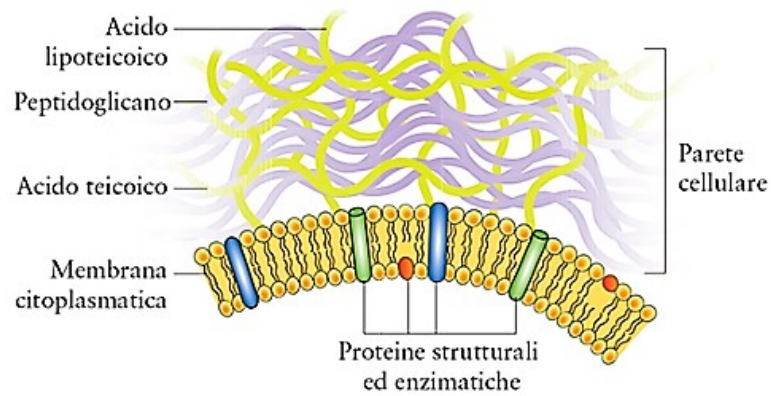


Figura 10: parete cellulare dei batteri Gram-positivi. Crediti e proprietà immagine: libro di testo *Microbiologia Farmaceutica*; N. Carlone, R. Pompei, V. Tullio; III edizione, anno 2021.

Staphylococcus epidermidis presenta una forma coccoide rotondeggiante dal diametro 1 μm e presenta la tendenza a disporsi in ammassi irregolari, dove i batteri sono vicini gli uni agli altri, come mostrato in Figura 11.

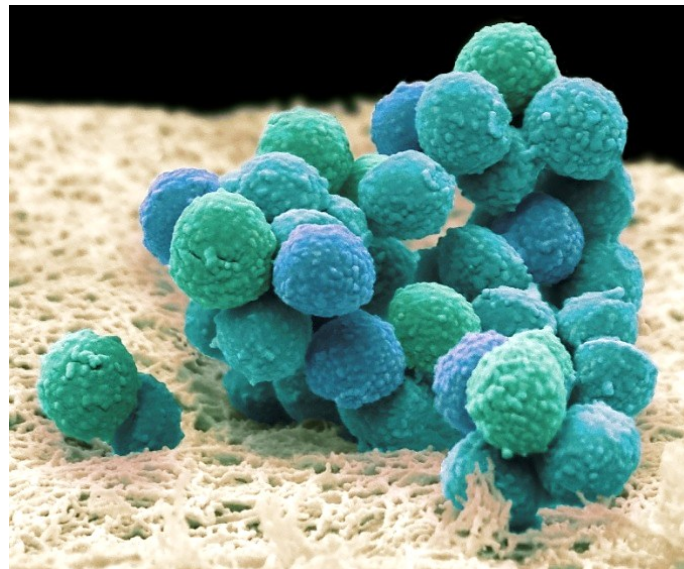


Figura 11: *Staphylococcus epidermidis*. Immagine acquisita tramite l'utilizzo di microscopio elettronico a scansione (SEM) del microrganismo *Staphylococcus epidermidis* prelevato dal canale auricolare umano. Crediti immagine: Steve Gschmeissner. Archivio fotografico: Science photo library.

2.4.2. Isolamento ed identificazione

Staphylococcus epidermidis cresce in terreni di coltura non selettivi come agar sangue. L'utilizzo di questo terreno permette di evidenziare la natura non emolitica del microrganismo rispetto a *Staphylococcus aureus*, suo simile ma avente capacità emolitica (Figura 12). È consigliato l'utilizzo di un terreno di coltura ad elevata concentrazione di sale (NaCl), pari al 7,5% circa della composizione del terreno, per l'isolamento e l'identificazione del microrganismo in campioni polimicrobici. Un esempio di questa tipologia è il terreno Chapman (11). *S. epidermidis* mostra la capacità di svilupparsi in ambienti privi di ossigeno, impiegando il glucosio come fonte energetica, mentre non utilizza il mannitolo per la fermentazione. Quando l'ossigeno è presente, questo microrganismo produce acidi grassi a catena corta, come l'acido butirrico, a partire da mono- e disaccaridi.



Figura 12: piastre Petri con terreno agar sangue dei microrganismi *Staphylococcus aureus* (sinistra) e *Staphylococcus epidermidis* (destra). È possibile distinguere la diversa capacità emolitica dei batteri: attorno alle colonie di *Staphylococcus aureus* è visualizzabile l'alone dovuto alla rottura dei globuli rossi a seguito della produzione dell' α -tossina emolitica. Crediti immagine: Daniela Beckmann. Archivio fotografico: Science photo library.

Staphylococcus epidermidis inizialmente venne denominato *Staphylococcus albus*: a differenza di *Staphylococcus aureus* che, per la produzione di un pigmento carotenoidale, origina colonie aranciate, *Staphylococcus epidermidis* presenta colonie bianche senza una caratteristica colorazione. Le colonie di *S. epidermidis* si presentano con forma rotondeggiante, leggermente rialzate, brillanti, dal colore grigio e con diametro approssimativamente di 1-2 mm. Come già sopra descritto, generalmente non producono zone di emolisi sulla piastra di coltura. I ceppi mucoidi formano colonie traslucide e appiccicose (18). Il test della coagulasi viene utilizzato per differenziare *Staphylococcus aureus* (positivo) dallo stafilococco coagulasi-negativo (CNS). La coagulasi è un enzima prodotto da *S. aureus* che converte il fibrinogeno nel plasma (solubile) in fibrina (insolubile) (18). Su agar sangue, le colonie di *S. intermedius* e *S. hyicus* appaiono bianche e prive di pigmentazione, a differenza di quelle di *S. aureus*, che sono pigmentate. Quest'ultimo produce colonie grandi, lisce e completamente pigmentate su agar sangue con esculina, un glucoside. La colorazione delle colonie di *S. aureus* può variare dal crema al bianco-grigiastro, al marrone chiaro o al giallo dorato. Dopo 24 ore di incubazione, l'emolisi si manifesta con una zona ampia e ben definita di emolisi parziale, spesso accompagnata da un'area più sottile e chiara di emolisi completa che si estende per almeno 2 mm oltre il margine della colonia. Gli stafilococchi coagulasi-negativi, invece, formano colonie di grandi dimensioni, lisce e compatte, che possono presentarsi bianche, cremose, bianco-grigiastre, marrone chiaro o giallo dorato, ma senza pigmentazione (19). È disponibile un metodo semplificato per l'isolamento, l'identificazione e la caratterizzazione di *Staphylococcus epidermidis*. Tale procedura prevede l'utilizzo di tamponi prelevati da naso e pelle, che vengono posti su terreno agar mannitolo-salato per la coltivazione. Le colonie isolate, che non producono acido dal

mannitolo e sono presumibilmente stafilococchi coagulasi negativi (CNS) o micrococchi, vengono successivamente inoculate su agar viola contenente eritromicina e glicerolo. Le colonie che crescono su questo terreno vengono poi replicate su un secondo terreno per testare la produzione di fosfatasi, la fermentazione del trealosio e la sensibilità a quattro diversi antibiotici. L'identificazione precisa di *S. epidermidis* viene confermata tramite il sistema API STAPH-IDENT, che si basa su una serie di 10 test biochimici miniaturizzati, comprendenti attività di fosfatasi alcalina, ureasi, beta-glucosidasi, beta-glucuronidasi e beta-galattosidasi, oltre alla produzione di acidi aerobici da vari zuccheri e all'arginina. Le reazioni sono lette dopo 5 ore di incubazione a 35 °C. Questo metodo è stato confrontato con tecniche convenzionali, come lo schema semplificato di Kloos e Schleifer e l'ibridazione DNA-DNA, per l'identificazione di 14 specie di stafilococchi, mostrando un'elevata concordanza superiore al 90% per la maggior parte dei ceppi analizzati. Di conseguenza, si è stabilito che *Staphylococcus aureus* e gli altri CNS vengono efficacemente esclusi dagli ulteriori test, concentrando l'analisi solo sui ceppi di *S. epidermidis*. Su 252 ceppi isolati da 48 diversi campioni di narici e dita, il 44% è stato eliminato nelle varie fasi del processo di identificazione. Inoltre, i dati di sensibilità antibiotica hanno permesso di distinguere ulteriormente i ceppi maggiormente presenti, in accordo con i profili biochimici ottenuti dal sistema API. Questo protocollo rappresenta un valido strumento nelle fasi iniziali degli studi epidemiologici su questo rilevante patogeno nosocomiale (21).

2.4.3. Epidemiologia e patogenesi

Staphylococcus epidermidis è un batterio ubiquitario e commensale dell'uomo che, in determinate circostanze predisponenti, può diventare patogeno opportunista. È

responsabile di infezioni nosocomiali quali meningiti, infezioni a carico di protesi vascolari e valvolari, ad esempio endocarditi, infezioni delle vie urinarie e in sedi di ferite chirurgiche. Come *Pseudomonas aeruginosa* è in grado di formare biofilm (Figura 13), acquisendo la capacità di aderire a superficie rigide. I biofilm di *S. epidermidis* sono caratterizzati dall'inibizione dei processi cellulari di base e dall'induzione della produzione di fattori protettivi (11).

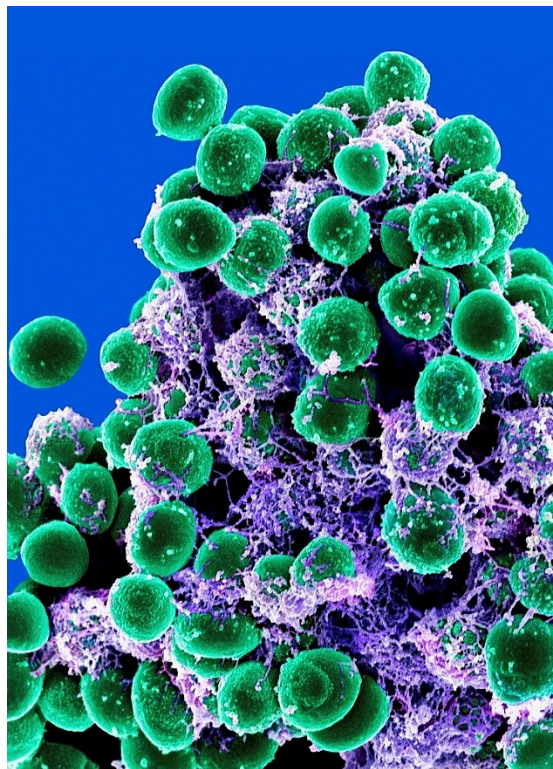


Figura 13: biofilm di *Staphylococcus epidermidis*. Immagine acquisita tramite l'utilizzo di microscopio elettronico a scansione (SEM). Crediti immagine: Niaid, Science Source. Archivio fotografico: Science photo library.

Studi recenti hanno evidenziato che il biofilm di *S. epidermidis* ospita un gran numero di cellule in grado di produrre peptidi difensivi, i quali proteggono il batterio dall'eliminazione da parte dei neutrofili. Questi peptidi, chiamati moduline solubili in fenolo (PSM), appartengono ad una famiglia di molecole pro-infiammatorie con attività

citolitica, coinvolte nei meccanismi di evasione immunitaria e nella formazione del biofilm. Le PSM svolgono diverse funzioni, tra cui stimolare la sintesi di citochine pro-infiammatorie, favorire il reclutamento, l'attivazione e la distruzione dei neutrofili, facilitando così la capacità degli stafilococchi di sfuggire all'attacco immunitario e di causare la lisi degli eritrociti. I cambiamenti fisiologici nel biofilm di *S. epidermidis* difendono i batteri dall'azione del sistema immunitario dell'ospite riducendo la sensibilità verso molecole dannose, come gli antibiotici, le citochine e i peptidi antibatterici, provocando di conseguenza una sua trasformazione ad uno stato non aggressivo, riducendo l'infiammazione e la chemiotassi delle cellule del sistema immunitario al sito di infezione. Tali tattiche di evasione del sistema immunitario consentono ai batteri di persistere durante l'infezione. Yao e collaboratori hanno descritto un cambiamento globale nell'espressione genica nei biofilm di *S. epidermidis*, tra cui un basso metabolismo, una riduzione della trascrizione e della traduzione genica ed un passaggio dalla produzione di energia aerobica alla fermentazione, risultando quindi in una modalità di crescita non aggressiva e protetta, la quale permette una minore sensibilità agli antibiotici e alle difese immunitarie dell'ospite e garantisce la sopravvivenza del batterio a lungo termine durante l'infezione cronica (22).

2.4.4. Fattori di virulenza

Staphylococcus epidermidis è dotato di quattro principali categorie di fattori di virulenza. Due di queste sono di natura strutturale e comprendono la capsula e la parete cellulare, componenti che svolgono un ruolo rilevante nei meccanismi di evasione della risposta immunitaria dell'ospite. Le restanti due categorie sono di tipo funzionale e fanno riferimento alla capacità del microrganismo di produrre sostanze extracellulari, quali

tossine ed enzimi, implicate nei processi di colonizzazione, danneggiamento dei tessuti e progressione dell'infezione. La capsula è definita, in modo più appropriato, strato mucoso, è di natura polisaccaridica e consente al microrganismo di aderire a superfici sintetiche come protesi, impianti e cateteri e gli fornisce una protezione ulteriore nei confronti degli antibiotici, che faticano a penetrarvi. La parete cellulare di *Staphylococcus epidermidis* è quella caratteristica dei batteri Gram-positivi, caratterizzata da uno spesso strato di peptidoglicano. Questa sostanza è costituita da una porzione polisaccaridica, il glicano, formato dagli zuccheri N-acetilglucosammina e acido N-acetilmuramico legati con legame β -1,4-glicosidico, e da una porzione peptidica legata al gruppo carbossilico dell'acido N-acetilmuramico, costituita dagli amminoacidi L-alanina, acido D-glutammico, L-lisina e D-alanina. *Staphylococcus epidermidis* presenta nella parete cellulare l'acido glicerol-teicoico che gli consente l'adesione alle mucose nell'ospite. Il peptidoglicano stimola la produzione dell'interleuchina 1 (IL-1), una citochina proinfiammatoria, da parte delle cellule del sistema immunitario (e.g. monociti) e di altri pirogeni endogeni, ovvero sostanze che causano l'innalzamento della temperatura corporea. Gli stafilococchi coagulasi negativi (CNS) non presentano nella parete cellulare, a differenza di quelli coagulasi positivi come *Staphylococcus aureus*, la proteina A che si è studiato essere coinvolta in un meccanismo di protezione del batterio nei confronti dell'azione degli anticorpi della cellula ospite, mediante legame specifico con il frammento Fc dell'immunoglobuline G (11). Se fino agli inizi degli anni duemila *Staphylococcus epidermidis*, insieme ad altri CNS, era considerato incapace di produrre tossine, ad oggi è stato necessario rivedere e modificare questa visione. Nel 1999 S. Klebanoff e il suo gruppo ha isolato, estratto e purificato dal batterio *Staphylococcus epidermidis*, un complesso peptidico denominato PSMs (23) e costituito dalle citolisine

proinfiammatorie PSM α , PSM δ , PSM ϵ , δ -tossina, PSM-mec e dai tensioattivi PSM β 1 e PSM β 2. Il microrganismo è inoltre noto per la produzione dell'enterotossine SEC3 e SE1L localizzate nelle isole di patogenicità, ovvero in segmenti di DNA contenenti geni in grado di conferire al batterio la capacità di infettare e danneggiare l'ospite (24). Sono responsabili di tossinfezioni alimentari che non possono essere scongiurate da trattamenti termici data la capacità delle stesse di resistere ad alte temperature per lunghi periodi, (ad esempio 100 °C per 30 minuti) (11). In ultimo, *Staphylococcus epidermidis* produce una serie di enzimi che contribuiscono ad aumentarne la virulenza. Le proteasi SepA e Esp agiscono rispettivamente degradando l'adenosinammonofosfato (AMP) e la proteina C5 del sistema del complemento, insieme al fibrinogeno. Mentre il meccanismo d'azione delle lipasi prodotte da 1/3 dei CNS non è ancora completamente chiarito (24), è noto che questi enzimi favoriscano la diffusione del batterio in tessuti cutanei e sottocutanei, permettendogli di vivere e preferire zone corporee sebacee (11).

2.4.5. Terapia ed antibiotico-resistenza

Negli ultimi anni si è registrata una sempre crescente incidenza di casi di ceppi di *Staphylococcus epidermidis* antibiotico-resistenti. I meccanismi di resistenza vengono acquisiti dal microrganismo attraverso la ricombinazione genetica e l'acquisizione di geni. Nel 2011 è stato pubblicato un report di uno studio condotto da David J. Farrell e collaboratori, il quale ha evidenziato che oltre il 70% di ceppi di *Staphylococcus epidermidis* sono resistenti alla meticillina (25) (26). Attualmente si stima che l'80% di CNS sono meticillino-resistenti. Questo farmaco fa parte della famiglia delle penicilline semisintetiche come l'oxacillina, la nafcillina e la dicloxacillina. Inizialmente è stato sviluppato per essere resistente agli enzimi β -lattamasi, prodotti dal microrganismo ed in

grado di scindere l'anello beta-lattamico dell'antibiotico. In seguito, l'acquisizione del gene *mec* ha consentito al batterio di codificare la proteina PBP24 che contribuisce alla normale sintesi del peptidoglicano. L'introduzione in terapia della vancomicina ha consentito di trattare le infezioni dovute a ceppi meticillino-resistenti, se pur per un periodo limitato. Trent'anni dopo l'inizio del suo impiego, infatti, sono comparsi i primi fenomeni di resistenza anche verso questo farmaco, dovuti a molteplici meccanismi come una modificazione nella struttura ed organizzazione del peptidoglicano, maggior costituente della parete batterica dei Gram-positivi (11). Attualmente *S. epidermidis* si è dimostrato sensibile in laboratorio anche a dalbavancina, daptomicina, linezolid, oritavancina, quinupristin/dalfopristin, tedizolid, telavancin, tigeciclina, ceftarolina e ceftobiprololo. Numerosi sono i ceppi endemici di *S. epidermidis* multiresistenti diffusi a livello globale nei setting assistenziali. Il fenomeno della multi-resistenza è in crescente aumento e rappresenta un serio rischio per la sanità a causa delle limitate opzioni di trattamento, soprattutto per le infezioni a carico di dispositivi permanenti e protesici, già difficili da trattare (27). Ad oggi, il farmaco più impiegato per la cura di infezioni causate da *Staphylococcus epidermidis* rimane la vancomicina, talvolta associata a rifampicina ed antibiotici aminoglicosidici.

2.4.6. *S. epidermidis* ed infezioni nosocomiali

Staphylococcus epidermidis è un batterio commensale della pelle umana; tuttavia, insieme ad altri stafilococchi coagulasi negativi (CNS), può risultare anche come comune patogeno nosocomiale che infetta pazienti aventi un sistema immunitario compromesso e pazienti portatori di impianti protesici. La resistenza agli antibiotici e la capacità di formare biofilm su superfici inerti rendono queste infezioni difficili da trattare. Le analisi

epidemiologiche che utilizzano la tipizzazione di sequenza multilocus (MLST) e gli studi genetici, suggeriscono che i ceppi isolati di *S. epidermidis* nell'ambiente ospedaliero differiscono da quelli analizzati al di fuori delle strutture mediche; si sono riscontrate differenze nella formazione di biofilm, nella resistenza agli antibiotici e nella presenza di elementi mobili del DNA. Poiché tali ceppi microbici mostrano un'elevata flessibilità del genoma, sono considerati serbatoi per l'evoluzione e la diffusione dei tratti di resistenza all'interno delle comunità batteriche nosocomiali (28). *S. epidermidis* è frequentemente coinvolto nelle infezioni in cateteri e nelle protesi ortopediche o mammarie. Sono state sviluppate diverse metodologie per testare le potenziali proprietà anti-biofilm dei composti come ad esempio l'impiego del colorante cristalvioletto, noto anche con il nome di violetto di genziana, e l'utilizzo anticorpi innestati sulla superficie di materiali innovativi e biocompatibili. Altri approcci, come la funzionalizzazione di superfici con argento e composti naturali, sono stati utilizzati per evitare la diffusione della resistenza batterica agli antimicrobici (29). *S. epidermidis* è molto spesso il principale agente infettivo in pazienti compromessi, come i tossicodipendenti e i pazienti immunocompromessi. In questa categoria rientrano pazienti in terapia immunosoppressiva, pazienti affetti da AIDS e neonati prematuri. La più importante tipologia di infezione causata da *S. epidermidis* è l'infezione su corpi estranei, come cateteri a permanenza, cateteri vascolari e qualsiasi dispositivo impiantato. Le infezioni da *S. epidermidis* su questi dispositivi sono complicate dalla formazione di biofilm, che risulta essere la maggior causa della difficoltà nell'eradicare le infezioni microbiche su un dispositivo a permanenza, a causa della ridotta penetrazione degli antibiotici nel bersaglio e di una ridotta risposta immunitaria (30). Poiché il trattamento antimicrobico ha scarso o nullo effetto contro le popolazioni di biofilm sui dispositivi medici

colonizzati, la rimozione chirurgica e la sostituzione del dispositivo è spesso necessaria. Nei casi in cui questa non sia un'opzione praticabile, i pazienti sono sottoposti ad una terapia antibiotica intermittente per tutta la vita, portando ad un significativo aumento di morbidità e mortalità (31). Gli stafilococchi coagulasi negativi (CNS), ed in particolare modo *S. epidermidis*, sono spesso segnalati come cause frequenti di sepsi, soprattutto tra i neonati. Tuttavia, il fatto che siano commensali della pelle umana rende difficile la diagnosi microbiologica di una vera infezione del sangue. I batteri possono produrre fattori che interferiscono con la capacità del sistema immunitario di fronteggiare gli invasori batterici. Alcuni di questi fattori riducono la capacità del sistema immunitario di riconoscere i batteri, come nel caso delle proteine batteriche che interferiscono con l'attivazione dei recettori del sistema immunitario. Le tossine batteriche, inoltre, possono uccidere importanti cellule immunitarie, come le leucotossine o le moduline solubili in fenolo (PSM), portando ad un rallentamento significativo nella risoluzione della sepsi (32). In conclusione, *S. epidermidis* essendo dotato di un'eccellente capacità di ricombinazione e di trasferimento di materiale genetico, determina la diffusione e l'evoluzione dei tratti di resistenza all'interno delle comunità batteriche nosocomiali.

2.5. Le nanoparticelle: definizione e caratteristiche

Secondo la definizione contenuta nella Raccomandazione della Commissione Europea del 21 ottobre 2011 (2011/696/EU) si intende “*Nanomateriale*”: *un materiale naturale, accessorio o fabbricato contenente particelle, in uno stato non legato o come aggregato dove, per il 50% o più, le particelle hanno una dimensione compresa tra 1nm e 100 nm. In casi specifici e giustificati da preoccupazioni per l'ambiente, per la salute, per la sicurezza o per la competitività, il range dimensionale del 50% può essere sostituito da*

un range tra l'1% e il 50%. In deroga a quanto sopra, fullereni, scaglie di grafene e nanotubi di carbonio a parete singola con una o più dimensioni esterne al di sotto di 1 nm dovrebbero essere considerate come "nanomateriali". Le proprietà delle nanoparticelle dipendono dalla loro composizione, dalla loro forma e dalla loro dimensione. Le nanoparticelle, grazie alle loro dimensioni ridotte, presentano un rapporto superficie/volume molto elevato, che cresce ulteriormente al diminuire delle loro dimensioni. Questa caratteristica è molto importante poiché tutte le interazioni che le nanoparticelle instaurano con l'ambiente esterno avvengono attraverso le particelle di superficie. Il contributo della gravità diventa sempre meno preponderante per dimensioni particellari sempre più ridotte mentre diventa determinante il contributo della tensione superficiale e delle forze di Van der Waals. Le nanoparticelle, inoltre, si trovano solitamente disperse in una fase continua definita dispersione colloidale (33). La dispersione delle nanoparticelle in un solvente è resa possibile dall'intensa interazione tra la loro superficie e il mezzo circostante, che riesce a compensare le differenze di densità. In caso contrario, tali particelle tenderebbero a depositarsi o a galleggiare. Le più recenti scoperte scientifiche hanno evidenziato l'enorme potenziale delle nanoparticelle in ambito medico. Un esempio è rappresentato dalle nanoparticelle d'oro che, concentrandosi in una specifica area del corpo, a seguito di esposizione a fasci laser e generando un'ipertermia localizzata, sono in grado di indurre la morte delle cellule (34) (35). Questi nanomateriali mostrano anche ottime proprietà ottiche dovute alla loro dimensione ridotta, che consente il confinamento degli elettroni e l'emergere di fenomeni quantistici. Le loro caratteristiche più rilevanti sono l'elevato rapporto superficie/volume, la scala atomica e la capacità di assorbire e trasportare molecole, elementi che li rendono interessanti per applicazioni biomediche. Tuttavia, la loro efficacia e il loro utilizzo

necessitano di cautela: la penetrazione facilitata delle nanoparticelle nei tessuti può comportare rischi per la salute, a causa delle possibili interazioni con l'organismo umano, che tuttora non sono ancora completamente comprese. Alcuni studi si sono concentrati su vettori molecolari in grado di superare barriere biologiche, come quella ematoencefalica, per veicolare farmaci direttamente all'interno delle cellule. Ad oggi, nonostante non siano stati segnalati effetti avversi significativi, il numero di ricerche disponibili è ancora limitato (36). Le proprietà delle nanoparticelle si dimostrano particolarmente interessanti anche per la funzionalizzazione antibatterica delle superfici tramite argento: mentre le tecnologie tradizionali richiedevano una quantità elevata di materiale per ottenere un effetto diffuso, l'impiego delle nanoparticelle consente di massimizzare la superficie attiva riducendo al minimo la massa utilizzata. Questo permette un rilascio più rapido e duraturo di ioni di argento. Infine, la possibilità di ricoprire le superfici con un solo strato di nanoparticelle di argento non solo garantisce l'efficacia antibatterica, ma riduce anche i costi, rendendo l'applicazione economicamente più sostenibile.

