

POLITECNICO DI TORINO



**Politecnico
di Torino**

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

**Membrane fibrose polimeriche composite con
argento ottenute mediante electrospinning e
fotoreticolazione**

Relatori Prof.ssa Vitale Alessandra Prof.ssa Bongiovanni Roberta Maria Dr. Kianfar Parnian	Candidato Tropiano Giorgio
--	--------------------------------------

Anno Accademico 2021-2022

Indice

Elenco delle figure	VI
Elenco delle tabelle	XI
1 Introduzione	1
2 Stato dell'arte	4
2.1 Processo di electrospinning	4
2.1.1 Principi di funzionamento	8
2.1.2 Parametri dell'electrospinning	12
2.1.2.1 Parametri della soluzione	12
2.1.2.2 Parametri di processo	13
2.1.2.3 Parametri ambientali	13
2.2 Cenni sulla fotoreticolazione	14
2.2.1 Fotopolimerizzazione radicalica	15
2.2.2 Fotoreticolazione radicalica	17
2.2.3 Fotoreticolazione del PEO	17
2.3 Particelle di argento	19
2.3.1 Proprietà e campi d'applicazione dell'argento	19
2.3.2 Generazione delle nanoparticelle di argento	22
2.3.2.1 Generazione di particelle di argento tramite foto-riduzione	22

2.3.3 Membrane fibrose composite contenenti particelle d'argento ottenute tramite electrospinning	24
3 Materiali e metodi	31
3.1 materiali	31
3.2 Preparazione delle soluzioni	32
3.3 Procedura di Electrospinning	33
3.4 Processo di fotoreticolazione	36
3.5 Caratterizzazione	37
3.5.1 Analisi FESEM e spettroscopia EDX	37
3.5.2 Analisi UV-Vis	39
3.5.3 Spettroscopia FT-IR (Fourier Transform Infrared)	40
3.5.4 Prove meccaniche	41
3.5.5 Test antibatterici	43
4 Risultati e discussione	44
4.1 Preparazione delle membrane	44
4.2 Analisi FESEM	46
4.3 Studio sulla generazione in situ delle particelle di argento	49
4.3.1 Spettroscopia UV-VIS	49
4.3.2 Spettroscopia EDX	55
4.4 Spettroscopia FT-IR	56

4.5 Test meccanici	61
4.6 Test antibatterici	71
5 Conclusioni	75
Riferimenti bibliografici	76

Elenco delle Figure

<i>Figura 1.1: Grafico rappresentante il numero di articoli pubblicati nel corso dell'ultimo ventennio, in cui compare nel titolo come parola chiave "Electrospinning".</i>	
<i>(La fonte è Science Direct con "Electrospinning" come parola chiave).</i>	1
<i>Figura 2.1: Schema semplificato dell'electrospinning [4].</i>	5
<i>Figura 2.2: Applicazioni dell'electrospinning [2].</i>	6
<i>Figura 2.3: Struttura base dell'electrospinning.</i>	9
<i>Figura 2.4 : Rappresentazione della traiettoria del getto polimerico [5].</i>	10
<i>Figura 2.5 Collettori comunemente utilizzati nell'electrospinning.</i>	10
<i>Figura 2.6: Configurazioni dell'electrospinning.</i>	11
<i>Figura 2.7 : Esempi di difetti ottenuti dal processo di electrospinning [14].</i>	11
<i>Figura 2.8 : Schema della reazione dei fotoiniziatori Norrish tipo I [22].</i>	15
<i>Figura 2.9: Schema della reazione dei fotoiniziatori Norrish tipo II [22].</i>	16
<i>Figura 2.10 : Schema della fotopolimerizzazione per addizione radicalica.</i>	16
<i>Figura 2.11: Schema della generazione di radicali mediante irradiazione UV del PEO in presenza del fotoiniziatore (benzofenone).</i>	18
<i>Figura 2.12: Grafico che mostra come varia il comportamento dell'argento in funzione della sua concentrazione.</i>	19
<i>Figura 2.13: Azioni biologiche dell'argento in funzione della $[Ag^+]$ e della dimensione del batterio.</i>	20
<i>Figura 2.14: Funzionamento di una stampante DLP e schematizzazione del trattamento UV [67].</i>	23
<i>Figura 2.15: Grafico logaritmico del numero di cellule vitali dei batteri</i>	