2.6. Blu di Prussia

2.6.1. Storia e caratteristiche del materiale

Il blu di Prussia, abbreviato PB dall'inglese *Prussian Blue*, è considerato il primo pigmento sintetico della storia. La prima documentazione storica di questa sostanza risale al volume *Experimenta, Observationes, Animadversiones* pubblicato nel 1731 da Georg Ernst Stahl. In realtà, tra il 1676 e il 1716, era stato oggetto di corrispondenza epistolare tra Johann Leonhard Frisch, filologo e naturalista tedesco, e Gottfried Wilhelm Leibniz, filosofo e scienziato anch'esso tedesco. La paternità della scoperta risale all'artista Diesbach, avvenuta nel XVIII secolo a Berlino. Alla fine di questo secolo il mineralogista

Abraham Werner, divise e standardizzò i colori secondo uno schema ed una classificazione precisa ed associò il numero 25 al blu di Prussia, originariamente chiamato blu Berlino (37). Qualche secolo più tardi anche Primo Levi, scrittore e chimico italiano di origine ebraiche, ebbe tra le mani la scheda chimica di preparazione di questo pigmento e ne riportò alcuni dettagli nella pubblicazione del libro “Il sistema periodico” del 1975. Prima di questa scoperta il colore blu veniva ottenuto dalla macinazione dei lapislazzuli, pietre dure dal brillante colore blastro dovuto alla presenza di ioni polisolfuro nel reticolo cristallino e costituiti prevalentemente da lazurite (38). A seguito della scoperta, molti celebri artisti tra cui Van Gogh nel dipinto “La notte stellata”, iniziarono ad impiegare questo pigmento nelle loro opere; primo fra tutti fu Adriaen van der Werff nel dipinto “La deposizione di Cristo”. A partire dal 1724 molti studiosi e scienziati come Macquer, Priestley, Scheele, Berthollet, Gay-Lussac e Berzelius si prodigarono nello studio della composizione, struttura chimica e stechiometria del colorante. Solamente con l'avvento della diffrazione a raggi X fu possibile determinarne in modo esatto la struttura. Dal XVIII secolo ad oggi, il blu di Prussia è stato impiegato per numerosi scopi: dall'arte e pittura alla cianotipia, metodo fotografico utilizzato nella riproduzione di disegni tecnici, dal settore tessile alla chimica e alla medicina per il trattamento di avvelenamenti da metalli pesanti quali cesio (Cs) e tallio (Tl). Solamente negli ultimi anni, grazie all'avvento delle nanotecnologie, il blu di Prussia, sintetizzato in forma nanoparticellare, grazie alle sue caratteristiche elettrochimiche, elettrocromatiche, magnetiche ed elettrocatalitiche ha visto un nuovo ma ancora limitato impiego come possibile agente antibatterico grazie all'intrinseco effetto fototermico manifestato a seguito di irraggiamento con radiazioni nel vicino infrarosso (NIR) (39) (40). Il blu di Prussia è chimicamente un composto di coordinazione con una struttura a reticolo tridimensionale

cubico, costituito principalmente da ferro e cianuro e di formula $\text{Fe}^{\text{III}}_4 [\text{Fe}^{\text{II}} (\text{CN})_6]_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ con $x = 14-16$ per il blu di Prussia “insolubile” e $\text{KFe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ con $x = 1-5$ per il PB “solubile”, come mostrato nella Figura 14 sotto riportata.

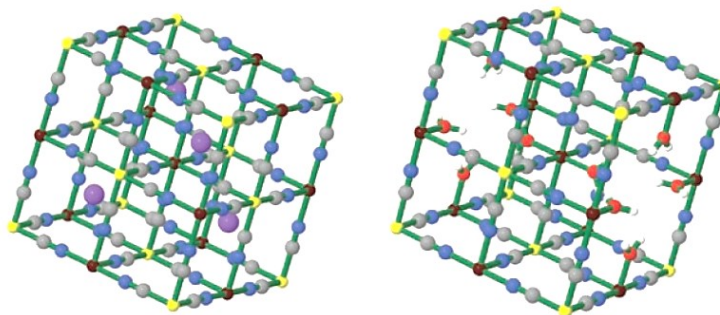
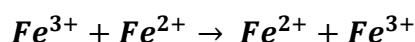


Figura 14: a sinistra rappresentazione della struttura del PB “solubile” con metà dei centri delle celle cubiche occupate da K^+ . Colori: Fe^{II} giallo, Fe^{III} marrone, C grigio, N blu, K violetto; a destra rappresentazione della struttura del PB “insolubile” con le sfere di coordinazione di $\text{Fe} (\text{III})$ completate da molecole di acqua (O rosso, H bianco). Crediti immagine: (40).

I motivi della colorazione blu della sostanza risiedono nella presenza di due stati di ossidazione del ferro, essendo esso un composto a valenza mista. Nel composto gli atomi di ferro subiscono cicli di ossidazione e riduzione tramite il seguente processo:

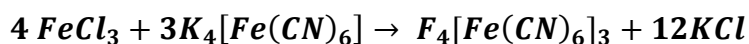


Il trasferimento di carica responsabile del colore del blu di Prussia richiede un’energia comparabile a quella della luce nella regione rosso-gialla dello spettro visibile. Di conseguenza, il composto assorbe efficacemente la luce gialla, restituendo una caratteristica colorazione blu intensa. Il primo modello teorico che ha spiegato questa transizione elettronica fu proposto da Robin nel 1962, basandosi sulla teoria del campo dei ligandi (41). Il blu di Prussia è un materiale atossico, biocompatibile, fototermicamente attivo, insapore e facilmente sintetizzabile in scala nanometrica. Queste

caratteristiche lo rendono il candidato ideale per applicazioni biochimiche e mediche come l'imaging, la terapia fototermica e la somministrazione di farmaci (39) (41), tanto che negli ultimi anni la ricerca in questo campo sta registrando un notevole incremento.

2.6.2. Sintesi PBNPs: accenni

Dal 1825 è permesso, grazie alla possibilità di produrre ferrocianuro di potassio ($K_4[Fe(CN)_6]$), l'ottenimento del colorante blu di Prussia mediante reazione con sali ferrici. Attualmente un metodo di sintesi molto rapido, semplice e comunemente impiegato consiste nel mescolare soluzioni di cloruro ferrico ($FeCl_3$) ed esacianoferrato di potassio ($K_4[Fe(CN)_6]$) in ambiente acido, come mostrato nella reazione sotto riportata. Questo procedimento porta alla formazione di un precipitato blu abbondante o di una sospensione colloidale. Tuttavia, nei diversi processi industriali differiscono leggermente l'uno dall'altro nella composizione chimica e nelle proprietà fisiche (41).



I primi lavori presenti in letteratura che riportano la sintesi di nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) risalgono agli anni duemila e, dipendentemente dalla strategia di preparazione, la forma e la dimensione possono variare. Un esempio è mostrato nella Figura 15 dove le PBNPs presentano una forma *squared*, ovvero quadrata.

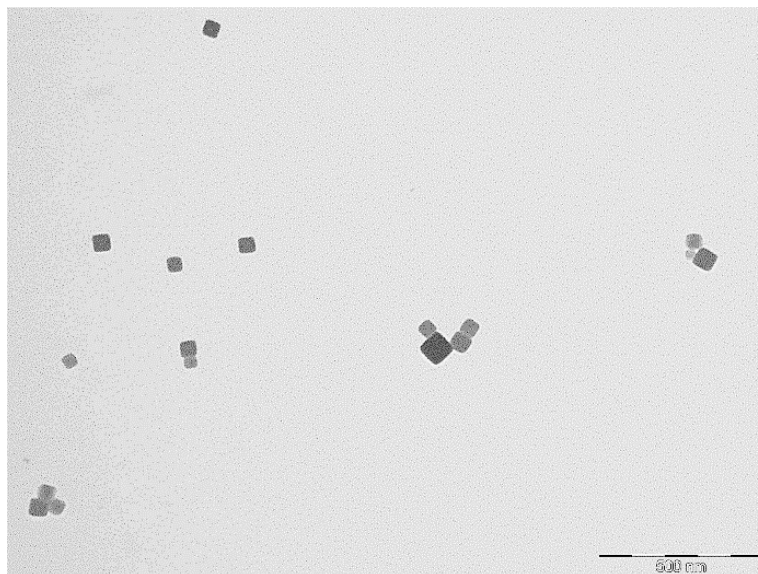


Figura 15: immagine raffigurante PBNPs acquisita con microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Crediti immagine: Laura Ghidoni e Letizia Pasini.

I processi sintetici utilizzati per la produzione di PBNPs possono includere l'utilizzo di polimeri, acidi ed ammine alifatiche con l'obiettivo di renderle solubili in acqua e in soluzioni organiche. I diversi metodi che possono essere impiegati sono principalmente tre: il metodo di coprecipitazione, il metodo idrotermale e il metodo a singolo precursore. La prima metodologia consiste in una reazione di precipitazione tra il cloruro ferrico e l'esacianoferrato di potassio con l'ottenimento di un copioso precipitato o di una sospensione colloidale del blu di Prussia. Solitamente la reazione viene condotta alla temperatura di 60 °C. Il secondo metodo invece prevede di dissolvere o disperdere le componenti in acqua, ponendo il sistema ottenuto in autoclave, garantendo elevati valori di temperatura (> 100 °C) e pressione. In ultimo, il terzo approccio vede l'utilizzo o di $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ o di $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ come precursori, in ambiente acido. Progressivamente queste due sostanze rilasciano ioni ferrici o ferrosi che vengono ridotti o ossidati a ioni ferrosi e ioni ferrici. Gli ioni ferro reagiscono in un secondo momento con gli ioni non decomposti a formare PBNPs. Questo è considerato l'approccio migliore per la sintesi di PBNPs

perché dati i tempi lunghi di reazione del processo, si ottengono nanoparticelle aventi un'elevata monodispersione (37) (40).

2.6.3. Effetto fototermico delle PBNPs

L'effetto fototermico è la capacità di un materiale di convertire una radiazione magnetica incidente in calore. Per i metalli nobili come l'argento la conversione dell'irradiazione in calore è correlata al contributo di assorbimento della risonanza plasmonica. L'effetto fototermico dell'argento è trattato nel paragrafo 2.7.6. L'effetto fototermico del blu di Prussia, invece, si fonda sulla particolare architettura cristallina di questo composto ferrocianurico, in cui ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} sono connessi da gruppi CN^- formando domini di trasferimento di carica inter-valenza (IVCT). Tali domini conferiscono a PB un'eccezionale capacità di assorbire radiazioni nel vicino infrarosso (NIR, 700 – 1400 nm), con un picco intorno a 700 – 900 nm che sfrutta la finestra biologica per la penetrazione nei tessuti. L'assorbimento di fotoni NIR provoca l'eccitazione di elettroni dal livello Fe^{2+} al Fe^{3+} , seguita da un rilassamento non radiativo: l'energia eccitata viene infatti dissipata per collisione con la rete cristallina, generando fononi e incrementando rapidamente la temperatura locale. L'efficienza di conversione fototermica (η) di nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) varia tipicamente dal 30 % al 45 %, a seconda della loro dimensione (20 – 100 nm), grado di cristallinità e del tipo di rivestimento applicato (silice o polimeri organici), il quale ne migliora stabilità e biocompatibilità senza inibire l'assorbimento NIR. Con densità di potenza comprese tra 0,2 e 0,5 W/cm², si possono raggiungere incrementi termici di oltre 40 °C in pochi minuti, sufficiente a indurre danni irreversibili alle membrane cellulari, a denaturare le proteine e a promuovere la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule batteriche.

In ambito biomedico, tali proprietà rendono le PBNPs particolarmente adatte sia alla terapia fototermica di tumori superficiali e profondi sia alla disinfezione di dispositivi medici, dove il riscaldamento localizzato permette di abbinare un'azione antimicrobica termica all'effetto chimico di eventuali agenti incorporati, come AgNPs. Inoltre, la robustezza chimica delle PBNPs consente cicli ripetuti di irraggiamento senza degrado significativo, mentre la possibilità di funzionalizzazione con molecole *targeting* o stratificazioni “strato per strato” apre prospettive verso sistemi multimodali di terapia e diagnostica integrata (42).

2.7. Argento

2.7.1. Storia e caratteristiche del materiale

L'argento, il cui simbolo chimico è Ag e il numero atomico è 47, è un metallo nobile appartenente al blocco d della tavola periodica degli elementi. Il nome deriva dal latino “*argēntum*” e dal greco “*ἄργυρος*”, da “*αργός*”, che significa splendente, lucente, brillante. Fa parte del gruppo 11 ed è un elemento di transizione della seconda serie. È tenero, duttile e malleabile, dalla colorazione bianca lucente. Nei composti si trova principalmente allo stato monovalente e in natura si presenta sia allo stato minerale, sotto forma di argentite (Ag_2S), proustite ($3\text{Ag}_2\text{S} \cdot \text{As}_2\text{S}_3$), luna cornea (AgCl) e pirargirite ($3\text{Ag}_2\text{S} \cdot \text{Sb}_2\text{S}_3$), sia allo stato nativo. È un ottimo conduttore di calore ed elettricità. L'argento, pur essendo un metallo nobile, se esposto all'aria, tende ad annerire a causa della formazione di un sottile strato di solfuro che si genera per l'azione combinata dell'ossigeno e di tracce di idrogeno solforato (H_2S) presenti nell'atmosfera. Per millenni l'argento, essendo stato considerato come il secondo metallo più prezioso dopo l'oro, è stato utilizzato come ornamento in gioielli, come merce di scambio e come base per molti

sistemi monetari in lega con rame, oro e zinco (43). Oggi l'argento trova un vasto impiego in numerosi settori: in fotografia viene utilizzato per la produzione di pellicole e carte fotografiche grazie alla fotosensibilità dei suoi alogenuri, come il cloruro di argento, che hanno la caratteristica di scurirsi a contatto con la luce. In ambito elettronico ed elettrico, sfruttando la sua elevata conducibilità, viene impiegato nella realizzazione di contatti ad alta conduttività mentre in ambito chimico viene utilizzato come catalizzatore, ad esempio nella produzione di metanolo. L'argento viene anche sfruttato nella realizzazione di specchi ad alta riflettanza, nella produzione di batterie a lunga durata e come additivo alimentare (E174) in prodotti dolciari. Note le sue proprietà antibatteriche, in ambito medico l'argento viene impiegato in otturazioni dentali sottoforma di fluoruro di diammina di argento (SDF), in prodotti destinati alla disinfezione delle acque grazie all'azione batteriostatica e battericida dei suoi ioni e, recentemente, ha trovato applicazione anche nella nanomedicina, dove viene utilizzato per rivestire superfici di dispositivi medici, impianti e materiali chirurgici, contribuendo a ridurre il rischio di infezioni nosocomiali.

2.7.2. Argento come agente antimicrobico: una storia di secoli

Fin dai tempi antichi, alcuni metalli erano apprezzati per le loro proprietà curative e antibatteriche, benché la causa delle infezioni, i batteri, fosse ancora sconosciuta. L'utilizzo dell'argento come agente purificante è riconosciuto da circa 6000 anni quando gli egizi lo utilizzavano sia per rivestire le cisterne contenenti acqua potabile, per prevenire la contaminazione batterica, sia come materiale di produzione per le maschere funebri al fine di scongiurare lo sviluppo di muffe e funghi sui cadaveri imbalsamati. Nel 1200 a.C. anche i fenici utilizzavano giare di argento per mantenere inalterate le

caratteristiche dell'acqua, del vino e dell'aceto, soprattutto durante il trasporto e il commercio. Nel 500 - 400 a.C. attraverso reperti archeologici si è potuto stabilire che i greci e gli etruschi mettevano delle placche di argento sulle ferite per accelerare la loro cicatrizzazione. In epoche successive, anche i cinesi ne fecero uso a scopo terapeutico, mentre nel mondo islamico veniva somministrato sotto forma di pillole per purificare il sangue. Dal 1300 d.C. la Chiesa cattolica adottò l'utilizzo dell'argento per i suoi calici, al fine di prevenire la diffusione di malattie tra preti e praticanti. Inoltre, le stoviglie di argento per contenere e servire alimenti erano usate soprattutto nelle famiglie nobili, volendo limitare e rendere più rare le infezioni, con lo scopo di preservare la discendenza. Nel 1700 infatti si scoprì che i bambini che erano stati alimentati con cucchiaini di argento risultavano più sani di quelli alimentati con cucchiaini di altri metalli. Tuttavia, l'uso prolungato di stoviglie e posate di argento poteva provocare l'argiria, una condizione patologica caratterizzata da una colorazione bluastra della pelle, causata dall'assunzione continua di piccole quantità di argento attraverso gli alimenti. Nella seconda metà del XIX secolo i primi studi microbiologici in campo medico dimostrarono le proprietà antibatteriche, antimicotiche ed antinfiammatorie dell'argento che, da quel momento, iniziò ad essere largamente utilizzato. Intorno al 1850, i primi ricercatori iniziarono a studiare l'attività dell'argento e di altri metalli in sospensione colloidale, scoprendo che sia l'argento che il mercurio erano altamente efficaci nell'eliminare i batteri. Entrambi furono impiegati in ambito medico per molti anni, ma l'uso del mercurio è progressivamente diminuito a causa dei gravi danni che provocava nei pazienti, fino ad arrivare alla sua completa proibizione. All'inizio del Novecento gli scienziati scoprirono che i fluidi più importanti del corpo umano sono di natura colloidale, e cioè costituiti da particelle ultra-fini sospese in un liquido. Un esempio è il sangue che porta nutrienti ed

ossigeno ai tessuti. Questa scoperta dette inizio alla ricerca sui colloidali e, più nello specifico, all'argento in forma colloidale. Prima del 1938, l'argento colloidale era considerato l'antibiotico d'elezione ed era apprezzato come rimedio all'avanguardia, tanto da raggiungere prezzi elevati. Tuttavia, con l'ascesa dell'industria farmaceutica e lo sviluppo di nuovi antibiotici, i pochi studi in corso sull'argento colloidale furono progressivamente abbandonati (44). Tra il 1900 e il 1940, questo composto fu ampiamente impiegato a scopo terapeutico, con decine di migliaia di pazienti trattati e milioni di somministrazioni, molte delle quali per via endovenosa, la modalità più rischiosa. Nonostante ciò, l'uso intensivo mise in evidenza l'ampio margine di sicurezza dell'argento colloidale e la scarsa incidenza di effetti collaterali, riscontrabili solo con dosi elevate. Dopo un lungo periodo di disinteresse, negli ultimi anni la ricerca medica su questo metallo ha ripreso vigore. Oggi, infatti, di fronte soprattutto a patogeni antibiotico resistenti, l'argento sta riemergendo come un importante agente antibatterico poiché svolge un'azione unica nell'attaccare ed uccidere i microrganismi che provocano infezioni. La medicina moderna lo utilizza come antimicrobico nel trattamento di ustioni, di infezioni degli occhi nei neonati, per i dispositivi medicali in forma di nitrato di argento o argento metallico e sottoforma di nanoparticelle per il rivestimento funzionale di superfici di dispositivi medici, impianti e materiali chirurgici (45) (46) (47).

2.7.3. AgNPs: nanomedicina e applicazioni

Le nanotecnologie nascono da una necessità di precisione assoluta, un totale controllo dei processi, selettività maggiore e minore uso di energia rispetto alle metodologie tradizionali. Intorno agli anni novanta del Novecento si è sviluppata la tendenza ad utilizzare nanomateriali e nanotecnologie per applicazioni mediche, con l'obiettivo di

contribuire alla tutela della salute, lavorando a livello molecolare per ottenere benefici medici e clinici. È iniziata così l'era della nanomedicina. In questo scenario, alcuni metalli come l'argento, già noto per le sue proprietà antimicrobiche contro funghi, virus e batteri, sono stati sintetizzati in forma nanoparticellare con una dimensione compresa tra 1 e 100 nm. Le nanoparticelle di argento, abbreviate dall'inglese AgNPs, sono tra i materiali più utilizzati per la funzionalizzazione di superfici destinate al rivestimento di dispositivi medici e medico-chirurgici, protesi (come protesi ossee, valvolari e vascolari) ed impianti. Le infezioni nosocomiali originano sia dalla presenza di un ambiente ospedaliero contaminato, sia dalla contaminazione crociata tra pazienti e personale medico. L'utilizzo, da parte di questi, di strumenti e dispositivi contaminati può aumentarne il rischio; per questa ragione la possibilità di funzionalizzarne le superfici con materiali intrinsecamente antimicrobici può risultare una valida strategia nel limitarne la diffusione. Le ridotte dimensioni delle nanoparticelle di argento conferiscono alle stesse proprietà chimico-fisiche diverse rispetto al metallo allo stato nativo. Il vantaggio dell'uso di argento in forma nanoparticellare, rispetto alla sua forma ionica, sembra essere il fatto che riduca la tossicità cellulare senza diminuirne l'efficacia antibatterica. Per ottenere una buona attività antimicrobica è necessario avere una concentrazione di argento adeguata, nell'intervallo di 10^{-9} mol/L, sia sulla superficie interna che su quella esterna del dispositivo medico impiantabile. Tali concentrazioni possono essere realizzate in soluzione solo se vi è una superficie abbastanza ampia di argento e grazie all'interazione dello stesso allo stato elementare con elettroliti. Con una nuova tecnologia, l'argento metallico è distribuito in particelle di diametro compreso tra 1 e 4 μm in poliuretano, corrispondente ad una concentrazione pari allo 0,8 % in una superficie attiva di $450 \text{ cm}^2/\text{g}$ poliuretano. La superficie dei batteri avente carica negativa attrae gli ioni di argento

carichi positivamente. Le concentrazioni rilasciate dal poliuretano sono di gran lunga inferiori alle concentrazioni tossiche per gli esseri umani (48). Nella prospettiva di ulteriori sviluppi nelle potenziali applicazioni delle nanoparticelle, è di particolare importanza l'adeguamento dei tradizionali e consolidati metodi di valutazione dei rischi, in particolare nel campo delle nanotecnologie biomediche e delle nanobiotecnologie. In conclusione, è interessante notare come le AgNPs sembrano aver attirato un crescente interesse verso numerose applicazioni: nell'ingegneria tessile infatti vengono utilizzate nelle fibre di molti vestiti, soprattutto di uso sportivo, per la loro attività antibatterica e la loro capacità di eliminare i cattivi odori. L'impiego è rivolto anche al settore cosmetico per la produzione di detersivi e saponi, all'ambito alimentare per la conservazione di prodotti in scatola e al settore tecnologico, soprattutto in ambito domestico, per la produzione di lavatrici in grado di rilasciare ioni Ag^+ nel bucato, garantendo un buon tasso di abbattimento microbico.