<i>S. aureus</i> rispetto al tempo di esposizione, su membrane CECh/PEO contenenti il 5% e il 10% in peso di nanoparticelle di argento [73].	25
<i>Figura 2.16: Risultato del saggio di tossicità in fluorescenza per vari batteri posti a contatto con membrane di PSf (istogrammi tratteggiati) e membrane sottoposte ad un trattamento al plasma, della durata di 60 s (istogrammi pieni) [74]</i>	25
<i>Figura 2.17: Calcolo dei diametri delle zone di inibizione : (0) 0% AgNO₃; (1) 4% AgNO₃; (2) 8% AgNO₃ [75].</i>	26
<i>Figura 3.1: Strutture molecolari dei composti utilizzati.</i>	31
<i>Figura 3.2: Schematizzazione degli step seguiti per la preparazione delle soluzioni.</i>	33
<i>Figura 3.3: Sistema di electrospinning in configurazione orizzontale.</i>	34
<i>Figura 3.4: Esempio di membrana priva di difetti.</i>	35
<i>Figura 3.5: Lampada Dymax ECE UV-curing flood.</i>	36
<i>Figura 3.6: UV Power Puck II.</i>	37
<i>Figura 3.7: Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM).</i>	38
<i>Figura 3.8: 6850 UV/Vis. Spectrophotometer JENWAY.</i>	39
<i>Figura 3.9: Nicolet Thermo Scientific iS50 FTIR spectrometer.</i>	40
<i>Figura 3.10: INSTRON 3366 electromechanical universal testing machine.</i>	41
<i>Figura 3.11: Esempio di campione utilizzato per i test meccanici.</i>	42
<i>Figura 3.12: Batteri testati. (A) batterio Gram- positivo S.Aureus. (B) batterio Gram-negativo E.coli.</i>	43
<i>Figura 4.1: Cambiamento di colore della membrana al variare del contenuto di nitrato di argento, a parità di dose ricevuta.</i>	45
<i>Figura 4.2: Esempio di cambiamento di colore per una membrana PEO-TMPTA-10Ag,</i>	

<i>al variare del tempo di irradiazione UV.</i>	45
<i>Figura 4.3: Immagini FESEM delle membrane a base PEO. (A)PEO-TMPTA.</i>	
<i>(B)PEO-TMPTA-5Ag. (C) PEO-TMPTA-10Ag.</i>	46
<i>Figura 4.4: Istogrammi delle dimensioni medie dei diametri delle fibre irradiate,</i>	
<i>esprese in nm, come media \pm deviazione standard, misurate su ingrandimenti</i>	
<i>di 15 e 20 KX (sinistra) e 50 KX (destra).</i>	47
<i>Figura 4.5: Immagini FESEM delle membrane a base PEO a diverse</i>	
<i>concentrazioni di nitrato d' argento. (A)PEO-TMPTA-5Ag. (B)PEO-TMPTA-10Ag.</i>	48
<i>Figura 4.6: Immagine FESEM di una membrana PEO-TMPTA-10Ag, dopo esser</i>	
<i>e stata immersa per un'ora in acqua distillata.</i>	49
<i>Figura 4.7: Spettri UV-Vis di una soluzione acquosa di nitrato d'argento (30mM)</i>	
<i>e benzofenone (3,2 wt% rispetto al peso di AgNO₃), sottoposta a irradiazione UV</i>	
<i>per 2, 5, 10,15, 20 e 25 minuti a 60 mW/cm².</i>	50
<i>Figura 4.8: Incurimento di una soluzione di nitrato d'argento (30 mM) e</i>	
<i>benzofenone (3,2 wt% rispetto al peso di AgNO₃), sottoposto a 60 mW/cm² di</i>	
<i>irradiazione UV. (A) campione irradiato per 10 minuti. (B) campione irradiato</i>	
<i>per 20 minuti.</i>	50
<i>Figura 4.9: Spettro di assorbimento di una soluzione di benzofenone in etanolo (1 wt%).</i>	51
<i>Figura 4.10: Spettro UV-Vis di un campione PEO-TMPTA non irradiato</i>	
<i>ed irradiato a 60 mW/cm² per 10 minuti.</i>	52
<i>Figura 4.11: Spettro UV-Vis di un campione PEO-TMPTA-1Ag non irradiato,</i>	
<i>irradiato a 60 mW/cm² per 2, 5, 10 e infine 15 minuti.</i>	53
<i>Figura 4.12: Spettro UV-Vis di un campione PEO-TMPTA-5Ag non irradiato e</i>	