2.7.4. Sintesi AgNPs: accenni

In letteratura sono riportate numerose strategie per sintetizzare nanoparticelle di argento (AgNPs), che includono metodi di tipo chimico, fisico e biologico (Figura 16) (49). I primi due richiedono l'utilizzo di materiali costosi, sono dispendiosi in termini energetici e hanno una bassa resa di produzione. Il metodo biologico, invece, permette di ottenere AgNPs meno tossiche per l'organismo con un impatto ambientale ridotto rispetto all'approccio chimico (50).

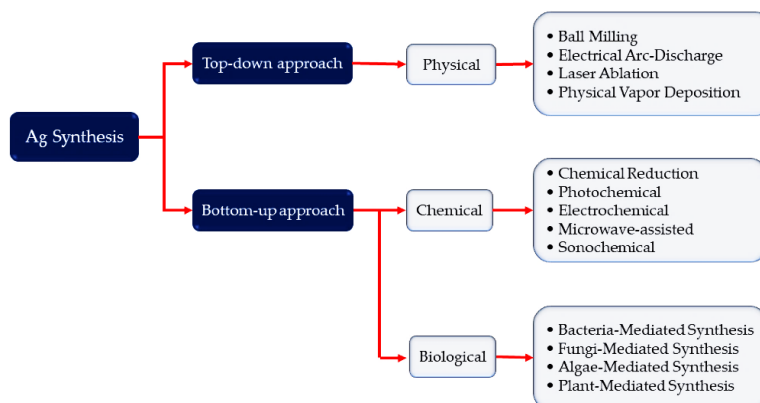


Figura 16: schema illustrativo delle varie vie sintetiche per la produzione di AgNPs. Crediti immagine: (49)

Come riportato nello schema sopra, il metodo fisico, nella produzione di AgNPs, prevede un approccio definito *top-down*, dall'altro al basso, ovvero per l'ottenimento di nanoparticelle si utilizzano componenti in ridotti volumi e in forma molecolare, mentre l'approccio *bottom-up*, dal basso all'alto, caratteristico del metodo chimico e biologico, prevede l'ottenimento di AgNPs partendo da grandi volumi di materiali sfusi. Il metodo fisico in linea teorica porta all'ottenimento di una miscela a distribuzione nanoparticellare omogenea ma presenta, a livello pratico, problemi di tipo formulativo per l'assenza di agenti chimici stabilizzanti che non prevengono l'agglomerazione delle particelle. Inoltre richiede un elevato dispendio energetico per l'utilizzo di apparecchiature ed impianti sofisticati. Con questo metodo si ottengono NPs di dimensioni comprese tra 10 e 100 nm. Il metodo chimico, che comprende diverse possibili strategie di processo con un approccio *bottom-up*, è ancora largamente impiegato per l'elevata velocità con cui si ottengono nanoparticelle, garantendo un vantaggio in termini di tempistiche rispetto agli altri metodi. Si ottengono NPs con una distribuzione dimensionale compresa tra 1 e 400 nm. In modo equivalente al metodo fisico però è richiesta un'elevata quantità di energia che porta ad un aumento non indifferente del costo di produzione. Inoltre, l'utilizzo di

reagenti chimici che devono essere allontanati in fase finale di sintesi, ne limita l'applicazione all'ambito farmaceutico e richiede particolari protocolli per lo smaltimento delle stesse sostanze; ciò grava ulteriormente sul bilancio economico del processo (49). Molti dei metodi chimici prevedono l'utilizzo di agenti riducenti come il boroidrurio di sodio (NaBH_4) per ridurre Ag^+ a Ag^0 e di agenti stabilizzanti, come il polivinilpirrolidone (PVP), per prevenire l'aggregazione particellare e controllarne la crescita dimensionale. Tuttavia, queste preparazioni non risultano stabili e non permettono lo *scale-up*, ovvero il passaggio di produzione da scala laboratoriale a scala industriale. Per ovviare alle problematiche sopra riportate, negli ultimi anni la ricerca si sta concentrando verso un'alternativa per la sintesi delle AgNPs, rappresentata dal metodo biologico secondo approccio *bottom-up*. L'ottenimento di nanoparticelle più *human-* ed *environment-friendly* rappresenta un importante traguardo ed una spinta verso la ricerca in questo campo. Organismi diversi come batteri, funghi, alghe e piante possono fungere da mediatori per il processo sintetico. Un batterio Gram-positivo, mesofilo, comunemente utilizzato è *Bacillus licheniformis*. Questo microrganismo si trova comunemente nel terreno e sulle piume del petto e della schiena degli uccelli. Utilizzando una soluzione iniziale di nitrato di argento (AgNO_3) e in particolari condizioni sperimentali, è in grado di formare nanoparticelle di argento (51). Inoltre, in letteratura sono riportate sintesi che utilizzano estratti di foglie delle piante *Allophylus cobbe* e *Areca catechu* per la produzione di AgNPs (50) (52) (53).

2.7.5. Effetto antimicrobico: meccanismo d'azione delle AgNPs

L'argento è un metallo universalmente riconosciuto per avere proprietà antimicrobiche: agisce contro i batteri come stafilococchi e streptococchi, i virus e i funghi, non solo i comuni ceppi che causano infezioni, ma anche quelli virulenti resistenti agli antibiotici.

Basta un contatto di pochi minuti con i microrganismi per indurre citotossicità e morte. Non è noto alcun agente patogeno che sia mutato in un ceppo resistente all'argento, poiché il tempo di replicazione dei batteri è molto superiore rispetto alla velocità d'azione battericida del metallo stesso. Un aspetto interessante è che, di norma, i batteri utili all'organismo umano presenti nell'intestino crasso vengono risparmiati, dato che l'argento viene riassorbito al più tardi nell'intestino tenue, per via ematica o linfatica (54). I prodotti a base di argento sono tutti venduti con il nome di "argento colloidale", tuttavia i tipi esistenti sono tre: argento ionico in soluzione o con aggiunta di proteine a scopo stabilizzante, argento colloidale vero e proprio, costituito quasi esclusivamente da nanoparticelle in sospensione in acqua bidistillata e i sali di argento venduti come farmaci o presidi medico-chirurgici ben conosciuti in ambito medico. L'argento è risultato essere un ottimo agente antimicrobico nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Tuttavia, è risultato essere più efficace nei confronti di quest'ultimi a causa della differente costituzione della parete cellulare; l'una, quella dei Gram-positivi, caratterizzata da uno spesso strato di peptidoglicano (20-80 nm), l'altra, quella dei Gram-negativi, costituita da una porzione relativamente più sottile dello stesso (55). Sebbene il meccanismo d'azione proposto per l'argento come agente antimicrobico sia ancora non completamente definito, le teorie più accreditate ritengono che sia le nanoparticelle sia gli ioni del metallo, rilasciati a seguito dell'ossidazione chimica dello stesso in ambiente acquoso e in condizioni aerobiche, abbiano un'azione citotossica. Questa si esplica per contatto diretto del materiale con la parete cellulare batterica, favorendone la distruzione per legame con i gruppi sulfidrilici delle proteine e degli enzimi costituenti, e permettendo la penetrazione del metallo nel citoplasma del microrganismo. È stata osservata la formazione di fori sulla parete cellulare batterica, causati da una degradazione del

peptidoglicano, rottura dei legami glicosidici e rilascio di acido muramico. Inoltre, si è osservata una degradazione nella parete dei batteri Gram-positivi degli acidi lipoteicoici, essenziali per la crescita e il metabolismo dei microrganismi (50). Nel citoplasma l'argento reagisce con proteine, lipidi, genoma e, in alcuni casi, con gli enzimi costituenti la catena respiratoria, generando specie reattive dell'ossigeno (ROS), come perossido di idrogeno (H_2O_2), ione idrossile (OH^-) e superossido (O_2^-), che inducono stress ossidativo alle componenti cellulari, provocando danni a proteine, acidi nucleici, inibendo la produzione di ATP e favorendo la perossidazione lipidica (55). In aggiunta, è stato osservato che la presenza di ioni all'interno della cellula batterica porta a modificazioni del pH e della pressione osmotica citoplasmatica (50). In conclusione, si deduce che l'efficacia antibatterica dell'argento sia maggiore nei batteri Gram-negativi rispetto ai batteri Gram-positivi perché il metallo stesso è in grado di raggiungere più efficacemente e in un tempo ridotto il citoplasma cellulare dove esplica le diverse azioni che lo vedono coinvolto (Figura 17).

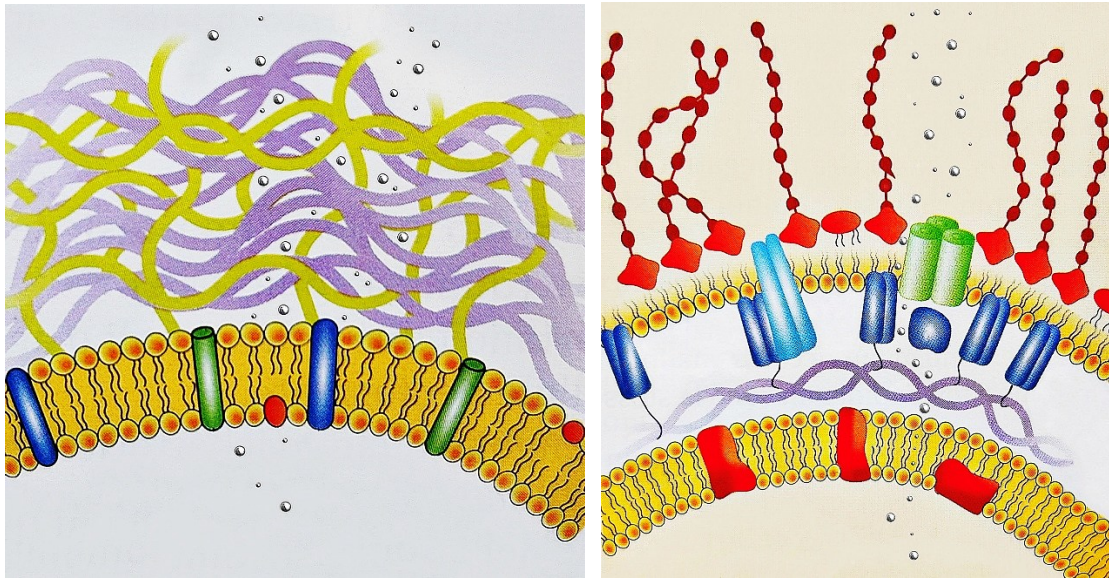


Figura 17: penetrazione delle nanoparticelle di argento attraverso le pareti cellulari dei batteri Gram-positivi (a sinistra) e dei batteri Gram-negativi (a destra). Crediti immagine: libro di testo Microbiologia Farmaceutica; N. Carlone, R. Pompei, V. Tullio; III edizione, anno 2021. Modifica a cura di: Letizia Pasini.

In realtà la letteratura più recente riporta che sarebbero gli ioni argento (Ag^+), anziché le nanoparticelle di questo elemento, ad essere tossici per i batteri, provocandone la morte per lisi cellulare. È stato inoltre scoperto che le AgNPs se poste all'interno di camere anaerobiche non hanno alcun effetto antibatterico; questo perché è impedito loro di ossidarsi. È quindi importante la regolazione del flusso ionico attraverso lo studio della dimensione e della forma dei nanomateriali, al fine di ottenere un effetto battericida il più potente possibile. L'argento colloidale non ha alcuna azione sugli enzimi del corpo umano, essendo essi molto diversi da quelli delle forme di vita monocellulari. Viene quindi largamente utilizzato per la cura e prevenzione di numerose malattie come disturbi agli occhi, alle vie respiratorie, alla pelle, all'apparato locomotore e al sistema nervoso. È inoltre in grado di sostenere ed alleggerire il sistema immunitario. Utilizzato nei giusti dosaggi e modi è pressoché privo di effetti collaterali. Oltre a svolgere un'azione antinfiammatoria, gli ioni argento favoriscono la formazione di nuovo tessuto epiteliale ed accelerano la cicatrizzazione. Nella fase iniziale della guarigione il tessuto ferito

assorbe più argento che nelle fasi successive, in quanto l'epitelio sano costituisce, a differenza di una lesione esposta, una parziale barriera per il metallo. L'argento colloidale, inoltre, agevola la produzione di cellule indifferenziate destinate a sostituire quelle invecchiate o danneggiate, attraverso un'influenza positiva sull'apoptosi cellulare esercitata dagli ioni dello stesso. Studi sperimentali hanno evidenziato che l'argento stimola la produzione di specifiche proteine nelle cellule epiteliali, chiamate metallotioneine, le quali svolgono un ruolo fondamentale nella disintossicazione dell'organismo da metalli pesanti come cadmio (Cd) e mercurio (Hg) e nel favorire la riparazione dei tessuti. Per questo motivo, oltre alla sulfadiazina di argento, presente sul mercato da diversi anni, sono oggi largamente impiegate compresse e medicazioni in grado di rilasciare ioni Ag^+ . Tuttavia, un uso scorretto dell'argento può comportare rischi significativi per la salute: i composti argentei possono essere assorbiti nel sistema circolatorio e accumularsi nei tessuti, provocando argiria. Questa patologia si manifesta inizialmente con una colorazione grigio-nera permanente della pelle, dovuta alla formazione superficiale di Ag e Ag_2S , e può evolvere in bronchiti croniche, danni renali e sclerosi arteriosa. L'ingestione orale di composti come il nitrato di argento (AgNO_3) può causare un'intossicazione rapida e grave, con sintomi progressivi quali vomito, dolori addominali, gastroenterite, collasso e, in dosi pari o superiori a 10 g in un adulto, può risultare fatale. Inoltre, lo ione argento interagisce con gli acidi nucleici, formando legami con le basi azotate. (54). Se nella prima decina di anni del XXI secolo l'argento è stato considerato non avente alcun ruolo negli equilibri biologici degli esseri umani, attualmente è doveroso precisare, secondo recenti studi che, essendo un microbicide ad ampio spettro, non sono note le conseguenze che, un uso illecito dello stesso, porta sul microbiota umano (56). Diversi studi, seppur limitati, indicano che l'argento colloidale

non tende ad accumularsi nell'organismo umano, nemmeno nei tessuti solitamente predisposti all'accumulo di metalli, come capelli e unghie. La maggior parte della quantità assunta viene eliminata attraverso le urine, mentre la minima parte residua, presente al momento della sospensione dell'assunzione, viene completamente escreta con le feci entro un periodo massimo di trenta giorni. Tale intervallo può ridursi ulteriormente in caso di abbondante assunzione di acqua. (57).

2.7.6. LPS ed effetto fototermico

Quando si parla di nanostrutture metalliche esposte ad una radiazione elettromagnetica è necessario introdurre il concetto di moto plasmonico. A differenza di materiali isolanti, gli elettroni di valenza delle nanostrutture metalliche sono debolmente legati agli ioni che per questa ragione, sotto l'azione di un campo elettrico oscillante nel tempo, sono in grado di sostenere delle oscillazioni collettive, in cui tutti gli elettroni si muovono in fase alla frequenza di plasma. Il ruolo del campo elettrico è quella di applicare una forza al fine di trasferire energia al sistema massa-molla, il quale possiede una sua frequenza di risonanza. Il moto oscillatorio sinusoidale del campo elettrico è detto plasmone. Le oscillazioni degli elettroni di valenza dipendono dal materiale, dalla dimensione e dalla forma (33). La risonanza plasmonica di superficie localizzata (LSPR) è quindi una banda di assorbimento che caratterizza le nanoparticelle. Queste infatti, se colpite da un raggio laser con una determinata lunghezza d'onda, sono in grado di assorbire la luce e di convertirla in calore e risulta quindi possibile sfruttarne l'effetto fototermico. Gli effetti della luce laser sono diversi da tessuto a tessuto e sono correlati con l'affinità che le sostanze, in esso contenute, hanno con una certa lunghezza d'onda. Si definisce tempo di rilassamento termico (TRT) il tempo necessario perché il calore generato

dall'assorbimento dell'energia luminosa all'interno del tessuto irradiato si riduca del 50%. Il tempo di rilassamento termico del tessuto caratterizza il regime di confinamento del calore. Infatti, se il tempo di emissione della luce laser è minore del tempo di rilassamento termico del tessuto, il calore rimarrà confinato nel volume irradiato; pertanto, il forte aumento di temperatura e il relativo danno termico saranno confinati in tale regione. In questo modo tessuti circostanti subiranno un ben più modesto riscaldamento dovuto alla successiva diffusione termica. Al contrario, se il tempo di emissione della luce laser è maggiore del tempo di rilassamento termico del tessuto, il calore avrà modo di diffondersi all'interno del tessuto su distanze maggiori della profondità di penetrazione ottica tipica, e potrà arrecare danni ai tessuti circostanti (58).

2.7.7. L'attività dell'argento contro i virus: focus SARS-CoV-2

Gli ultimi 5 anni, dal 2020 ad oggi, verranno storicamente ricordati per la pandemia di SARS-CoV-2 contro la quale il mondo ha cercato di difendersi (Figura 18). Se le proprietà antibatteriche dell'argento sono note da millenni, le proprietà antivirali dello stesso e i meccanismi d'azione che lo vedono coinvolto, non sono ancora state chiarite in modo definitivo. In letteratura sono ancora pochi i lavori che trattano il possibile impiego dell'argento come agente antivirale e sono tutti relativamente recenti, pubblicati negli ultimi anni, in risposta ad una ricerca frenetica nell'individuare una possibile terapia contro COVID-19. I virus emergenti e ri-emergenti rappresentano un problema non indifferente per l'umanità. Ad oggi i vaccini rappresentano la terapia più efficace ed adatta nel contrastare tali infezioni ma non sono disponibili per tutte le categorie e i ceppi virale (59).

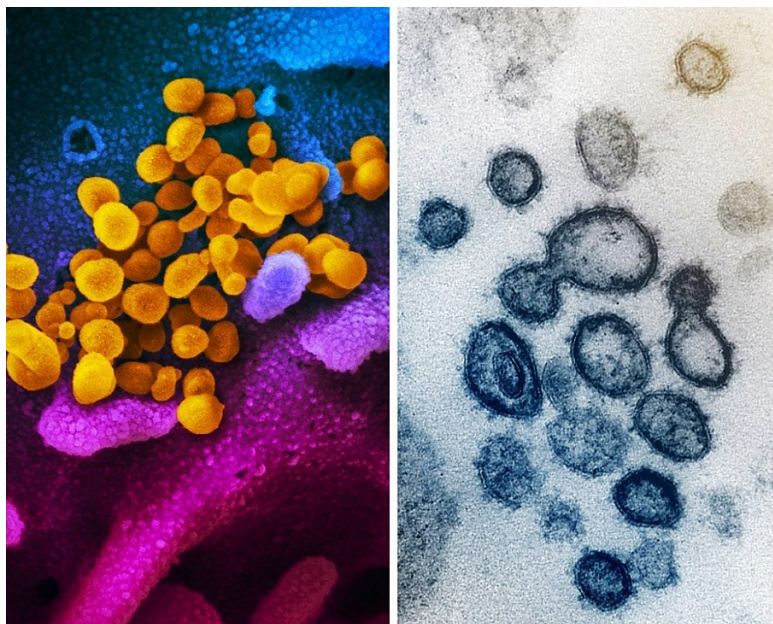


Figura 18: particelle virali di SARS-CoV-2 emergenti da cellule infette, acquisite mediante microscopio elettronico a scansione (SEM) a sinistra e microscopio elettronico a trasmissione (TEM) a destra. Crediti immagini: Rocky Mountain Laboratories (RML), United States National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).

Il meccanismo d'azione delle nanoparticelle di argento, come sopra citato, non è ancora stato chiarito e i fattori che influenzano l'attività antivirale, analogamente all'attività antibatterica, non dipendono solo dalla composizione del metallo ma anche dalla dimensione, forma, funzionalizzazione e concentrazione dello stesso. In letteratura sono riportate diverse ipotesi sulla capacità dell'argento di agire nei confronti dei virus (Figura 19): le più condivise sono l'azione diretta del metallo contro il virus in forma libera nell'ambiente, l'inibizione degli steps primari della replicazione virale, l'inibizione del processo di penetrazione del virus nella cellula ospite per legame con i recettori cellulari, l'alterazione morfologica dei virioni, ovvero di singole particelle virali mature, e il danneggiamento irreversibile di componenti strutturali virali come le glicoproteine costituenti l'envelope e le proteine del capsido (59).

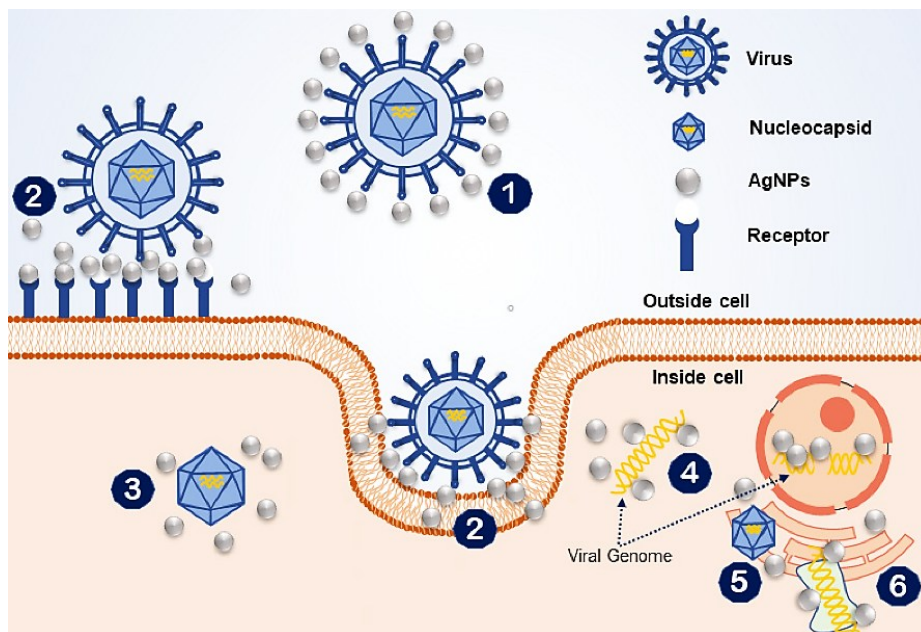


Figura 19: possibili meccanismi antivirali delle nanoparticelle di argento. 1: azione delle AgNPs sulle cellule virali libere. 2: inibizione del processo di penetrazione per legame delle AgNPs con i recettori cellulari/interazione delle AgNPs con la membrana cellulare della cellula ospite ed impedimento di adesione del virus alla stessa. 3: danneggiamento da parte delle AgNPs delle strutture del capside. 4: interazione delle AgNPs con il genoma virale. 5: inibizione della replicazione del genoma. 6: inibizione dei fattori cellulari necessari alla replicazione virale. Crediti immagine: (49)

SARS-CoV-2 è un virus rivestito di dimensione compresa tra i 100 e 150 nanometri, appartenente alla famiglia *Coronaviridae* e al genere *Betacoronavirus* (Figura 20 a - b). È stato scoperto nel mese di dicembre dell'anno 2019 nella città di Wuhan, nella provincia Hubei, in Cina.

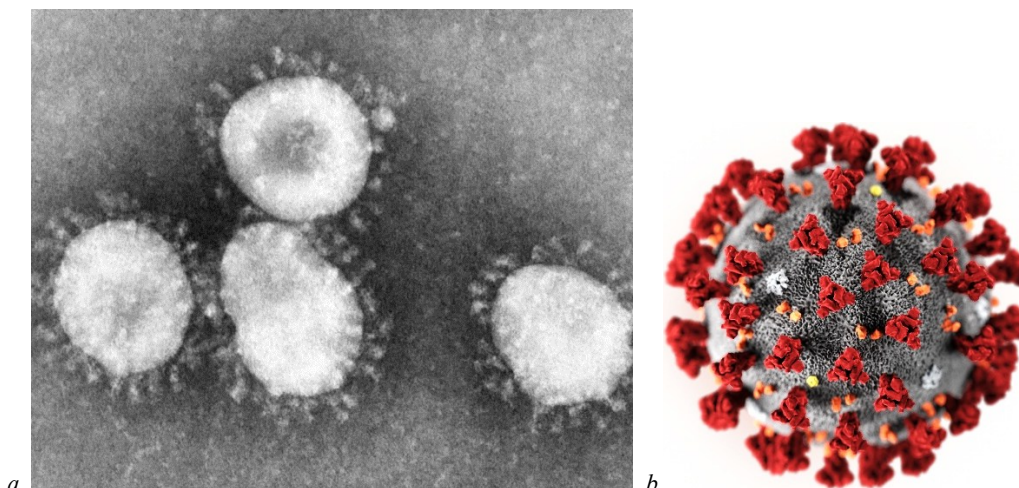


Figura 20: coronavirus (a) ed illustrazione grafica di SARS-CoV-2 (b). Crediti immagine a: Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library, 1975. Crediti immagine b: Università Vita-Salute San Raffaele, Milano.

SARS-CoV-2 è costituito, procedendo dall'esterno verso l'interno, dal *peplos*, ovvero dal pericapside, un involucro aggiuntivo di natura membranacea, di codificazione cellulare e di natura fosfolipidica e glicoproteica, costituito da spicole della lunghezza di 20 nm formate da glicoproteine S, definite *spike* dall'inglese "punta/spuntone". Tre di queste costituiscono un trimero; nell'insieme questi trimeri formano la corona esterna del virus. Ogni spicola presenta tre domini, due interni ed uno esterno con proprietà antigeniche. Le glicoproteine S hanno la capacità di legarsi ai recettori ACE2 (enzima 2 convertitore dell'angiotensina), presenti principalmente nel tratto respiratorio. Nella struttura dell'envelope si identificano inoltre tre diverse proteine quali M, HE e E. La proteina M interagisce con il complesso RNA-proteina ed è fondamentale nella fase di assemblaggio del virus in seguito a replicazione, il dimero emagglutinina-esterasi (HE) è coinvolto nel rilascio del virus all'interno della cellula ospite mentre la proteina E, insieme alla glicoproteina S, concorre all'adesione del virus alla cellula bersaglio. Infine, il genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva di circa 32 kb è contenuto all'interno del nucleocapside, che concorre, oltre alla protezione dello stesso, all'assemblaggio del virus

(60). L'azione antivirale delle nanoparticelle di argento nei confronti di SARS-CoV-2 sembra essere riconducibile alla loro capacità di attaccare e distruggere i ponti disolfuro delle glicoproteine S, compromettendone in modo irreversibile la struttura ed impendendo conseguentemente il legame con i recettori ACE2. Tanto più piccola risulta essere la dimensione delle nanoparticelle tanto maggiore è l'effetto tossico osservato a causa di una maggior contatto tra i gruppi sulfidrilici delle proteine e l'estesa area superficiale particellare. Ad oggi esistono numerose formulazioni a base di argento che vengono commercializzate per combattere l'infezione da SARS-CoV-2: alcune di queste sono utilizzabili dall'uomo come forme farmaceutiche ingeribili o inalabili, mentre altre sono destinate ad essere utilizzate su superfici inanimate come disinfettanti ed igienizzati a base di argento, tessuti in policotone caricati con AgNPs per la produzione di mascherine sanitarie e materiali destinati alla produzione di filtri dell'aria e dispositivi medici. È doveroso ricordare che l'argento è un agente antimicrobico ad ampio spettro che pertanto, se utilizzato in modo inappropriato, può portare a modificazioni del microbiota commensale umano e del microbiota ambientale, in caso di errato smaltimento. Le conseguenze di ciò non sono note e pertanto ne è richiesto un utilizzo giustificato e consapevole (56).

3. PREMESSA ALLA PARTE SPERIMENTALE

Una delle maggiori problematiche in campo sanitario è rappresentata dalle infezioni batteriche causate dalla contaminazione di dispositivi medici, come cateteri, protesi ed impianti sottocutanei. I tradizionali antibiotici risultano spesso inefficaci contro i biofilm che si formano su queste superfici, rendendo necessaria, nella maggior parte dei casi, la rimozione del dispositivo infetto. Una possibile risposta a questo problema deriva dal rivestimento di superfici mediche con materiali innovativi quali nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) e nanoparticelle di argento (AgNPs) che, in combinazione, risultano essere efficaci agenti antibatterici. Entrambi i materiali presentano caratteristiche fototermiche che possono essere sfruttate ed “attivate” in caso di necessità attraverso l'utilizzo di radiazione laser nel vicino infrarosso (NIR). Questo trattamento genera ipertermia localizzata, finalizzata al danneggiamento delle cellule batteriche per denaturazione delle componenti proteiche, danneggiamento delle membrane cellulari ed alterazione del genoma. È importante specificare che, se almeno una LSP¹ ricade nella gamma del vicino infrarosso (750 - 950 nm), è possibile utilizzare l'irradiazione per materiali sottocutanei, in quanto, a tali lunghezze d'onda, i tessuti e il sangue sono semi-trasparenti. In letteratura sono riportati alcuni studi dove è stato dimostrato che l'irradiazione nella regione NIR di AgNPs genera un fenomeno di ipertermia tale da aumentare il rilascio di ioni Ag^+ , con conseguente potenziamento dell'azione antibatterica (61). L'argento è, storicamente, noto per essere un valido agente antimicrobico, capace di espletare la propria azione battericida nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi; più recentemente, è stata evidenziata l'azione antibatterica ottenuta mediante l'ipertermia proveniente da strutture plasmoniche di argento puro, argento in soluzione

¹ LPS: *Localized Plasmonic Structure*, ovvero struttura plasmonica localizzata.

colloidale e nanoparticelle di argento (AgNPs) innestate su superfici. Per sfruttare l'effetto fototermico, prima dell'impiego del blu di Prussia e dell'argento, è stato utilizzato l'oro, metallo nobile che tutt'ora viene impiegato in numerosi studi per applicazioni nanomediche, ma che non presenta intrinsecamente proprietà antibatteriche. Ad ogni modo, nano-oggetti d'oro anisotropici, con due o più superfici plasmoniche localizzate di risonanza, che subiscono rilassamento termico quando irradiate, sono in grado di produrre un'ipertermia localizzata in grado di uccidere i batteri. È doveroso ricordare che nel tentativo di trovare una possibile strategia per prevenire e limitare le infezioni nosocomiali, negli anni sono state sviluppate alcune tipologie di superfici funzionalizzate con materiali innovativi, come la combinazione di silano mercaptopropiltrimetossi (MPTS) e AgNPs (62) e polietilenimmina (PEI) e AgNPs (63). Tuttavia, sono ancora pochi gli studi presenti in letteratura che dimostrano una possibile applicazione del blu di Prussia in questo settore. Lo studio condotto, infatti, è stato pensato e realizzato con lo scopo di investigarne le potenzialità. In questo contesto, i campioni oggetto di studio sono stati realizzati presso il laboratorio "*inLAB*" del Dipartimento di Chimica e del Centro per le Tecnologie Sanitarie dell'Università di Pavia. L'analisi e la valutazione dell'attività antimicrobica sono state successivamente condotte presso il Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze del Farmaco della stessa Università, nell'ambito dell'attività sperimentale svolta durante il presente lavoro di tesi.

4. MATERIALI E METODI

Le procedure di preparazione dei campioni descritte nei paragrafi 4.1., 4.2., 4.3. e relativi sottoparagrafi sono state interamente tratte dalla letteratura e descritte secondo quanto riportato in (39) e fonti correlate. Tali procedure, indicate come eseguite presso il laboratorio "*inLAB*" del Dipartimento di Chimica e del Centro per le Tecnologie Sanitarie dell'Università di Pavia, non sono state svolte personalmente dall'autore della presente tesi, ma sono state incluse a scopo descrittivo e per completezza di contenuto. Viceversa, l'analisi e la valutazione dell'attività antimicrobica, riportate nei paragrafi 4.4. e 4.5., sono state interamente svolte dall'autore durante l'internato presso il Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze del Farmaco della medesima Università, nell'ambito del lavoro sperimentale oggetto di questa tesi. Il paragrafo 4.6. e i relativi sottoparagrafi riportano l'elenco dei materiali e delle apparecchiature impiegati nel corso delle attività sperimentali descritte nei paragrafi precedenti, distinguendo tra quelli utilizzati presso il laboratorio "*inLAB*" del Dipartimento di Chimica e del Centro per le Tecnologie Sanitarie, e quelli utilizzati presso il Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Pavia.

4.1. Sintesi delle nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs)

La sintesi delle nanoparticelle di blu di Prussia è stata eseguita presso il laboratorio chimico "*inLAB*", seguendo come modello la procedura descritta per la preparazione delle PBNPs di "tipo 1" nel lavoro pubblicato dal gruppo di ricerca del Prof. Giacomo Dacarro, relativo ai monostrati auto-assemblati di nanoparticelle di blu di Prussia (64). Tuttavia, rispetto alla sintesi originale, sono state apportate alcune modifiche, di seguito riportate: la concentrazione dei sali ferrici è stata incrementata dall'iniziale

concentrazione di 1 mM a 10 mM. Un quantitativo pari a 0,2 mmol di cloruro ferrico esaidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 0,5 mmol di acido citrico sono stati dissolti in un volume di 20 mL di acqua. La soluzione ottenuta è stata posta sotto agitazione alla temperatura di 60°C. Una seconda soluzione è stata preparata unendo 0,2 mmol di esacianoferrato di potassio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e 0,5 mmol di acido citrico in un volume di 20 mL di acqua. Successivamente, anch'essa è stata posta sotto agitazione alla temperatura di 60°C. In un secondo momento le due soluzioni precedentemente preparate sono state miscelate fino a formare una soluzione di colorazione blu intenso, che è stata posta sotto agitazione prima per 5 minuti a 60°C e poi a temperatura ambiente (25°C) per 30 minuti. In seguito, un volume di 10 mL della soluzione formata è stato centrifugato per 25 minuti a 13000 rpm (giri/minuto) in una provetta per la purificazione per rimuovere l'eccesso di reagenti. Le nanoparticelle sintetizzate in forma colloidale sono state successivamente riprese in egual volume. In un secondo momento è stata valutata la forma e la dimensione delle nanoparticelle di blu di Prussia mediante l'utilizzo del microscopio elettronico a trasmissione (TEM) presente al Centro Grandi Strumenti dell'Università di Pavia. I *grids*² utilizzati per il caricamento del campione nello strumento (Figura 21) sono stati messi in contatto con la sospensione di PBNPs che, una volta asciugata a seguito dell'evaporazione della componente acquosa, ha permesso l'analisi allo strumento.

² *Grids*: in italiano griglie. Sono supporti sottili, generalmente a forma di rete, utilizzati per supportare il campione durante l'analisi mediante microscopia elettronica a trasmissione. Possono essere realizzati in vari materiali come nichel, rame e silicio oppure possono essere rivestiti di materiale polimerico.

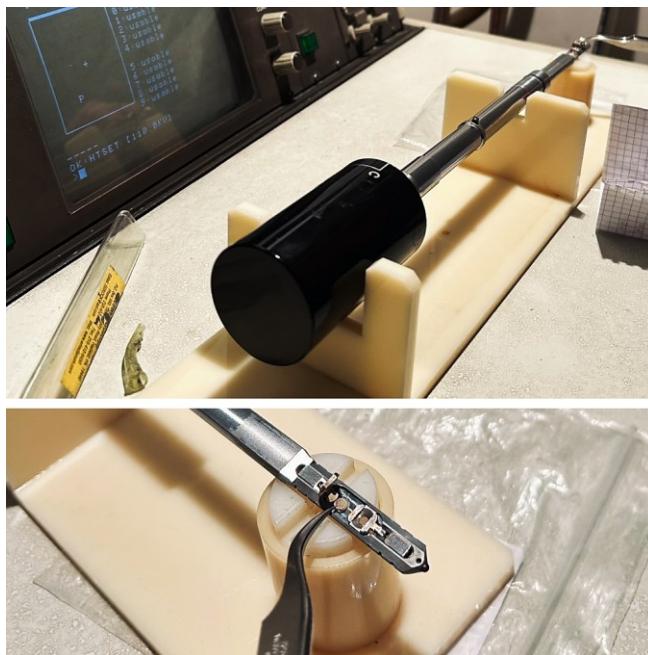


Figura 21: caricamento del campione mediante grid nel microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Crediti immagine: Laura Ghidoni e Letizia Pasini.

Il processo sintetico sopra descritto ha permesso l'ottenimento di PBNPs di forma cubica (Figura 22) ed aventi una dimensione pari a circa 29 ± 8 nm.

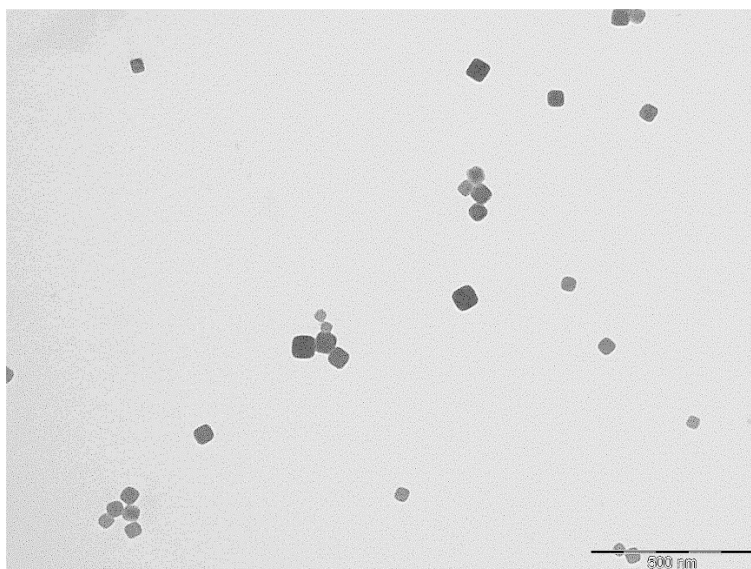


Figura 22: immagine acquistata con microscopio elettronico a trasmissione (TEM) raffigurante PBNPs. Crediti immagine: Laura Ghidoni e Letizia Pasini

4.2. Sintesi della nanoparticelle di argento (AgNPs)

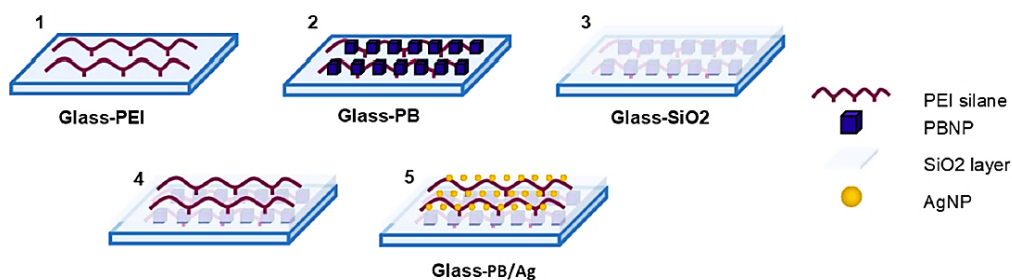
La sintesi delle nanoparticelle di argento è stata eseguita presso il laboratorio chimico “inLAB”, seguendo come modello la procedura descritta per la preparazione delle AgNPs nel lavoro pubblicato dal gruppo di ricerca del Prof. Piersandro Pallavicini nel 2010, relativo ai monostrati auto-assemblati di nanoparticelle di argento innestati su superfici di vetro (62). La procedura, di seguito riportata, non è stata modificata rispetto all’originale. Ad un volume di 100 mL di acqua molto fredda sono stati aggiunti in sequenza e sotto agitazione i seguenti reagenti: 1 mL 1% (p/v) di soluzione di nitrato di argento (AgNO_3), un volume di 1 mL 1% (p/v) di citrato di sodio dopo un minuto e un volume di 0,5 mL di una soluzione costituita al 0,075% in peso di boroidruro di sodio (NaBH_4) e al 1% in peso di citrato di sodio dopo altri 60 secondi. Le AgNPs sono state caratterizzate mediante spettroscopia UV, poiché la loro ridotta dimensione, inferiore a 10 nm, insieme alle limitazioni della strumentazione disponibile, non ha permesso di effettuare un’analisi morfologica e dimensionale accurata tramite tecniche come la diffusione dinamica della luce (DLS, Dynamic Light Scattering) e la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Nella sintesi di AgNPs è stato scelto di utilizzare il citrato di sodio come agente direzionante³ al posto di molecole di tensioattivo, in quanto possono arrecare effetti tossici sulla salute (65).

4.3. Preparazione dei campioni

Come sopra esplicitato, i campioni oggetto di analisi sono stati preparati dal laboratorio “inLAB” del Dipartimento di Chimica e del Centro per le Tecnologie Sanitarie

³ Agente direzionante: in inglese *capping agent* o *shape-directing agent*, è una sostanza chimica che, durante la sintesi di nanoparticelle, ne controlla la forma, la dimensione e la crescita cristallina.

dell'Università di Pavia. Di seguito sono illustrate e descritte le cinque fasi previste per la preparazione dei campioni. L'immagine riportata ha finalità puramente esplicative, poiché la funzionalizzazione è stata effettuata per entrambi i lati dei vetrini.



4.3.1. Preparazione dei monostrati auto-assemblati PEI-silano



Inizialmente i supporti di vetro sono stati lavati per 30 minuti con soluzione Piranha, un noto agente fortemente ossidante, costituita da acido solforico (H₂SO₄) e perossido di idrogeno al 30% (H₂O₂) nelle proporzioni 3:1 v/v. Successivamente sono stati lavati per tre volte con acqua bidistillata mediante l'utilizzo di sonicatore ed asciugati in stufa alla temperatura di 140°C. L'innesto di polietilenimmina (PEI) sulla superficie silicea è stato eseguito secondo la procedura riportata nel lavoro pubblicato dal gruppo di ricerca del Prof. Giacomo Dacarro nel 2011, relativo all'innesto di PEI su superfici piatte di vetro (66). I vetri sono stati immersi in una soluzione al 4% (v/v) di PEI-silano⁴ in etanolo

⁴ Soluzione PEI-silano: soluzione costituita da polietilenimmina e silano, ovvero tetraidruo di silicio, di formula SiH₄.

(C₂H₆O) per un tempo di sei minuti a temperatura ambiente (25°C). Successivamente sono stati lavati per due volte con etanolo ed una volta con acqua bidistillata (in sonicatore), dopodiché sono stati asciugati mediante l'utilizzo di flusso di azoto.

4.3.2. Innesto delle PBNPs sui PEI-SAMs⁵



L'innesto delle nanoparticelle di blu di Prussia sulla superficie dei campioni è stato eseguito secondo la procedura descritta nel lavoro pubblicato dal gruppo di ricerca del Prof. Giacomo Dacarro nel 2017, relativo ai monostrati auto-assemblati di nanoparticelle di blu di Prussia (64). I campioni sono stati immersi tutta la notte nel colloide costituito dalle PBNPs. Trascorso il tempo necessario sono stati lavati con acqua bidistillata e sonicati per tre minuti. Successivamente sono stati asciugati con flusso di azoto. Il legame tra il vetrino funzionalizzato con PEI e le PBNPs avviene tramite interazioni elettrostatiche, in quanto il PEI (polietilenimina) presenta gruppi amminici protonati (NH_3^+) che conferiscono carica positiva, mentre le PBNPs sono caricate negativamente.

⁵ *SAMs*: dall'inglese *Self-Assembled Monolayers*, ovvero monostrati auto-assemblati. Questo termine fa riferimento a strati ordinati di molecole che si organizzano spontaneamente su una superficie solida, formando un singolo strato molecolare con spessore ben definito.

4.3.3. Addizione del rivestimento siliceo



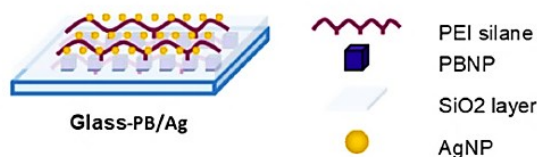
I campioni successivamente sono stati immersi in una soluzione al 0,3% (v/v) di ortosilicato di tetraetile (TEOS) in etanolo (C_2H_6O) per un tempo di due ore a 40°C. Successivamente sono stati lavati in sonificatore per due volte per tre minuti con etanolo ed in seguito sono stati asciugati mediante l'utilizzo di flusso di azoto. L'aggiunta del rivestimento siliceo si è resa necessaria sia per proteggere le nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs), sia per prevenire eventuali interazioni indesiderate con le nanoparticelle di argento (AgNPs) introdotte in una fase successiva.

4.3.4. Addizione dei PEI-silano SAMs sul rivestimento siliceo



La procedura per la derivatizzazione del rivestimento siliceo con PEI-silano è analoga a quanto riportato nel paragrafo 4.3.1.

4.3.5. Innesto delle AgNPs



Infine, i vetri funzionalizzati sono stati immersi per 15 minuti in una soluzione colloidale di nanoparticelle di argento (AgNPs). Trascorso questo lasso di tempo i vetri sono stati lavati per due volte con acqua bidistillata e asciugati mediante l'utilizzo di flusso di azoto. Il legame tra il vetrino funzionalizzato con PEI e le AgNPs avviene tramite interazioni elettrostatiche, analogamente a quanto riportato per le PBNPs, in quanto il PEI (polietilenimmina) presenta gruppi amminici protonati ($-\text{NH}_3^+$) che conferiscono carica positiva, mentre le AgNPs sono caricate negativamente.

4.3.6. Determinazione del contenuto totale di ferro (Fe) e argento (Ag) sui vetri funzionalizzati

I vetri funzionalizzati sono stati immersi in una soluzione di acqua règia⁶ diluita (rapporto 4:25 con acqua) all'interno di un becher, e mantenuti in agitazione per una notte. Al termine dell'incubazione, il campione di vetro è stato rimosso e la soluzione ottenuta è stata direttamente sottoposta ad analisi mediante ICP-OES, senza ulteriori trattamenti. Per gli esperimenti di rilascio di ferro (Fe) e argento (Ag), ciascun vetrino è stato immerso in 3 mL di acqua bidistillata contenuti in un becher da 50 mL, per un tempo prestabilito di 5 o 24 ore. Al termine dell'esposizione, il vetro è stato rimosso e alla soluzione è stato aggiunto acido nitrico (HNO_3) ultrapuro fino al raggiungimento di una concentrazione

⁶ Acqua règia: miscela altamente corrosiva costituita da acido nitrico (HNO_3) concentrato e acido cloridrico (HCl) concentrato in rapporto 1:3.

finale del 4%. Le concentrazioni di Fe e Ag disciolti sono state successivamente determinate mediante spettroscopia di emissione ottica a plasma induttivamente accoppiato (ICP-OES).

4.4. Determinazione dell'effetto microbica (ME)

La determinazione dell'effetto microbica dei campioni caricati con PBNPs e AgNPs è stata valutata attraverso la conduzione dello studio su batteri planctonici, ovvero batteri liberi in sospensione in un liquido, non attaccati a superfici né organizzati in biofilm. I microrganismi utilizzati sono stati *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC⁷ 15442) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Questi sono stati fatti crescere in un volume di 5 mL di terreno di coltura TSB⁸, in incubatore, alla temperatura di 37 °C per un tempo pari a 24 ore. Dopo aver accertato la corretta crescita e lo stato funzionale delle cellule tramite osservazione al microscopio di un'aliquota di 10 µL prelevata dalla coltura overnight, le cellule batteriche sono state centrifugate, il surnatante eliminato e i pellet risospesi in 5 mL di buffer DPBS al 10%. Successivamente è stato prelevato un volume di 700 µL per entrambe le sospensioni batteriche che è stato diluito in un volume di 8 mL di DPBS al 10%. Per entrambe le sospensioni è stata eseguita una misura della densità ottica (OD) mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 650 nm. Durante l'analisi è stato utilizzato un bianco costituito unicamente da DPBS al 10%. Il valore di assorbanza misurato per entrambi i microrganismi è stato di circa 0,35, corrispondente approssimativamente a 1×10^8 unità formanti colonia (UFC/mL). Successivamente, un

⁷ ATCC: dall'inglese *American Type Culture Collection*. Si riferisce ad una delle più grandi banche a livello internazionale di ceppi microbiologici e linee cellulari.

⁸ TSB: dall'inglese *Tryptic Soy Broth*, un terreno di coltura d'uso generale utilizzato per la crescita di una larga varietà di microrganismi aerobi e anaerobi facoltativi, incluso alcuni funghi. Contiene diversi elementi presenti in diversa percentuale come digerito pancreatico di caseina, peptone di soia, NaCl, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, glucosio monoidrato ed acqua purificata.

volume di 10 μ L della sospensione batterica è stato depositato su un vetrino da microscopio standard (76 $\times$ 26 mm). La goccia è stata poi coperta con un vetrino funzionalizzato (22 $\times$ 26 mm), in modo da formare un sottile film tra i microrganismi e le nanoparticelle (Figura 23). Il campione assemblato è stato introdotto all'interno di una falcon da 50 mL contenente 1 mL di PBS Dulbecco al 10%, il cui scopo è stato il mantenimento all'interno del contenitore di un ambiente umido, idoneo alla crescita batterica (Figura 24). Sono stati preparati tre campioni per ogni microrganismo testato e per entrambe le tempistiche valutate: un campione funzionalizzato con sole PBNPs, un campione innestato con PBNPs e AgNPs ed un controllo (C), ovvero un vetrino non funzionalizzato. L'esperimento è stato condotto a temperatura ambiente (25 °C) ed è stato valutato l'effetto microbica (ME) dopo un tempo di contatto di 5 e 24 ore. La scelta di utilizzare il tampone isotonic salino DPBS ad osmolarità fisiologica, rispetto alla semplice acqua sterile, è stata attuata per garantire alle cellule batteriche una soluzione a pH e salinità controllata, al fine di preservare l'integrità, la funzionalità e la forma cellulare. Trascorso il tempo definito, ogni campione è stato lavato con 4 mL di DPBS al 10%. Al fine di riuscire a contare le colonie batteriche e a calcolare un valore di effetto microbica (ME), espresso come UFC/mL, è stato necessario eseguire 3 diverse diluizioni della soluzione madre presente in ogni falcon. Le diluizioni ottenute sono state: II, 100 volte più diluita della madre (1:100); IV, 10.000 volte più diluita della madre (1:10.000); VI, 1.000.000 volte più diluita della madre (1:1.000.000). Successivamente, per ogni campione e relative diluizioni, è stata eseguita la piastratura di un volume pari a 1 mL con terreno di coltura TSA⁹. Il conteggio delle cellule vive è stato effettuato a seguito

⁹ TSA: dall'inglese *Tryptic Soy Agar*, è un terreno di coltura solido di uso generale, impiegato per la crescita di una vasta gamma di microrganismi aerobi e anaerobi facoltativi, inclusi alcuni lieviti e funghi filamentosi.

di incubazione per 24 ore alla temperatura di 37 °C. Il calcolo dell'effetto microbica è stato calcolato tramite la seguente formula:

$$ME = \log_{10}(NF) - \log_{10}(F)$$

dove:

- NF: valore di UFC/mL calcolato per il vetrino non funzionalizzato (C);
- F: valore di UFC/mL calcolato per il vetrino funzionalizzato con PBNPs o PBNPs-AgNPs.



Figura 23: deposizione della sospensione batterica (10 µL) su un vetrino standard da microscopio.

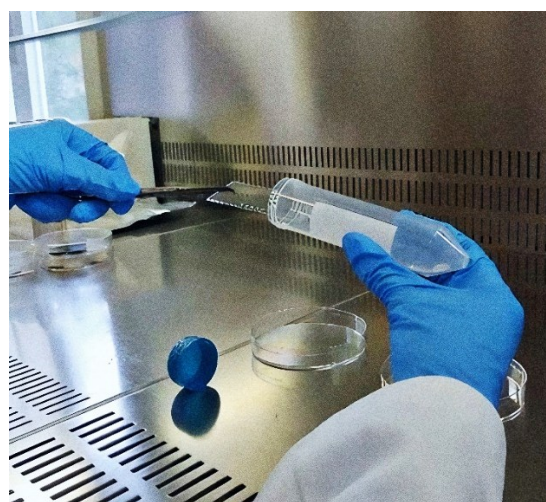


Figura 24: inserimento del campione assemblato all'interno di una falcon contenente 1 mL di DPBS al 10%.

4.5. Determinazione dell'effetto microbica fototermico (PME)

La determinazione dell'effetto microbica fototermico dei campioni caricati con PBNPs e AgNPs è stata valutata attraverso la conduzione di uno studio su batteri planctonici, ovvero batteri liberi in sospensione in un liquido, non attaccati a superfici né organizzati in biofilm. I microrganismi utilizzati sono stati *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Questi sono stati fatti crescere in un volume di 5 mL di terreno di coltura TSB, in incubatore alla temperatura di 37 °C per un tempo pari a 24 ore. Dopo aver accertato la corretta crescita e lo stato funzionale delle cellule tramite osservazione al microscopio di un'aliquota di 10 µL prelevata dalla coltura overnight, le cellule batteriche sono state centrifugate, il surnatante eliminato e i pellet risospesi in 5 mL di buffer DPBS al 10%. Successivamente è stato prelevato un volume di 700 µL per entrambe le sospensioni batteriche, che è stato diluito in un volume di 8 mL di DPBS al 10%. Per entrambe le sospensioni è stata eseguita una misura della densità ottica (OD) mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 650 nm. Durante l'analisi è stato utilizzato un bianco costituito solamente da DPBS al 10%. Il valore di assorbanza misurato per entrambi i microrganismi è stato di circa 0,35, corrispondente approssimativamente a 1×10^8 unità formanti colonia (UFC/mL). In seguito, un volume pari a 10 µL di sospensione batterica è stato depositato nella cella (20 x 20 mm) di una piastra Microtiter, su cui è stato adagiato ogni campione (10 x 10 mm) a formare un film di contatto tra i batteri e la superficie funzionalizzata. Successivamente, i campioni sono stati irraggiati in continuo per 30 minuti, con un laser settato alla lunghezza d'onda di 808 nm con una irradianza¹⁰ pari a 0,26 W/cm² (corrispondente ad una potenza di irradiazione

¹⁰ Irradianza: flusso di potenza radiante, ovvero la potenza radiante che attraversa una superficie.

di 200 mW) ed un punto focale¹¹ di 1 cm. Trascorso il tempo previsto per l'irraggiamento, l'inoculo è stato risospeso con 1 mL di DPBS al 10%. Sono stati preparati tre campioni per ogni microrganismo testato: un campione funzionalizzato con sole PBNPs, un campione innestato con PBNPs e AgNPs ed un controllo (C), ovvero un vetrino non funzionalizzato. Al fine di riuscire a contare le colonie batteriche e a calcolare un valore di effetto microbica fototermico (PME) espresso come UFC/mL, è stato necessario eseguire 3 diverse diluizioni di ogni soluzione madre. Le diluizioni ottenute sono state: II, 100 volte più diluita della madre (1:100); IV, 10.000 volte più diluita della madre (1:10.000); VI, 1.000.000 volte più diluita della madre (1:1.000.000). Successivamente, per ogni campione e relative diluizioni, è stata eseguita la piastratura di un volume pari a 1 mL con terreno di coltura TSA. Il conteggio delle cellule vive è stato effettuato a seguito di incubazione per 24 ore alla temperatura di 37 °C. Il calcolo dell'effetto microbica fototermico è stato eseguito tramite la seguente formula:

$$PME = \log_{10}(NF) - \log_{10}(F)$$

dove:

- NF: valore di UFC/mL calcolato per il vetrino non funzionalizzato (C);
- F: valore di UFC/mL calcolato per il vetrino funzionalizzato con PBNPs o PBNPs-AgNPs, non irraggiato (NIRR) o irraggiato (IRR).

Nella Figura 25 sotto riportata, è possibile notare come nel campione sottoposto ad irraggiamento laser, a differenza dei campioni adiacenti non irraggiati, si assiste allo sviluppo di calore e di condensa, dovuti presumibilmente alla parziale evaporazione della

¹¹ Punto focale: è il punto, lungo la direzione di propagazione del fascio laser, in cui il raggio raggiunge il diametro minimo. Il punto focale non è fisso, ma varia a seconda del sistema ottico utilizzato.

componente acquosa costituente la sospensione batterica. Questo fenomeno sussiste per le ragioni riportate nel paragrafo 2.6.3. relative all'effetto fototermico delle nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs). Infine, è doveroso precisare che il tempo di irraggiamento di 30 minuti è stato definito sulla base di studi preliminari, finalizzati ad individuare la durata minima di esposizione al laser in grado di garantire la migliore risposta antibatterica.

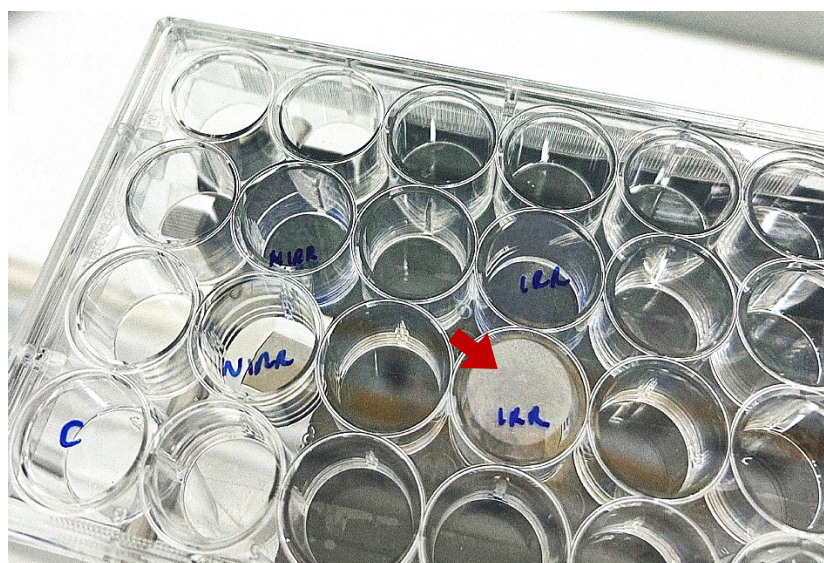


Figura 25: irraggiamento dei campioni ed effetto fototermico. Crediti immagine: Letizia Pasini.

4.6. Appendice tecnica: materiali e strumenti utilizzati

4.6.1. Materiali e strumenti utilizzati nella sintesi chimica

I materiali utilizzati dal laboratorio “inLAB” per la sintesi chimica sono stati acquistati da diversi fornitori, di seguito riportati: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloruro ferrico esaidrato), $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (esacianoferrato di potassio), acido citrico, acido cloridrico, acido nitrico, acido solforico, AgNO_3 (nitrato di argento), NaBH_4 (boroidruro di sodio) e tetraetil ortosilicato (TEOS) sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich. Il

trimetossisililpropil(poli(etilenimmina) (50% in isopropanolo) è stato acquistato da Gelest Inc. Reagents ed è stato utilizzato come fornito. I solventi sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich ed utilizzati come forniti. I vetrini coprioggetto per microscopia (2,2 × 2,6 cm) sono stati acquistati da Delchimica. L'acqua è stata deionizzata e successivamente distillata. La vetreria è stata accuratamente pulita con acqua règia, quindi lavata tre volte con acqua bidistillata in sonicatore ed asciugata in forno. Gli strumenti utilizzati per la sintesi e la caratterizzazione dei campioni sono stati:

- spettrofotometro UV-Vis Varian Cary 50, Agilent, USA, nell'intervallo di lunghezze d'onda di 300-1100 nm, per la misurazione della trasmissione dello stesso punto sul vetrino durante tutte le fasi sperimentali. Il punto specifico del vetrino è stato monitorato continuamente per verificare la variazione della trasmissione della luce nel tempo;
- spettrofotometro KSV CAM200, KSV Instruments, Finlandia, per la misurazione dell'angolo di contatto statico attraverso il metodo della goccia sessile¹². Il fluido utilizzato durante l'analisi è stato acqua;
- microscopio elettronico a scansione (SEM) Tescan Mira XMU, Tescan USA Inc., USA, utilizzato per la caratterizzazione di ogni step sintetico nella preparazione dei vetri funzionalizzati e per la valutazione della morfologia delle nanoparticelle innestate. I campioni sono stati fissati su supporti di alluminio cilindrici, definiti *stub*, e sono stati resi elettricamente conduttivi grazie ad una precedente fase, eseguita sottovuoto, di rivestimento con platino (Pt) dello spessore di 2,5 nm;

¹² Metodo della goccia sessile: è una tecnica ampiamente utilizzata per valutare la bagnabilità e l'idrofilia/idrofobicità di una superficie.

- ICP-OES¹³, OPTIMA 3000, PerkinElmer, USA, strumento analitico avanzato per analisi multielemento mediante spettrometria di emissione ottica a plasma induttivamente accoppiato. È stato utilizzato per la determinazione del contenuto totale di ferro e argento sui vetrini funzionalizzati;
- agitatore alternativo Heidolph Promax 1020, utilizzato durante la determinazione del contenuto totale di ferro e argento sui vetri funzionalizzati;
- diodo laser multimodale in AlGaAs, modello L808P200, Thorlabs GmbH, Dachau, Monaco di Baviera, Germania, utilizzato per l'irraggiamento laser dei campioni;
- termocamera FLIR E40 e software FLIR Tools+, FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA, utilizzati per il monitoraggio dell'aumento di temperatura nel pozzetto della piastra Microtiter a seguito di irraggiamento laser.

4.6.2. Materiali e strumenti utilizzati nella valutazione microbiologica

I materiali utilizzati dal Laboratorio di Microbiologia per la valutazione dell'efficacia antimicrobica dei campioni sono di seguito riportati: i microrganismi *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) sono stati acquistati dall' American Type Culture Collection; i terreni di coltura TSA e TSB, rispettivamente Tryptone Soy Agar e Tryptone Soy Broth, sono stati acquistati dal gruppo Scharlab Italia, il DPBS al 10% è stato acquistato dalla ditta Sigma-Aldrich. L'acqua deionizzata utilizzata per la preparazione delle diluzioni è stata precedentemente sterilizzata mediante l'utilizzo di autoclave. Tutti i materiali impiegati durante

¹³ ICP-OES: dall'inglese *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, ovvero spettrometria di emissione ottica a plasma induttivamente accoppiato.

l'esperimento sono stati sterilizzati. Il lavoro è stato eseguito mantenendo le condizioni di sterilità previste. Gli strumenti utilizzati sono stati:

- autoclave con capacità di 41 litri e con pressione di esercizio di 2.5 atm (ditta De Lama Spa) per la sterilizzazione a 121°C dei materiali utilizzati e dell'acqua deionizzata;
- incubatore Memmert impostato alla temperatura di 37 °C, utilizzato sia per la crescita batterica degli overnight che per la crescita delle colture batteriche nelle piastre;
- centrifuga EconoSpin Sorvall® Instruments, settata a 2850 giri al minuto (rpm), calcolati sulla base del 75% della velocità massima raggiungibile (3800 rpm). Lo strumento è stato impiegato per favorire la precipitazione dei batteri a seguito di incubazione overnight;
- spettrofotometro UVIDEK-320, Jasco, impostato alla lunghezza d'onda di 650 nm e con punto decimale pari a 3, utilizzato per la misura della densità ottica (OD);
- microscopio ottico Leitz Wetzlar in modalità a contrasto di fase, utilizzato per la verifica della corretta crescita e stato funzionale dei microrganismi.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti e le valutazioni, relative alla caratterizzazione di tipo chimico, riportate nei paragrafi 5.1., 5.2 e relativi sottoparagrafi, sono stati interamente elaborati presso il laboratorio "*inLAB*" del Dipartimento di Chimica e del Centro per le Tecnologie Sanitarie dell'Università di Pavia, facendo riferimento a quanto riportato in (39) e fonti correlate. Pertanto, non sono state svolte personalmente dall'autore della presente tesi ma sono state incluse a scopo descrittivo e per completezza di contenuto. Viceversa, i risultati ottenuti relativi all'attività antimicrobica, riportati nel paragrafo 5.3 e sottoparagrafi, sono stati ottenuti dall'autore durante l'internato presso il Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze del Farmaco della medesima Università, nell'ambito del lavoro sperimentale oggetto di questa tesi.

5.1. Scelta della strategia di funzionalizzazione

Come riportato nel paragrafo 4.3.3., è risultato necessario inserire uno strato di silice per isolare le nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) dalle nanoparticelle di argento (AgNPs), una volta innestate sulla superficie del campione. Questa decisione è stata presa a seguito di una fase di *screening* preliminare dove è stata testata una diversa strategia sintetica rispetto all'approccio *layer-by-layer*. Inizialmente si è optato per un monostrato misto contenente entrambe le tipologie di nanoparticelle, ottenuto dall'immersione sequenziale del vetro funzionalizzato con polietilenimmina (PEI) in un colloide costituito da AgNPs e successivamente in un colloide di PBNPs. Tuttavia, la formazione di esacianoferrato di argento ($\text{Ag}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) ha causato la degradazione completa del monostrato di nanoparticelle di argento, rendendo impraticabile tale strategia sintetica. La scelta di utilizzare uno strato di silice ha permesso, da un lato, di proteggere le

nanoparticelle di blu di Prussia e di evitare l'interazione con le nanoparticelle di argento; dall'altro di offrire un supporto trasparente che non compromettesse l'effetto fototermico. La procedura adottata è stata modificata rispetto a quanto riportato in (67), che descrive una metodologia per la formazione e la protezione di un monostrato di nanostelle d'oro (GNSs) e AgNPs.

5.2. Caratterizzazione dei singoli steps sintetici

Il processo *layer-by-layer* è stato monitorato in ogni sua fase attraverso l'impiego di spettroscopia UV-Vis e tramite misurazioni dell'angolo di contatto. Queste due tecniche, non invasive ed accessibili, si sono rivelate adatte per la verifica della funzionalizzazione superficiale. Le fasi del processo potenzialmente responsabili di modifiche significative nella morfologia dei substrati sono state ulteriormente investigate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), come riportato in Figura 26, con l'obiettivo di osservare eventuali variazioni nella morfologia e nella distribuzione delle nanoparticelle depositate.

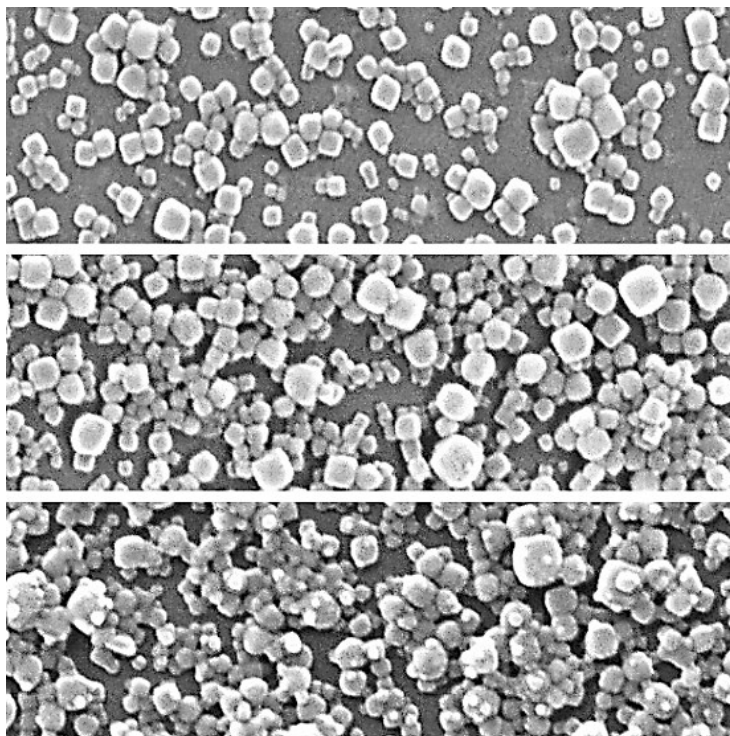


Figura 26: immagini ottenute tramite l'utilizzo di microscopio elettronico a scansione per la caratterizzazione degli steps sintetici più soggetti a modifiche della morfologia dei substrati. Dall'alto: vetro innestato con PBNPs, vetro ricoperto con lo strato intermedio siliceo, vetro innestato con PBNPs e AgNPs. Crediti immagine: Lavinia Doveri.

5.2.1. Misurazione dell'angolo statico di contatto

La misurazione dell'angolo di contatto statico è stata eseguita attraverso il metodo della goccia sessile, utilizzando come liquido l'acqua e attraverso l'impiego dello spettrofotometro KSV CAM200. La misura dell'angolo di contatto è una metodologia ottica impiegata per la valutazione delle proprietà di bagnabilità di una superficie. Lo strumento, tramite una siringa controllata, eroga una goccia di liquido sulla superficie del campione in maniera riproducibile. Tramite la lettura ottica e l'impiego di un software specifico è possibile risalire alla misura dell'angolo formato tra la superficie del solido e la tangente alla superficie della goccia, nel punto in cui il liquido tocca il solido. Nell'ambito di *coating* di materiali e di dispositivi medici, l'analisi viene effettuata per valutare la qualità e l'uniformità del rivestimento e per valutare la bagnabilità e la

biocompatibilità degli impianti stessi. Se il valore di angolo di contatto è minore di 90° , il materiale è molto idrofilico, se è maggiore, il materiale è molto idrofobico. Per valori maggiori di 150° , il materiale viene considerato superidrofobico (68) (69). In questo contesto, tutti i valori di angolo di contatto ottenuti a seguito dell'analisi ottica sono risultati inferiori a 90° , dimostrando un'elevata idrofilia dei materiali impiegati. Nel dettaglio, l'angolo di contatto misurato dopo la funzionalizzazione delle superfici con polietilenimmina (PEI) è stato di $41 \pm 5^\circ$. Successivamente, l'innesto delle nanoparticelle di blu di Prussia ha portato l'angolo a 6° , mentre il rivestimento intermedio a base di silice ha determinato un valore di $7 \pm 2^\circ$. Il secondo trattamento con polietilenimmina ha prodotto un angolo di $22 \pm 1^\circ$, diverso rispetto al primo innesto a causa della differente morfologia e del grado di protonazione delle poliammine. Infine, l'innesto con nanoparticelle di argento ha registrato un angolo di contatto di $23 \pm 3^\circ$. I valori riportati rappresentano il valore medio di quattro misurazioni distinte.

5.2.2. Spettroscopia UV-Vis

Sia le nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) sia le nanoparticelle di argento (AgNPs) presentano intense bande di assorbimento nello spettro UV-Vis. Per questo motivo, la caratterizzazione e la valutazione della funzionalizzazione dei campioni sono state effettuate mediante spettroscopia UV-Vis. La presenza delle PBNPs è stata confermata dal caratteristico picco di assorbimento a circa 700 nm. È stato osservato che il rivestimento con uno strato intermedio di silice induce un effetto ipsocromo (o *blue shift*), ovvero uno spostamento della lunghezza d'onda massima ($\lambda_{\max}$) verso valori inferiori, in direzione del blu. Questo fenomeno può essere attribuito alla presenza di gruppi funzionali auxocromi, quali -OH e -NH₂, nelle vicinanze del cromoforo, i quali riducono la delocalizzazione elettronica del sistema, contribuendo così allo spostamento dello

spettro di assorbimento (70). È stata inoltre osservata una diminuzione dell'assorbanza complessiva. A seguito dell'innesto delle nanoparticelle di argento, lo spettro ha evidenziato due distinti massimi di assorbimento: il picco caratteristico delle PBNPs è tornato a collocarsi intorno ai 700 nm, più precisamente a 704 ± 3 nm, pur mostrando una riduzione dell'intensità; il massimo di assorbimento relativo alle AgNPs è stato rilevato a 393 ± 5 nm. I campioni funzionalizzati con entrambe le tipologie di nanoparticelle si sono dimostrati omogenei sulla superficie: infatti, nonostante le misurazioni siano state effettuate in punti differenti, gli spettri ottenuti sono risultati tra loro comparabili e coerenti. Inoltre, i vetri hanno mostrato una buona stabilità all'aria anche per lunghi periodi di tempo.

5.2.3. Analisi del contenuto totale di ferro ed argento nei campioni

La determinazione del contenuto totale di ioni ferro ed argento è stata condotta mediante spettrometria di emissione ottica a plasma induttivamente accoppiato, utilizzando lo strumento ICP-OES, OPTIMA 3000 ed in seguito alla completa ossidazione dei metalli. Questa tecnica è utilizzata in diversi campi per l'analisi elementare su campioni liquidi e solidi. Si basa sull'utilizzo di plasma, generato da un campo elettromagnetico. Gli atomi e gli ioni del campione, portati dal plasma, vengono eccitati a causa dell'elevata temperatura raggiunta e all'assorbimento di energia sotto forma di calore. Quando questi ritornano allo stato fondamentale, emettono luce a lunghezze d'onda caratteristiche per ogni materiale. L'intensità di questa viene rivelata e risulta essere proporzionale alla concentrazione di atomi e ioni del materiale considerato presente nel campione (71). I risultati dell'analisi ottenuti sono di seguito riportati. Le concentrazioni sono espresse come $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e rappresentano il valore medio ottenuto da analisi effettuate su tre campioni

per ciascuna tipologia considerata. I vetri innestati con PBNPs hanno registrato un contenuto di ioni ferro pari a $0,40 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $0,37 \pm 4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in seguito al rivestimento intermedio siliceo, mentre i vetri innestati con PBNPs e AgNPs hanno registrato un contenuto di ioni ferro di $0,23 \pm 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ed un contenuto di ioni argento di $0,25 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. È stato inoltre valutato il rilascio totale di ioni metallici in acqua. L'esperimento è stato condotto in un volume di 3 mL di acqua bidistillata per un tempo di contatto dei campioni con il liquido di 5 e 24 ore. Questo lasso temporale è stato definito in funzione delle tempistiche adottate per la valutazione dell'effetto antibatterico, descritte nel paragrafo 5.3. I risultati, per quanto riguarda il rilascio di ioni ferro, hanno dimostrato che nelle 5 e 24 ore viene rilasciato circa il 15% del totale precedentemente riportato, valore considerato non significativo ed innocuo in ambiente biologico. Per quanto concerne invece il rilascio di ioni argento, la concentrazione valutata nelle 5 ore è risultata essere $0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mentre nelle 24 ore pari a $0,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Entrambi i valori indicano che la quantità totale di ioni argento rilasciati nel periodo considerato risulta inferiore alla soglia riportata in letteratura come potenzialmente tossica ($\text{mg}/\text{kg p.c}$) (72).

5.2.4. Valutazione SEM degli steps sintetici più critici

Come anticipato nel paragrafo 5.2., le fasi del processo potenzialmente responsabili di modifiche significative nella morfologia dei substrati sono state investigate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) con l'obiettivo di osservare eventuali variazioni nella morfologia e nella distribuzione delle nanoparticelle depositate. Lo strumento utilizzato è stato il microscopio elettronico a scansione Tescan Mira XMU. I campioni sono stati fissati su supporti cilindrici in alluminio, detti *stub*, e resi elettricamente conduttivi mediante un rivestimento preliminare in platino (Pt), eseguito

sottovuoto, con uno spessore di 2,5 nm. Sono state misurate circa 150 nanoparticelle (NPs) per campione. La Figura 27 mostra le nanoparticelle di blu di Prussia, la cui dimensione media è risultata essere 31 ± 12 nm, in accordo con quanto misurato con il microscopio elettronico a trasmissione (TEM), riportato nel paragrafo 4.1.

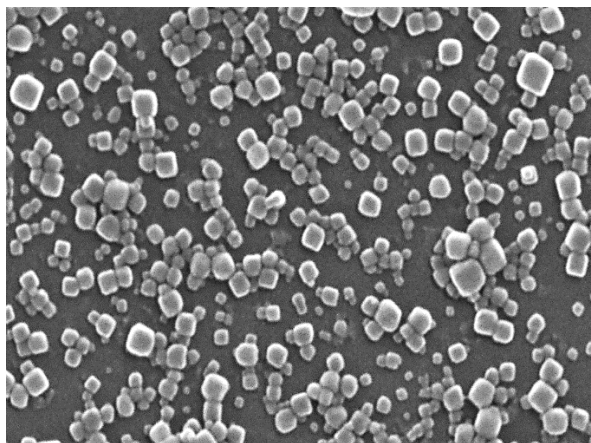


Figura 27: immagine SEM PBNPs. Crediti immagine: Lavinia Doveri.

La Figura 28 mostra le PBNPs in seguito al rivestimento protettivo intermedio di silice. Come si evince dall'immagine, il sottile strato siliceo non influenza la forma e la dimensione particellare che è risultata essere 31 ± 10 nm., rispetto a quanto sopra riportato. Tuttavia, è stata registrata una modifica nelle proprietà ottiche del materiale. Come riportato nel paragrafo 4.3.3. l'aggiunta del rivestimento siliceo è stata necessaria sia per la protezione delle nanoparticelle di blu di Prussia, sia per evitare la possibile interazione tra PBNPs e AgNPs.

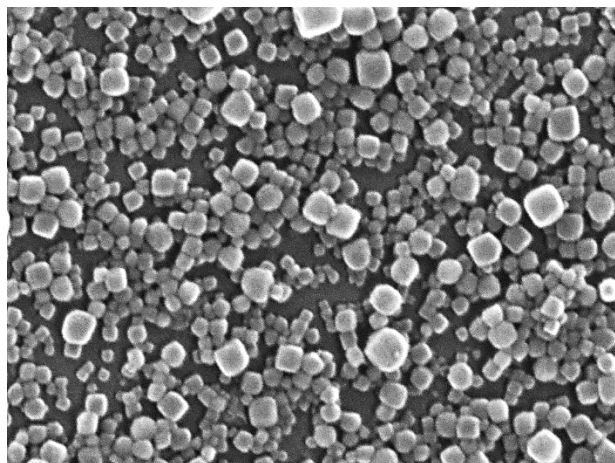


Figura 28: immagine SEM delle PBNPs in seguito al rivestimento con silice. Crediti immagine: Lavinia Doveri.

Infine, la Figura 29 mostra la superficie funzionalizzata con PBNPs e AgNPs. Si osserva chiaramente la diversa forma e la diversa dimensione delle due tipologie di NPs.

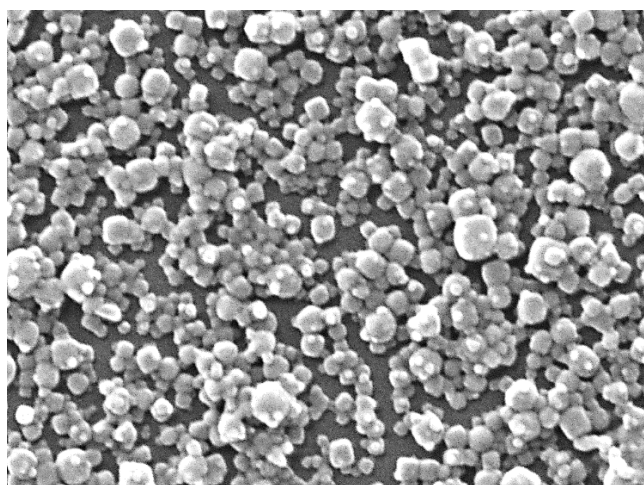


Figura 29: immagine SEM della superficie innestata con PBNPs e AgNPs. Crediti immagine: Lavinia Doveri.

Le immagini sono state acquisite con un ingrandimento 250kx, pertanto la dimensione delle nanoparticelle è 250.000 volte più grande rispetto alla realtà.

5.2.5. Effetto fototermico

L'effetto fototermico è stato valutato mediante una termocamera FLIR E40, in combinazione con il software FLIR Tools+, che ha consentito il monitoraggio dell'incremento di temperatura nel pozzetto della piastra Microtiter in seguito all'irraggiamento con un diodo laser multimodale operante nel vicino infrarosso (NIR). L'effetto fototermico è stato mantenuto durante tutte le fasi di funzionalizzazione del materiale. Il laser è stato impostato a una lunghezza d'onda di 808 nm, con un'irradianza di 0,255 W/cm². L'effetto fototermico è stato valutato dopo 1 minuto di esposizione all'irraggiamento. Analizzando i risultati ottenuti è stato dimostrato che i vetri innestati solamente con PBNPs presentano valori di ΔT maggiori rispetto ai vetri aventi la protezione silicea e la funzionalizzazione con nanoparticelle di argento. Questa differenza risiede nel fatto che tali campioni presentano un valore di assorbanza inferiore rispetto alla lunghezza d'onda di irradiazione. È doveroso precisare che sussiste una correlazione lineare tra il ΔT e l'assorbanza. Nonostante i vetri-SiO₂ e vetri-PBNPs/AgNPs presentino assorbanze diverse, l'andamento di ΔT può considerarsi analogo e sovrapponibile. Modeste variazioni di temperatura possono avere un impatto rilevante sull'efficacia dell'effetto fototermico, provocando ipertermia cellulare ed i conseguenti effetti biologici, come descritto nel paragrafo 2.6.3. I valori di differenza di temperatura (ΔT) ottenuti sono riportati in Kelvin (K), unità di misura ufficiale della temperatura nel Sistema Internazionale (SI). A seguito dell'analisi sono stati registrati i seguenti valori di ΔT , calcolati come valori medi ottenuti da 3 campioni per ogni tipologia considerata: $\Delta T = 13,3 \pm 9$ K per i vetri funzionalizzati con sole PBNPs; $\Delta T = 9,2 \pm 5$ K per i vetri protetti dallo strato siliceo intermedio; $\Delta T = 8,9 \pm 5$ K per i vetri funzionalizzati con PBNPs e AgNPs.

5.3. Valutazione dell'attività antibatterica

Come riportato nei paragrafi 4.4. e 4.5., la valutazione dell'attività antimicrobica è stata eseguita utilizzando due diversi ceppi batterici quali *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) per i batteri Gram-negativi e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) per i batteri Gram-positivi. Il metodo è riportato nei paragrafi sopra citati. L'effetto microbica per contatto (ME) e l'effetto microbica fototermico (PME) sono stati calcolati con le equazioni che seguono:

$$ME = \log_{10}(NF) - \log_{10}(F)$$

dove:

- NF: valore di UFC/mL calcolato per il vetrino non funzionalizzato (C);
- F: valore di UFC/mL calcolato per il vetrino funzionalizzato con PBNPs o PBNPs-AgNPs.

$$PME = \log_{10}(NF) - \log_{10}(F)$$

dove:

- NF: valore di UFC/mL calcolato per il vetrino non funzionalizzato (C);
- F: valore di UFC/mL calcolato per il vetrino funzionalizzato con PBNPs o PBNPs-AgNPs, non irraggiato (NIRR) o irraggiato (IRR).

L'effetto microbicida e l'effetto microbicida fototermico indicano la riduzione della popolazione batterica espressa in termini di ordini di grandezza, ovvero in logaritmi decimali. Tale misura, comunemente definita in letteratura con il termine inglese *log reduction*, quantifica di quanti logaritmi decresce il numero di batteri a seguito dell'applicazione dell'agente antimicrobico. Come mostrato in Figura 30, all'aumentare del valore calcolato di ME/PME, aumenta l'abbattimento della popolazione microbica e di conseguenza l'efficacia del disinfettante (73).

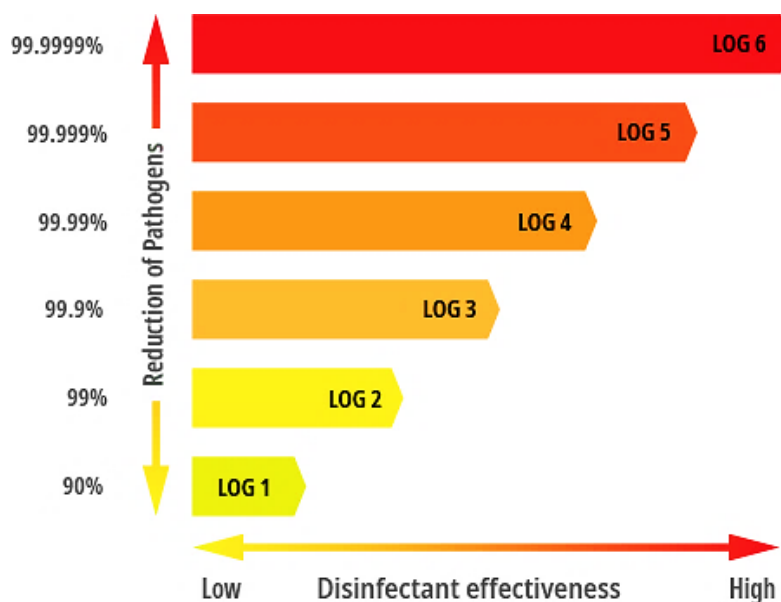


Figura 30: relazione tra log reduction, riduzione microbica ed efficacia del disinfettante. Crediti immagine: (73).

Nello studio condotto è stato dimostrato che le nanoparticelle di blu di Prussia non hanno, a differenza delle nanoparticelle di argento, nessun intrinseco effetto antibatterico e risultano essere atossiche e biocompatibili con l'organismo umano. Tuttavia, l'effetto fototermico di queste particelle può indurre un lieve effetto microbicida, attribuibile all'incremento di temperatura nel pozzetto della piastra Microtiter sottoposto ad irraggiamento.

5.3.1. Il valore di riferimento CEN

A partire dal 2001, il Comitato Europeo di Normazione (CEN), ha pubblicato la norma europea EN 13697, recepita a livello nazionale da tutti i membri del CEN, compresa l'Italia, all'interno della quale è stato delineato in modo univoco il test EN 13697. Questo metodo ufficiale di laboratorio è un test quantitativo sviluppato per la dimostrazione dell'efficacia di un disinfettante, senza azione meccanica, su superfici dure non porose. All'interno della norma sono riportati i requisiti generali dei prodotti da testare, il campo di applicazione, la preparazione dei microrganismi, le condizioni ambientali di conduzione del test, la metodologia dettagliata di esecuzione e i criteri di accettazione. All'interno di questa ultima sezione è riportato che l'attività microbica di un disinfettante è considerata accettabile quando il tasso di riduzione logaritmica (ME) è almeno pari o superiore al valore di 4 dopo un tempo di contatto pari a 5 minuti per i batteri e pari a 15 minuti per i miceti. Un valore di $ME \geq 4$ indica una riduzione della carica batterica del 99,99%, percentuale considerata dal CEN come accettabile per la definizione di un agente quale "disinfettante". La normativa è stata sottoposta a numerose revisioni negli ultimi vent'anni; l'ultima versione pubblicata risale all'anno 2023. Lo standard EN 13697 si differenzia da altri standard come EN 1276 e 1650 per l'ambito di applicazione. Questi si applicano ad agenti che esplicano l'azione disinfettante in soluzione, l'uno attivo sui batteri, l'altro attivo su funghi e lieviti (74) (75) (76). In conclusione, vista la natura solida dei campioni sottoposti ad indagine è stato scelto e preso come riferimento lo standard EN 13697.

5.3.2. Risultati ME

Nella Tabella 1 sono riportati i valori medi dell'effetto microbicida (ME), calcolati a partire da tre determinazioni sperimentali equivalenti, relativi a vetrini funzionalizzati esclusivamente con nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs). Le analisi sono state condotte su *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* a due tempi di contatto distinti (5 ore e 24 ore). La rappresentazione grafica dei risultati è illustrata nei Grafici 1 e 1A.

Vetri PBNPs			
Tempo di contatto	<i>S. epidermidis</i> (ME)	<i>P. aeruginosa</i> (ME)	Valore di riferimento CEN
5 ore	0,016 ± 0,005	0,052 ± 0,010	4
24 ore	0,071 ± 0,010	0,12 ± 0,02	

Tabella 1: valori di ME ottenuti da una media di tre misurazioni differenti, derivanti da vetri funzionalizzati con PBNPs.

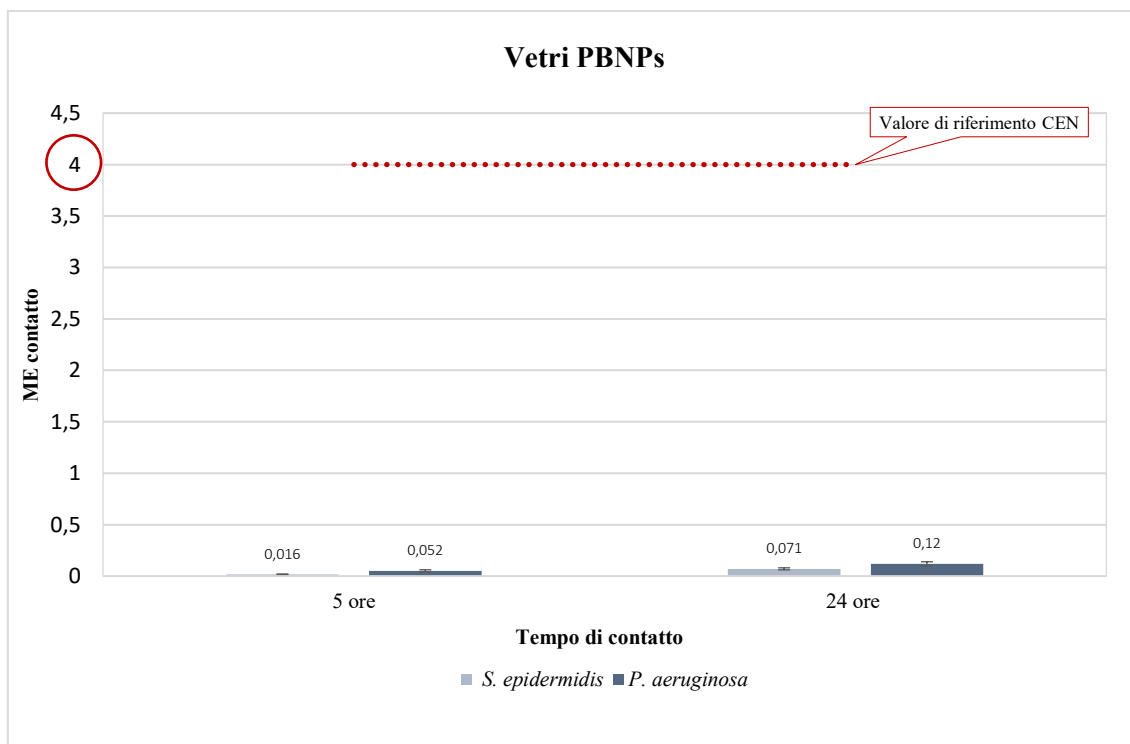


Grafico 1: rappresentazione grafica dei valori di ME riportati in Tabella 1.

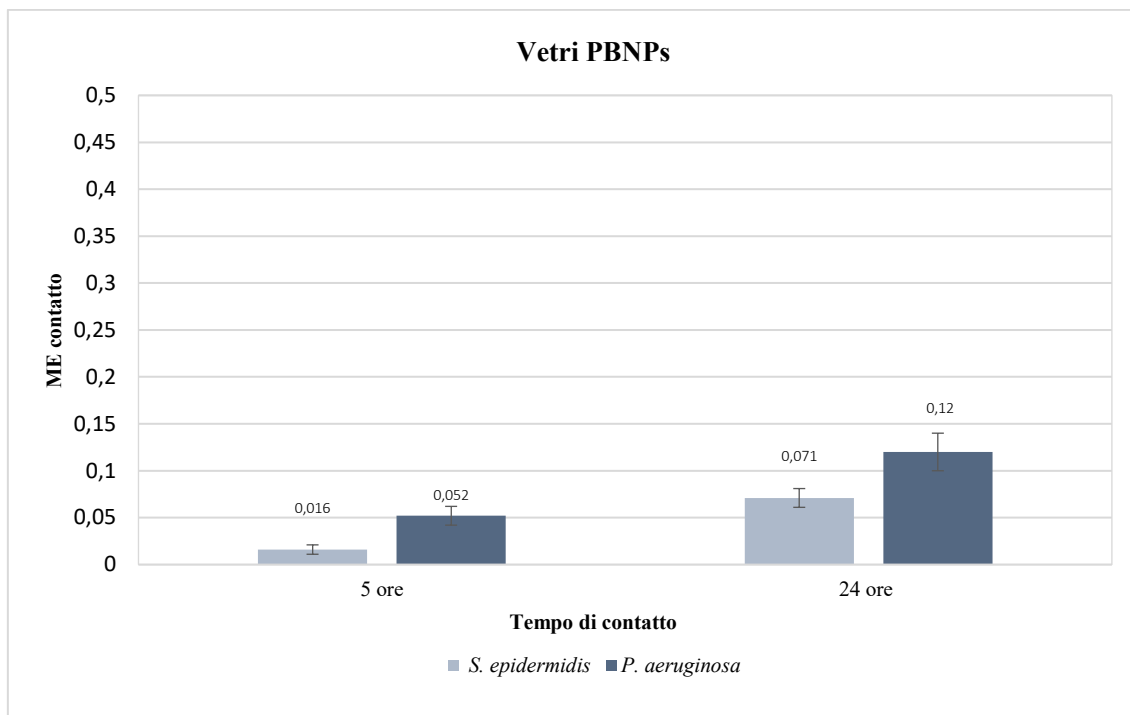


Grafico 1A: ingrandimento del Grafico 1.

I valori di ME mostrano una attività antibatterica irrilevante, a conferma di quanto riportato nel paragrafo 5.3. Nella Tabella 2 sono riportati i valori medi dell'effetto microbica (ME), calcolati a partire da tre determinazioni sperimentali equivalenti, relativi a vetrini funzionalizzati con nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) e nanoparticelle di argento (AgNPs). Le analisi sono state eseguite su *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* a due tempi di contatto distinti (5 ore e 24 ore). La rappresentazione grafica dei risultati è illustrata nel Grafico 2.

Vetri PBNPs - AgNPs			
Tempo di contatto	<i>S. epidermidis</i> (ME)	<i>P. aeruginosa</i> (ME)	Valore di riferimento CEN
5 ore	1,73 ± 0,12	3,15 ± 0,16	4
24 ore	3,30 ± 0,20	5,93 ± 0,05	

Tabella 2: valori di ME ottenuti dalla media di tre misurazioni differenti, derivanti da vetri funzionalizzati sia con nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs), sia con nanoparticelle di argento (AgNPs).

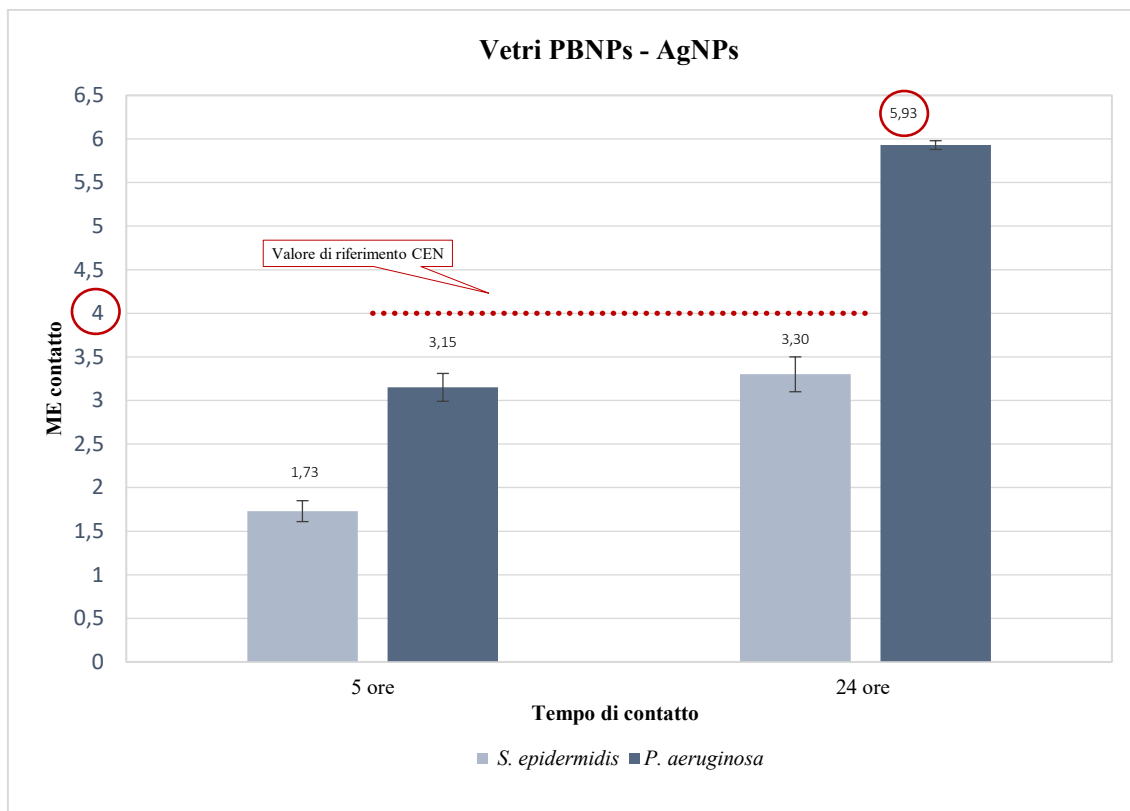


Grafico 2: rappresentazione grafica dei valori di ME riportati in Tabella 2.

I valori di ME riportati per *S. epidermidis* a 5 ore mostrano un abbattimento della popolazione microbica di circa il 90%. È interessante notare che, trascorso il tempo di contatto di 24 ore, la riduzione della popolazione microbica sale al 99,9%. Confrontando questi dati con i valori di ME ottenuti per *P. aeruginosa*, si osserva che l'azione battericida dell'argento è più marcata, quasi il doppio, nei confronti dei batteri Gram-negativi rispetto ai batteri Gram-positivi. Le ragioni di questo fenomeno sono state descritte nel paragrafo 2.7.5. al termine del quale viene concluso che, dipendentemente dalla diversa parete batterica che i microrganismi presentano, il metallo è in grado di raggiungere più efficacemente e in un tempo ridotto il citoplasma cellulare dei batteri Gram-negativi, dove esplica le diverse azioni che lo vedono coinvolto. Inoltre, si osserva per *P. aeruginosa*, che l'abbattimento della popolazione batterica passa dal 99,9% a più del 99,999% dopo 24 ore di contatto. Il valore di ME pari a 5,93 supera il valore di

referimento CEN di 4, il cui significato è stato descritto nel paragrafo 5.3.1. Il confronto tra i risultati ottenuti dai vetri funzionalizzati esclusivamente con PBNPs e quelli contenenti entrambe le tipologie di nanoparticelle (PBNPs e AgNPs) evidenzia, per il batterio Gram-positivo *Staphylococcus epidermidis*, pur caratterizzato da una minore sensibilità, un marcato incremento dei valori di ME, indicativo di un netto miglioramento dell'effetto microbica da contatto. Un andamento analogo è stato osservato anche per il batterio Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, per il quale si è riscontrato un significativo aumento dell'efficacia microbica.

5.3.3. Risultati PME

Nella Tabella 3 sono riportati i valori medi dell'effetto microbica fototermico (PME), calcolati a partire da tre determinazioni sperimentali equivalenti, relativi a vetrini funzionalizzati esclusivamente con nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs), sottoposti o meno ad irraggiamento per 30 minuti. Le analisi sono state condotte sui microrganismi *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. I campioni non irradiati (NIRR) sono stati semplicemente posti in contatto con la sospensione batterica. La rappresentazione grafica dei risultati è illustrata nel Grafico 3.

Vetri PBNPs			
Tempo di contatto	<i>S. epidermidis</i> (PME)	<i>P. aeruginosa</i> (PME)	Valore di riferimento CEN
30 minuti NIRR	0,13 ± 0,11	0,22 ± 0,08	4
30 minuti IRR	0,62 ± 0,04	2,76 ± 0,16	

Tabella 3: valori di PME ottenuti da una media di tre misurazioni differenti, derivanti da vetri funzionalizzati con PBNPs.

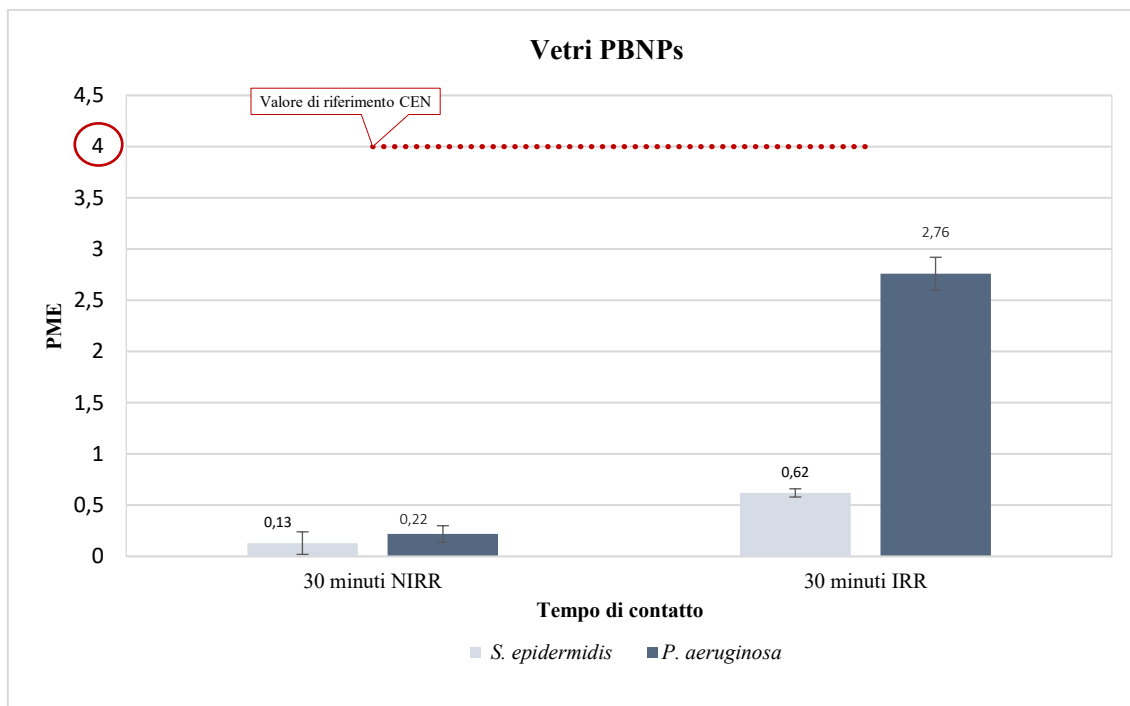


Grafico 3: rappresentazione grafica dei valori di PME riportati in Tabella 3.

I valori di PME calcolati per *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* mostrano l'importante contributo dell'effetto fototermico delle nanoparticelle di blu di Prussia. I vetrini non irraggiati (NIRR), posti solamente in contatto con la sospensione batterica per un tempo di 30 minuti, evidenziano un blando effetto microbicide. Nonostante sia risultato leggermente maggiore per i batteri Gram-negativi rispetto ai batteri Gram-positivi, la differenza tra i due valori può essere considerata trascurabile. Considerando invece i campioni sottoposti ad irraggiamento laser (IRR) nel vicino infrarosso (NIR), è possibile evidenziare come per *S. epidermidis* il valore di PME calcolato risulta essere circa sei volte superiore rispetto a quello dei vetri non irraggiati, mentre per *P. aeruginosa* è stato osservato un incremento dell'effetto microbicide fototermico del 1150% rispetto ai campioni NIRR. L'abbattimento della popolazione microbica è dunque passato da meno del 90% a quasi il 99,9%. Il promettente risultato ottenuto è dovuto all'effetto fototermico delle nanoparticelle di blu di Prussia che, generando ipertermia localizzata, hanno

permesso la riduzione della popolazione microbica a seguito di danni irreversibili alle membrane cellulari, alla denaturazione delle proteine e alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel citoplasma delle cellule batteriche. Il laser è stato impostato con parametri specifici che hanno permesso un incremento di temperatura all'interno del pozzetto fino a circa 46 °C, sufficiente a provocare la sofferenza e la morte cellulare. Nella Tabella 4 sono riportati i valori medi dell'effetto microbicide fototermico (PME), calcolati a partire da tre determinazioni sperimentali equivalenti, relativi a vetrini funzionalizzati con nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) e nanoparticelle di argento (AgNPs), sottoposti o meno a irraggiamento per 30 minuti. Le analisi sono state effettuate sui microrganismi *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. I campioni non irradiati (NIRR) sono stati posti semplicemente in contatto con la sospensione batterica. La rappresentazione grafica dei risultati è illustrata nel Grafico 4.

Vetri PBNPs - AgNPs			
Tempo di contatto	<i>S. epidermidis</i> (PME)	<i>P. aeruginosa</i> (PME)	Valore di riferimento CEN
30 minuti NIRR	0,77 ± 0,03	1,60 ± 0,09	4
30 minuti IRR	2,37 ± 0,31	4,19 ± 0,1	

Tabella 4: valori di PME ottenuti da una media di tre misurazioni differenti, derivanti da vetri funzionalizzati con PBNPs e AgNPs.

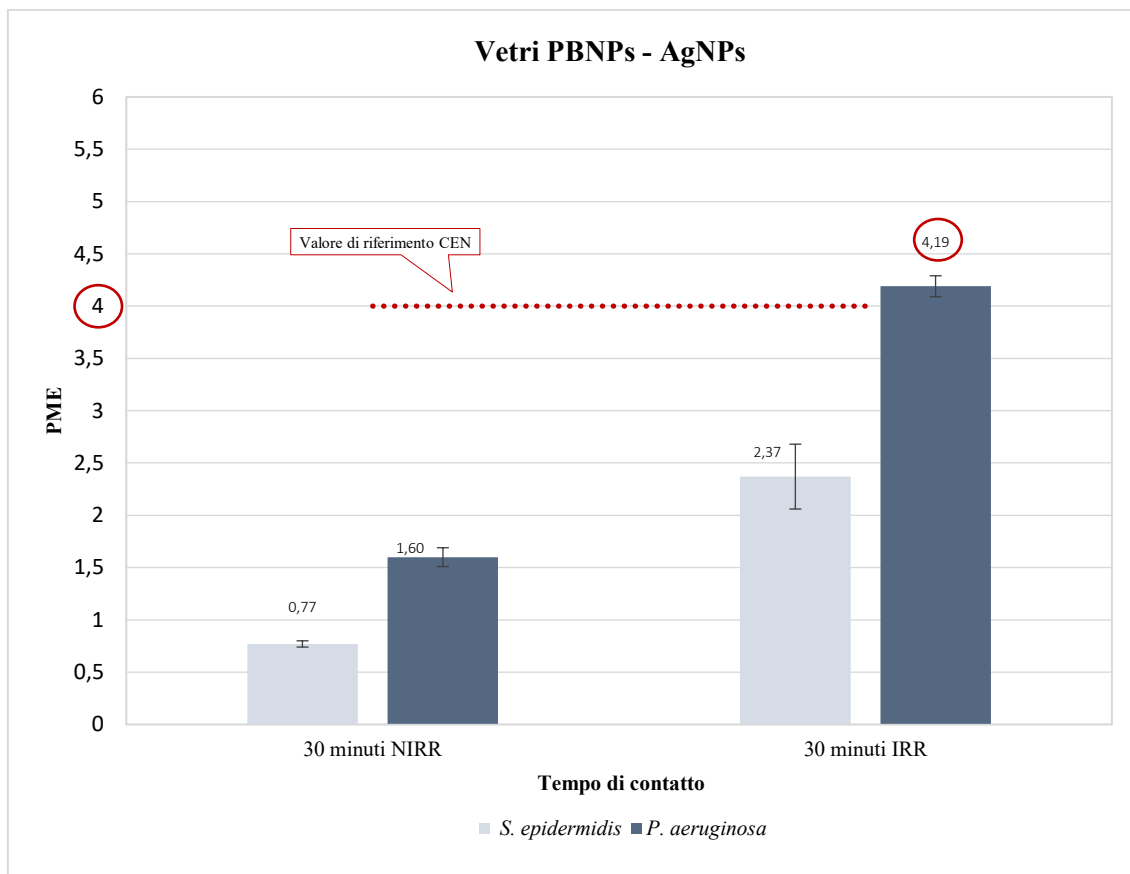


Grafico 4: rappresentazione grafica dei valori di PME riportati in Tabella 4.

I valori di PME calcolati per *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* mostrano l'efficacia dell'effetto microbica data dalla combinazione duplice dell'effetto fototermico delle nanoparticelle di blu di Prussia e dell'effetto antimicrobico delle nanoparticelle di argento. I vetrini non irraggiati (NIRR), posti solamente in contatto con la sospensione batterica per un tempo di 30 minuti, evidenziato un moderato effetto microbica per il batterio Gram-positivo *S. epidermidis* e un risultato più significativo per il batterio Gram-negativo *P. aeruginosa*, con un abbattimento della popolazione microbica di poco inferiore del 99%. Questo è riconducibile quasi esclusivamente all'azione antibatterica delle nanoparticelle di argento (AgNPs). Come già precedentemente riportato infatti, le PBNPs non presentano attività antimicrobica e in tal contesto non forniscono un contributo significato nella riduzione della popolazione microbica. La maggior sensibilità

dei batteri Gram-negativi rispetto ai batteri Gram-positivi è giustificata nel paragrafo 2.7.5. Considerando invece i campioni sottoposti ad irraggiamento laser (IRR) nel vicino infrarosso (NIR), è possibile evidenziare come per *S. epidermidis* il valore calcolato di PME risulta essere maggiore del 208% rispetto a quello dei vetri non irraggiati (NIRR), mentre per *P. aeruginosa* è stato osservato un aumento dell'effetto microbica fototermico di circa 162% rispetto ai campioni NIRR. L'abbattimento della popolazione microbica è dunque passato da circa il 99% ad oltre il 99,99%. L'incoraggiante risultato ottenuto è dovuto al duplice effetto antibatterico dato dalla combinazione dell'effetto fototermico delle nanoparticelle di blu di Prussia e dall'azione antimicrobica delle nanoparticelle di argento. Sebbene anche le AgNPs possano generare effetto fototermico, in questo contesto non hanno contribuito in modo significativo, poiché solo le PBNPs assorbono nella finestra biotrasparente, ovvero nell'intervallo di lunghezze d'onda in grado di penetrare in profondità nei tessuti (650-900 nm), risultando le uniche effettivamente attivate dalla luce utilizzata. Le AgNPs assorbono tipicamente nella regione del visibile, nell'intervallo di lunghezze d'onda 380-450 nm; quindi, non vengono attivate dalla luce NIR comunemente usata in ambito biomedico. Il valore di PME, pari a 4,19, calcolato per *P. aeruginosa* sui vetri IRR innestati con PBNPs-AgNPs, supera il valore di riferimento CEN di 4, il cui significato è discusso nel paragrafo 5.3.1. Il confronto tra i risultati ottenuti dai vetri funzionalizzati esclusivamente con PBNPs e quelli innestati con entrambe le tipologie di nanoparticelle (PBNPs e AgNPs) mostra che, per il batterio Gram-positivo *S. epidermidis*, nonostante una sensibilità inferiore, i valori di PME calcolati sono significativamente più elevati, indicando un miglioramento nell'effetto microbica fototermico. Un risultato analogo si osserva per il batterio Gram-

negativo *P. aeruginosa*, che pur essendo più sensibile grazie alla sua diversa morfologia cellulare, ha mostrato un aumento del PME.

5.3.4. Risultati complessivi *Staphylococcus epidermidis*

I risultati complessivi ottenuti per il batterio Gram-positivo *Staphylococcus epidermidis* sono riportati nella Tabella 5. La rappresentazione grafica di tali dati è consultabile nel Grafico 5.

<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
Tempo di contatto	PBNPs (ME/PME)	PBNPs - AgNPs (ME/PME)	Valore di riferimento CEN
5 ore	0,016 ± 0,005	1,73 ± 0,12	4
24 ore	0,071 ± 0,010	3,30 ± 0,20	
30 minuti NIRR	0,13 ± 0,11	0,77 ± 0,03	
30 minuti IRR	0,62 ± 0,04	2,37 ± 0,31	

Tabella 5: valori di ME e PME, ottenuti per il batterio Gram-positivo *S. epidermidis*. da una media di tre misurazioni differenti, derivanti da vetri funzionalizzati con sole PBNPs e con la combinazione PBNPs - AgNPs.

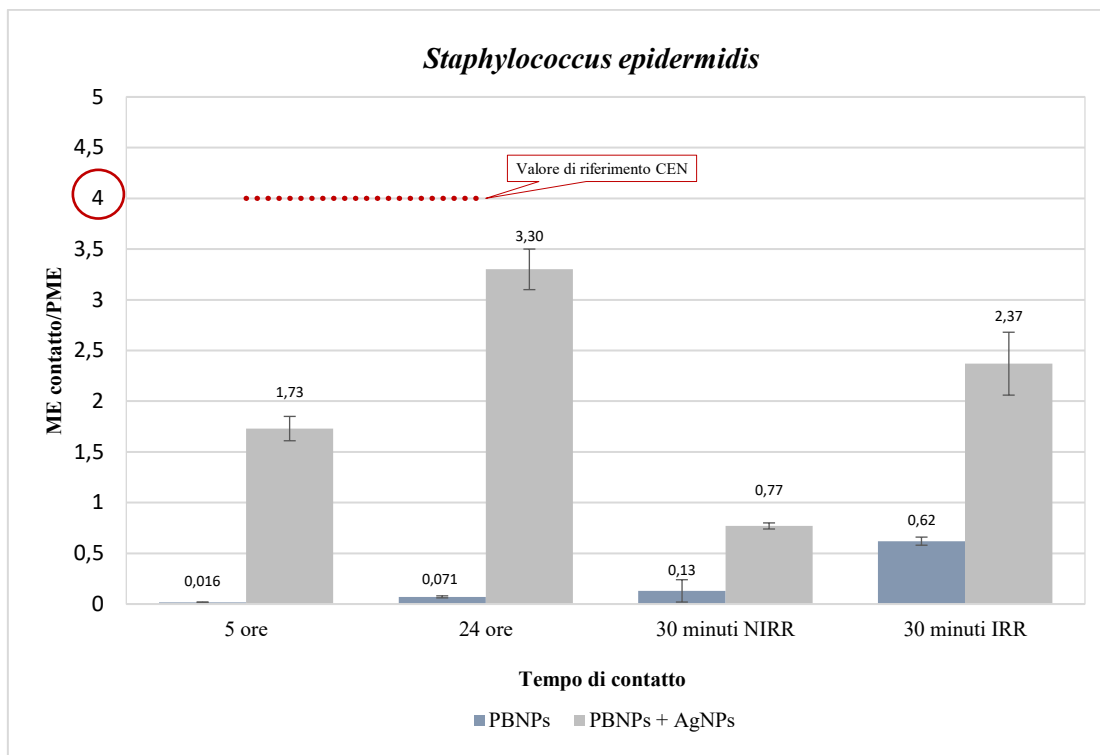


Grafico 5: rappresentazione grafica dei valori di ME e PME di *S. epidermidis* riportati in Tabella 5.

Osservando i valori di effetto microbica (ME) ed effetto microbica fototermico (PME) calcolati per il batterio Gram-positivo *S. epidermidis* si può concludere che l'efficienza in termini di abbattimento della popolazione microbica è maggiore per i vetri funzionalizzati con le nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) e le nanoparticelle di argento (AgNPs), sia per quanto riguarda il solo contatto tra i campioni e la sospensione batterica a 5 e 24 ore, sia per i campioni sottoposti e non ad irraggiamento nel vicino infrarosso per 30 minuti (NIR). Considerando i campioni funzionalizzati con entrambe le tipologie di NPs, è interessante notare che l'attività antimicrobica è risultata più marcata per i vetri sottoposti al semplice contatto per 5 e 24 ore, rispetto ai vetri irradiati (e non) per 30 minuti. Le cause di questo fenomeno possono essere molteplici: il blu di Prussia, sottoposto ad irraggiamento, può andare incontro a degradazione fotolitica, o fotodegradazione, riducendo l'attività sinergica con le nanoparticelle di argento; le AgNPs potrebbero sia aggregarsi, riducendo la superficie attiva disponibile

all'interazione con le cellule batteriche, sia ossidarsi velocemente, causando una passivazione della superficie; l'irraggiamento potrebbe generare specie reattive all'ossigeno (ROS) che, in determinate condizioni, potrebbero sia modificare le componenti dei campioni, sia generare una risposta adattiva dei batteri; il rilascio di ioni Ag^+ potrebbe essere più controllato, senza modifiche nella cinetica di rilascio, in assenza del fascio laser nel vicino infrarosso (NIR); l'ipertermia generata all'interno del pozzetto della piastra Microtiter potrebbe portare ad una parziale evaporazione della componente acquosa costituente la sospensione batterica, riducendo il contatto con il campione e apportando modifiche significative al pH e alla concentrazione salina della stessa; in ultimo, è opportuno considerare che i tempi di contatto tra il campione e la sospensione batterica sono molto differenti; questo aspetto influenza notevolmente il grado di abbattimento della carica microbica. Complessivamente, dunque, si ritiene più efficace utilizzare i campioni innestati con PBNPs e AgNPs per contatto, possibilmente per un lasso di tempo non inferiore alle 24 ore. Tuttavia, nessun valore di ME e PME calcolato è superiore al valore di riferimento CEN di 4, che corrisponde ad un abbattimento della popolazione microbica del 99,99%. Nonostante ciò, lo scopo del lavoro, ovvero l'ottenimento di un effetto antimicrobico finalizzato alla prevenzione della colonizzazione batterica, può ritenersi raggiunto, alla luce dei risultati ottenuti. In particolare, le evidenze sperimentali raccolte attraverso entrambe le metodologie indicano una minore sensibilità del batterio Gram-positivo *Staphylococcus epidermidis* rispetto al Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*. Tale differenza è principalmente attribuibile alle caratteristiche morfologiche distintive dei due microrganismi, in particolare alla diversa struttura della parete cellulare.

5.3.5. Risultati complessivi *Pseudomonas aeruginosa*

I risultati complessivi ottenuti per il batterio Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* sono riportati nella Tabella 6. La rappresentazione grafica di tali dati è consultabile nel grafico 6.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Tempo di contatto	PBNPs (ME/PME)	PBNPs - AgNPs (ME/PME)	Valori di riferimento CEN
5 ore	0,052 ± 0,010	3,15 ± 0,16	4
24 ore	0,12 ± 0,02	5,93 ± 0,05	
30 minuti NIRR	0,22 ± 0,08	1,60 ± 0,09	
30 minuti IRR	2,76 ± 0,16	4,19 ± 0,1	

Tabella 6: valori di ME e PME, ottenuti per il batterio Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, da una media di tre misurazioni differenti, derivanti da vetri funzionalizzati con sole PBNPs e con la combinazione PBNPs - AgNPs.

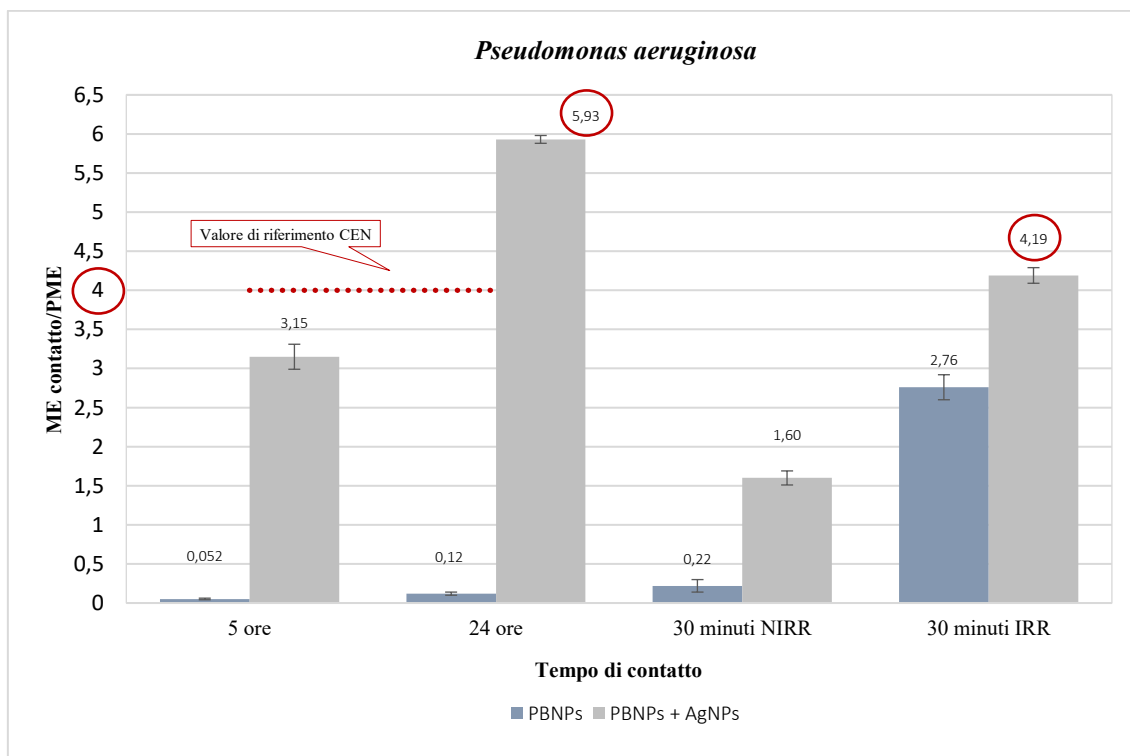


Grafico 6: rappresentazione grafica dei valori di ME e PME di *P. aeruginosa* riportati in Tabella 6.

Dall'analisi dei valori di effetto microbica (ME) ed effetto microbica fototermico (PME) calcolati per *P. aeruginosa* emerge un'efficacia in termini di abbattimento della popolazione microbica maggiore per i vetri funzionalizzati con le nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) e le nanoparticelle di argento (AgNPs), sia per quanto riguarda il solo contatto tra i campioni e la sospensione batterica a 5 e 24 ore, sia per i campioni sottoposti e non ad irraggiamento nel vicino infrarosso (NIR) per 30 minuti. Considerando i campioni funzionalizzati con entrambe le tipologie di NPs, è interessante notare che l'attività antimicrobica è risultata più marcata per i vetri sottoposti al semplice contatto per 5 e 24 ore, rispetto ai vetri irradiati (e non) per 30 minuti. Come rilevato per *S. epidermidis*, i motivi di tale fenomeno possono essere molteplici: il blu di Prussia, irraggiato, può degradarsi a livello fotolitico, diminuendo l'azione sinergica con le nanoparticelle di argento; le AgNPs potrebbero sia aggregarsi, riducendo la superficie attiva disponibile all'interazione con le cellule batteriche, sia ossidarsi velocemente causando una passivazione della superficie; l'irraggiamento potrebbe determinare la formazione di specie reattive all'ossigeno (ROS) che, in specifiche condizioni, potrebbero sia modificare le componenti dei campioni, sia generare una risposta adattiva dei batteri; il rilascio di ioni Ag^+ potrebbe essere più controllato, senza modifiche nella cinetica di rilascio, in assenza del fascio laser nel vicino infrarosso (NIR); l'ipertermia generata all'interno del pozzetto della piastra Microtiter potrebbe far evaporare parzialmente la componente acquosa costituente la sospensione batterica, limitando il contatto con il campione e apportando modifiche significative al pH e alla concentrazione salina della stessa; in ultimo, è opportuno considerare che i tempi di contatto tra il campione e la sospensione batterica sono molto differenti; questo aspetto influenza notevolmente il grado di abbattimento della carica microbica. Pertanto, per questi motivi,

si ritiene più utile usare i campioni innestati con PBNPs e AgNPs per contatto. I risultati dimostrano che già dopo 5 ore la riduzione della popolazione batterica è del 99,9%, arrivando ad una percentuale del 99,999% in 24 ore. Il valore calcolato di effetto microbica (ME) in seguito alle 24 ore di contatto tra il campione e la sospensione batterica è risultato superiore al valore di riferimento CEN e pari a 5,93. Inoltre, anche il valore dell'effetto microbica fototermico (PME), calcolato in seguito ad irraggiamento del campione per 30 minuti nel vicino infrarosso, è risultato superiore al valore di riferimento CEN e pari a 4,19. Infine, i risultati ottenuti con entrambe le metodologie sperimentali evidenziano una maggiore sensibilità del batterio Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, rispetto al batterio Gram-positivo *Staphylococcus epidermidis*. Tale comportamento è imputabile alla differente composizione ed organizzazione della parete cellulare dei due batteri.

6. CONCLUSIONI

Lo studio è stato presentato con lo scopo di illustrare un nuovo materiale biocompatibile, avente attività antibatterica e finalizzato al rivestimento di dispositivi medici, impianti e materiale chirurgico, con lo scopo di ridurre il tasso d'insorgenza, sempre crescente, di infezioni ICA ed infezioni nosocomiali. I microrganismi utilizzati sono stati due ceppi batterici differenti, rappresentativi dei Gram-positivi (*Staphylococcus epidermidis*) e dei Gram-negativi (*Pseudomonas aeruginosa*). I campioni sono stati preparati mediante l'utilizzo di un supporto siliceo sul quale sono state innestate, tramite un approccio *layer-by-layer*, due diverse tipologie di nanoparticelle: le nanoparticelle di blu di Prussia (PBNPs) e le nanoparticelle di argento (AgNPs). Le prime, costituite da un materiale accessibile, biocompatibile ed approvato per l'applicazione biomedica, sono state pensate per sfruttarne l'effetto fototermico a seguito di irraggiamento con fascio laser nel vicino infrarosso (NIR) alla lunghezza d'onda di 808 nm, con una potenza di irradiazione di 200 mW ed un'irradianza pari a 0,26 W/cm². È noto, infatti, che l'ipertermia può causare danni irreversibili alle cellule batteriche, contribuendo all'abbattimento della popolazione microbica. Le nanoparticelle di argento, invece, state impiegate con l'intento di sfruttarne le proprietà antibatteriche, dovute principalmente al rilascio di ioni Ag⁺. Dai risultati ottenuti è stato possibile constatare che la riduzione della popolazione microbica è più efficiente se i vetrini sono innestati con entrambe le tipologie di nanoparticelle e che la metodologia per contatto di 5 e 24 ore tra i batteri e i campioni, è la scelta migliore. Tuttavia, i buoni risultati ottenuti a seguito di irraggiamento laser aprono le porte ad un possibile impiego biomedico. Il laser, infatti, è stato programmato con parametri compatibile con i tessuti umani e con gli standard previsti per l'impiego *in vivo*. Il valore

di irradianza scelto ($0,26 \text{ W/cm}^2$), infatti, è al di sotto degli standards ANSI¹⁴ per l'irraggiamento della pelle ($0,32 \text{ W/cm}^2$ alla lunghezza d'onda di 800 nm). Inoltre, è stata dimostrata una buona attività antimicrobica sia nei confronti dei batteri Gram-positivi, sia di quelli Gram-negativi; quest'ultimi, in aggiunta, sono risultati più sensibili dei primi. È doveroso menzionare che risultati confrontabili e in accordo con quanto qui dimostrato sono stati ottenuti anche per i batteri *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) ed *Escherichia coli* (Gram-negativo). Nel precedente studio (39), sia la diversa sensibilità dei microrganismi sia la maggiore efficienza del metodo per contatto rispetto a quello per irraggiamento si sono confermate coerenti con quanto osservato nel presente lavoro. In conclusione, il nuovo materiale si è dimostrato promettente come possibile alternativa per prevenire la continua diffusione delle infezioni ospedaliere associate all'uso di dispositivi potenzialmente soggetti a colonizzazione batterica, aprendo una nuova frontiera nella ricerca di materiali innovativi per questa applicazione.

¹⁴ ANSI: *American National Standards Institute*, organizzazione privata che definisce le norme industriali negli Stati Uniti.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Agenzia Italia del Farmaco. Dossier AIFA antibiotico-resistenza. 2024.
2. G. Duce, J. Fabry and L. Nicolle. Prevention of hospital-acquired infections : a practical guide. 2nd.ed. s.l. : World Health Organization, 2002.
3. Gianfranco Donelli, Valeria Di Carlo, Emilio Guaglianone, Iolanda Francolini, Roberta Di Rosa, Massimo Antonelli, Giovanni Fadda, Annunziata Isabella Parisi, Stefania Musco, Antonio Ierna, Fabrizio Mastrilli. Protocollo per la prevenzione, la diagnosi e la terapia delle infezioni delle vie urinarie associate a cateteri vescicali. Istituto Superiore di Sanità. Roma : s.n., 2003. Rapporti ISTISAN 03/40.
4. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. Martino, Patrick Di. 2, 18 marzo 2018, AIMS Microbiology, Vol. 4, p. 274-288.
5. Università degli Studi del Sannio di Benevento. [Online] <https://www.dstunisannio.it/sites/default/files/2019-11/3.Biofilm%20microbici%20p2.pdf>.
6. Lucia Bonadonna, Giuliana Memoli, Gianluca Chiaretti. Formazione di biofilm su materiali a contatto con acqua: aspetti sanitari e tecnologici. Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità. Roma : Istituto Superiore di Sanità, 2008. Rapporti ISTISAN 08/19.
7. Donelli, G. Il ruolo del biofilm nella cura delle infezioni. Corso ECM Roma : Istituto Superiore di Sanità, 2010. p. 23.
8. The role of biofilm infection in urology. Tenke P., Kovacs B., Jackel M., Nagy E. 2006, World Journal of Urology, Vol. 24, p. 13-20.
9. Biofilm : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. R.M. Donlan, J.W. Costerton. 2, 2002, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 15, p. 167-93.
10. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. Sondi I., Salopek-Sondi B. 1, 2004, Journal of Colloid interface, Vol. 275, p. 177-82.
11. N.Carlone, R.Pompei, V.Tullio. Microbiologia farmaceutica. III. s.l. : EdiSES università, 2021.

12. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. James A. Driscoll, Steven L. Brody and Marin H. Kollef. 3, 2007, *Drugs*, Vol. 67, p. 351-368.
13. Care, Humanitas Medical. [Online] <https://www.humanitas-care.it/enciclopedia/infezioni/infezione-da-pseudomonas-aeruginosa/>.
14. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. E Kipnis, T Sawa, J Wiener-Kronish. 2, 02 2006, *Médecine et Maladies Infectieuses*, Vol. 36, p. 78-91.
15. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. Elin Nilsson, Anders Larsson, Hanne V Olesen, Per-Erik Wejåker, Hans Kollberg. 9, 08 2008, *Pediatric Pulmonology*, Vol. 43, p. 892-9.
16. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. K Thomsen, L Christophersen, T Bjarnsholt, P Ø Jensen, C Moser, N Høiby. 2, 03 2016, *Journal of Cystic Fibrosis*, Vol. 15, p. 171-8.
17. Centorrino, Francesco. *Microbiologia Italia*. [Online] 04 2019. <https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/come-eludere-il-sistema-immunitario-ci-pensa-lalleanza-batteri-fagi/>.
18. —. *Microbiologia Italia*. [Online] 19 04 2020. <https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/staphylococcus-epidermidis/>.
19. Coagulase-negative staphylococci and bovine mastitis: some thoughts on identification, pathogenesis, prevalence and epidemiology. Vliegheer, S. de. 6, Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium : s.n., 2006, *Large Animal Review*, Vol. 12, p. 30-35.
20. Identification of coagulase-negative staphylococci with the API STAPH-IDENT system. R. J. Almeida, J. H. Jorgensen. 2, 08 1983, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 18, p. 254-7.
21. Simplified method for the isolation, identification, and characterization of *Staphylococcus epidermidis* in epidemiologic studies. Joseph T. Parisi, Bruce H. Hamory. 1, 01 1986, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 4, p. 29-35.

22. Staphylococcus epidermidis Contributes to Healthy Maturation of the Nasal Microbiome by Stimulating Antimicrobial Peptide Production. Qian Liu, Qingyun Liu, Hongwei Meng, Huiying Lv, Yao Liu, Junlan Liu, Hua Wang, Lei He, Juanxiu Qin, Yanan Wang, Yingxin Dai, Michael Otto, Min Li. 1, 8 01 2020, Cell Host Microbe, Vol. 27, p. 68-78.
23. An Inflammatory Polypeptide Complex from Staphylococcus epidermidis: Isolation and Characterization. Klebanoff, Seymour J. 6, 15 03 1999, The journal of experimental medicine, Vol. 189, p. 907-917.
24. Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections. Otto, Micheal. 2, 03 2012, Seminars in Immunopathology , Vol. 34, p. 201-214.
25. Activity and Spectrum of Linezolid Using 6,414 Clinical Isolates from 56 Medical Centers in the United States. David J. Farrell, Rodrigo E. Mendes, James E. Ross, Helio S. Sader, Ronald N. Jones. 2, 08 2011, ASM Journals, Vol. 55, p. 3684-3690.
26. Antibiotic-resistant Staphylococcus epidermidis isolated from patients and healthy students comparing with antibiotic-resistant bacteria isolated from pasteurized milk. Mohammed G Eladli, Naiyf S Alharbi, Jamal M Khaled, Shine Kadaikunnan, Ahmed S Alobaidi, Sami A Alyahya. 4, 04 05 2018, Saudi Journal of Biological Science, Vol. 26, p. 1285–1290.
27. Salute, Ministero della. Scienza e Farmaci. Multi-resistenza dello Staphylococcus epidermidis. [Online] Ministero della Salute, 26 11 2018. http://www.quotidianosanita.it/scienza-e-farmaci/articolo.php?articolo_id=68439.
28. Nosocomial infections by Staphylococcus epidermidis: how a commensal bacterium turns into a pathogen. Wilma Ziebuhr, Susanne Hennig, Martin Eckart, Hennes Kränzler, Christoph Batzilla, Svetlana Kozitskaya. 08 2006, International Journal of Antimicrobial Agents , Vol. 28, p. 14-20.
29. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. W F Oliveira, P M S Silva, R C S Silva, G M M Silva, G Machado, L C B B Coelho, M T S Correia. 2, 02 2018, The Journal of Hospital Infection, Vol. 98, p. 111-117.
30. Staphylococcus epidermidis infections. Cuong Vuong, Michael Otto. 4, 04 2002, Microbes and Infection , Vol. 4, p. 481-9.

31. Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management. McCann, M. T., Gilmore, B. F., & Gorman, S. P. 12, 2008, Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 60, p. 1551-1571.
32. Staphylococcus epidermidis: a major player in bacterial sepsis? Otto, Michael. 12, 09 2017, Future Microbiology, Vol. 12, p. 1031-1033.
33. Reggio-Emilia, NanoLab - Università degli Studi di Modena e. [Online] 28 08 2013. https://www.nanolab.unimore.it/wp-content/uploads/2012/09/nanoparticelle_-_background_reading.pdf.
34. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. Dev Kumar Chatterjee, Parmeswaran Diagaradjane, Sunil Krishnan. 8, 01 08 2011, Therapeutic Delivery, Vol. 2, p. 1001-1014.
35. Gold nanostructures as mediators of hyperthermia therapies in breast cancer. Andreia Granja, Marina Pinheiro, Célia T Sousa, Salette Reis. 08 2021.
36. Preparation of NIR-Responsive Gold Nanocages as Efficient Carrier for Controlling Release of EGCG in Anticancer Application. Weiran Gao, Xiangyi Fan, Yunlong Bi, Zipeng Zhou, Yajiang Yuan. 02 06 2022, Frontiers in Chemistry, Vol. 10.
37. Prussian blue nanoparticles: synthesis, surface modification, and biomedical applications. Maria Antònia Busquets, Joan Estelrich. 8, 8 08 2020, Drug Discovery Today, Vol. 25.
38. Peron, Sabrina. Blu di Prussia. [Online] 2023. <https://riviste.unimi.it/index.php/MdE/article/download/20675/18340/61761>.
39. Dual mode antibacterial surfaces based on Prussian blue and silver nanoparticles. Lavinia Doveri, Angelo Taglietti, Pietro Grisoli, Piersandro Pallavicini, Giacomo Dacarro. 2023, Dalton Transactions, Vol. 52, p. 452.
40. Prussian Blue and Its Analogs as Novel Nanostructured Antibacterial Materials. Angelo Taglietti, Piersandro Pallavicini, Giacomo Dacarro. 2, Pavia : s.n., 28 04 2021, Applied nano, p. 85-97.
41. Poeti, Roberto. Il colorante Blu di Prussia: la storia del primo colorante sintetico. Chimica - prof. Roberto Poeti. [Online] 25 11 2021. <https://www.robertopoetichimica.it/il-colorante-blu-di-prussia-storia-e-struttura-chimica/>.

42. Prussian Blue Nanoparticles as a Versatile Photothermal Tool. Giacomo Dacarro, Angelo Taglietti, Piersandro Pallavicini. 11 06 2018, *Molecules*, Vol. 23, p. 1414.
43. Smith J., Lee A. *Metallic Silver: Basic Properties & Applications*. s.l. : Academic Press, 2019. p. 45-102.
44. History of the medical use of silver. W., Alexander J. 3, *Surgical Infections*, Vol. 10, p. 289-292.
45. Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. David J. Barillo, David E. Marx. Burns, Vol. 40, p. S3-S8.
46. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Mahendra Rai, Alka Yadav, Aniket Gade. 1, 2009, *Biotechnology Advances*, Vol. 27, p. 76-83.
47. 100 years of silver in medicine: Impacts and safety assessments. Nowack B., Krug, H. F. 19, 2014, *Environmental Science & Technology*, Vol. 48, p. 11717–11725.
48. Reduced rates of catheter-associated infection by use of a new silver-impregnated central venous catheter. M. Böswald, S. Lugauer, A. Regenfus, G. G. Braun, P. Martus, C. Geis, S. Scharf, T. Bechert, J. Greil, J. -P. Guggenbichler. 01 1999, *Infection*, Vol. 27, p. S56-S60.
49. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. Zubair Ahmed Ratan, Fazla Rabbi Mashrur, Anisha Parsub Chhoan, Sadi Md. Shahriar, Mohammad Faisal Haidere, Nusrat Jahan Runa, Sunggyu Kim, Dae-Hyuk Kweon. 12, 2021, *Pharmaceutics*, Vol. 13.
50. Activity of Silver Nanoparticles against *Staphylococcus* spp. Denis Swolana, Robert D. Wojtyczka. 13 04 2022, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 23.
51. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. Kalimuthu Kalishwaralal, Selvaraj BarathManiKanth, Sureshbabu Ram Kumar Pandian, Venkataraman Deepak, Sangiliyandi Gurunathan. s.l. : Elsevier, 22 04 2010, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 79, p. 340-344.
52. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Gurunathan, S., et al. 2014, *Nanoscale Res. Lett.*, Vol. 9, p. 373.

53. Antibacterial Activity of Green-Synthesized Silver Nanoparticles Using Areca catechu Extract against Antibiotic-Resistant Bacteria. Choi, J.S., et al. 2021, *Nanomaterials*, Vol. 11, p. 205.
54. Pies, Josef. *Uso terapeutico dell'argento colloidale. Prezioso antibiotico naturale. Uso terapeutico dell'argento colloidale. Prezioso antibiotico naturale.* Cesena : Macro Edizioni, 2009.
55. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. Chengzhu Liao, Yuchao Li, Sie Chin Tjong. 21 1 2019, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20, p. 449.
56. Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. Sundararaj S. Jeremiah, Kei Miyakawa, Takeshi Morita, Yutaro Yamaoka, Akihide Ryo. 11 10 2020, *Elsevier*, Vol. 533, p. 195-200.
57. Luciano Graziani, Gabriele Graziani. *L'argento colloidale: un potente rimedio naturale.* . s.l. : Macro Edizioni, 2015.
58. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. Jain P. K., Huang X., El-Sayed I. H., El-Sayed M. A. 12, *Chemical Research*, Vol. 41, p. 1578–1586.
59. Silver Nanoparticles: Review of Antiviral Properties, Mechanism of Action and Applications. Angelica Luceri, Rachele Francese, David Lembo, Monica Ferraris and Cristina Balagna. 2023, *Microorganisms*, Vol. 11, p. 629.
60. Raffaele, Università Vita-Saluta San. [Online] 3 03 2020. <https://www.univr.it/news/2020/3/viaggio-al-centro-del-virus-come-e-fatto-sars-cov-2>.
61. Two-dimensional antibacterial Pd@Ag nanosheets with a synergetic effect of plasmonic heating and Ag⁺ release. Shiguang Mo, Xiaolan Chen, Mei Chen, Caiyun He, Yinghua Lub, Nanfeng Zheng. 2015, *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 30.
62. Self-assembled monolayers of silver nanoparticles firmly grafted on glass surfaces: Low Ag⁺ release for an efficient antibacterial activity. Piersandro Pallavicini, Angelo Taglietti, Giacomo Dacarro, Yuri Antonio Diaz-Fernandez, Matteo Galli, Pietro Grisoli, Maddalena Patrini, Giorgio Santucci De Magistris, Robertino

- Zanoni. 1, 1 10 2010, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 350, p. 110-116.
63. Monolayers of polyethilenimine on flat glass: a versatile platform for cations coordination and nanoparticles grafting in the preparation of antibacterial surfaces. Giacomo Dacarro, Lucia Cucca, Pietro Grisoli, Piersandro Pallavicini, Maddalena Patrinia, Angelo Taglietti. 05 01 2012, Dalton Transaction.
 64. Self-assembled monolayers of Prussian blue nanoparticles with photothermal effect. Giacomo Dacarro, Pietro Grisoli, Mykola Borzenkov, Chiara Milanese, Emiliano Fratini, Giovanni Ferraro, Angelo Taglietti, Piersandro Pallavicini. 03 09 2017, Supramolecular Chemistry.
 65. Controlled Synthesis of Gold Nanostars by Using a Zwitterionic Surfactant. Dr. Alberto Casu, Dr. Elisa Cabrini, Dr. Alice Donà, Dr. Andrea Falqui, Dr. Yuri Diaz-Fernandez, Dr. Chiara Milanese, Prof. Angelo Taglietti, Prof. Piersandro Pallavicini. 26 06 2012, Chemistry A European Journal.
 66. Monolayers of polyethilenimine on flat glass: a versatile platform for cations coordination and nanoparticles grafting in the preparation of antibacterial surfaces. Giacomo Dacarro, Lucia Cucca, Pietro Grisoli, Piersandro Pallavicini, Maddalena Patrinia, Angelo Taglietti. 17 11 2011, Dalton Transactions, Vol. 41, p. 2456-2463.
 67. P. Pallavicini, B. Bassi, G. Chirico, M. Collini, G. Dacarro, E. Fratini, P. Grisoli, M. Patrini, L. Sironi, A. Taglietti, M. Moritz, I. Sorzabal-Bellido, A. Susarrey-Arce, E. Latter, A. J. Beckett, I. A. Prior, R. Raval and Y. A. Diaz Fernandez. 2017, Sci. Rep., Vol. 7, p. 1-10.
 68. Angolo di contatto: Definizione, Importanza ed Applicazioni. Nordtest. [Online] <https://nordtest.it/angolo-di-contatto-definizione-importanza-ed-applicazioni/>.
 69. Federico Veronesi, Davide Gardini. Sistema ottico per misure di proprietà superficiali. [Online] CNR, ISSMC. <https://www.issmc.cnr.it/ricerca/risorse/laboratorio-di-proprieta-colloidali-dinterfaccia/dsa-30/>.
 70. Ferrara, INFN. Spettroscopia UV-VIS. [Online] https://www.fe.infn.it/u/spizzo/met_fis/uv-visibile/spettroscopia_UV.pdf.

71. Spettroscopia di emissione ottica al plasma accoppiato induttivamente ICP-OES. Qualitest. [Online] <https://www.worldoftest.com/it/icp-oes>.
72. Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. N. Hadrup, A. K. Sharma and K. Loeschner. 10 2018, Regul. Toxicol. Pharmacol., Vol. 98, p. 257-267.
73. Log Reductions – a Beginner’s Guide. Endurocide - infection control. [Online] 2018. <https://www.endurocide.com/news/log-reductions-a-beginners-guide-2/>.
74. SIST. [Online] 2023. <https://cdn.standards.itech.ai/samples/74492/d29fc5f63d014477a46145f9e450c60d/SIST-EN-13697-2023.pdf>.
75. chimicambiente. EN 1276: Test quantitativo in sospensione per la valutazione dell’attività battericida di disinfettanti chimici e antisettici utilizzati in ambito alimentare, industriale, domestico e istituzionale (fase 2, stadio 1). chimicambiente. [Online] <https://www.chimicambiente.net/normativa/en-1276/>.
76. —. EN 1650: Test quantitativo in sospensione per la valutazione dell’attività fungicida o levuricida di disinfettanti chimici e antisettici utilizzati in ambito alimentare, industriale, domestico e istituzionale (fase 2, stadio 1). chimicambiente. [Online] <https://www.chimicambiente.net/normativa/en-1650/>.

8. RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero esprimere la mia più sincera e profonda gratitudine al Professore Pietro Grisoli per avermi accompagnata, con competenza e passione, nel corso di questi mesi di lavoro. La sua disponibilità, l'entusiasmo nel trasmettere il sapere, la dedizione e, soprattutto, l'umanità e l'empatia dimostrate nei miei confronti hanno rappresentato per me un riferimento importante, sia sul piano accademico che personale.

Un sentito ringraziamento va inoltre alle Dottoresse Laura Ghidoni e Lavinia Doveri: la loro esperienza, la costante disponibilità e la gentilezza con cui mi hanno affiancata sono state preziose risorse nella stesura di questa tesi.

Ringrazio con affetto la mia collega Sara Caruso, per aver condiviso con me questo cammino, offrendo sempre supporto, confronto e collaborazione.

Infine, desidero estendere la mia riconoscenza a tutti i colleghi, professori, assegnisti, borsisti di ricerca, dottorandi e collaboratori della sezione di Farmacologia: la loro presenza, disponibilità e spirito di collaborazione hanno contribuito a rendere questa esperienza ancora più ricca e stimolante.