<i>sottoposto a 10 minuttie 15 minuti di irradiazione UV, a 60 mW/cm².</i>	53
<i>Figura 4.13: Spettri UV-Vis ottenuti di un campione PEO-TMPTA-10Ag non irradiato, irradiato a 60 mW/cm² per 2 minuti, 5 minuti, 10 minuti e infine 15 minuti.</i>	54
<i>Figura 4.14: Spettro EDX di un campione PEO-TMPTA irradiato a 30 mW/cm² per 20 minuti.</i>	55
<i>Figura 4.15: Spettro EDX di un campione PEO-TMPTA-5Ag irradiato a 60 mW/cm² per 15 minuti.</i>	55
<i>Figura 4.16: Spettro EDX di un campione PEO-TMPTA-10Ag irradiato a 30 mW/cm² per 20 minuti.</i>	56
<i>Figura 4.17: Spettri FT-IR di una membrana PEO-TMPTA, prima e dopo un'irradiazione a 30 mW/cm² per 20 minuti.</i>	58
<i>Figura 4.18: Spettri FT-IR di una membrana PEO-TMPTA-1Ag, prima e dopo un'irradiazione a 30 mW/cm² per 20 minuti.</i>	59
<i>Figura 4.19: Spettri FT-IR di una membrana PEO-TMPTA-5Ag, prima e dopo un'irradiazione a 30 mW/cm² per 20 minuti.</i>	59
<i>Figura 4.20: Spettri FT-IR di una membrana PEO-TMPTA-10Ag, prima e dopo un'irradiazione a 30 mW/cm² per 20 minuti.</i>	60
<i>Figura 4.21: Membrana al 10 % di nitrato d'argento irradiata ad un'intensità di 30 mW/cm², per un tempo di esposizione di 10 minuti (immagine a sinistra) e 20 minuti (immagine a destra).</i>	62
<i>Figura 4.22: grafici sforzo in trazione, in MPa (in ordinata) – deformazione % (in ascissa). Per ogni tipologia di campione sono state riportate 3 curve.</i>	63
<i>Figura 4.23: Istogramma del modulo di Modulo di Young.</i>	63
<i>Figura 4.24: Istogramma dell'allungamento a rottura.</i>	64

<i>Figura 4.25: Istogramma del massimo sforzo a trazione.</i>	64
<i>Figura 4.26: Istogramma del modulo di Modulo di Young per un campione PEO-TMPTA-10Ag, ottenuto a diversi spessori.</i>	65
<i>Figura 4.27: Istogramma dell'allungamento a rottura per un campione PEO-TMPTA-10Ag, ottenuto a diversi spessori.</i>	65
<i>Figura 4.28: Istogramma del massimo sforzo a trazione per un campione PEO-TMPTA-10Ag, ottenuto a diversi spessori.</i>	66
<i>Figura 4.29: Istogramma del modulo di Modulo di Young per un campione PEO-TMPTA, ottenuto in condizioni di processo differente.</i>	67
<i>Figura 4.30: Istogramma dell'allungamento a rottura per un campione PEO-TMPTA, ottenuto in condizioni di processo differente.</i>	67
<i>Figura 4.31: Istogramma del massimo sforzo a trazione per un campione PEO-TMPTA, ottenuto in condizioni di processo differente.</i>	68
<i>Figura 4.32: Istogramma del modulo di Young per lo stesso campione PEO-TMPTA-1Ag, testato consecutivamente. In ascissa è riportato il test meccanico: TEST 1 (campione sottoposto al primo test di trazione), TEST 2 (campione testato dopo essere stato sottoposto al TEST 1).</i>	69
<i>Figura 4.33: Istogramma dell'allungamento a rottura per lo stesso campione PEO-TMPTA-1Ag, testato consecutivamente. In ascissa è riportato il test meccanico: TEST 1 (campione sottoposto al primo test di trazione), TEST 2 (campione testato dopo essere stato sottoposto al TEST 1).</i>	70
<i>Figura 4.34: Istogramma del massimo sforzo a trazione per lo stesso campione PEO-TMPTA-1Ag, testato consecutivamente. In ascissa è riportato il test meccanico:</i>	

<i>TEST 1 (campione sottoposto al primo test di trazione),</i>	
<i>TEST 2 (campione testato dopo essere stato sottoposto al TEST 1).</i>	70
<i>Figura 4.35: Esempio di antibiogramma eseguito con la metodica di Agar-diffusione, effettuato su campioni circolari di 1 cm di diametro.</i>	72
<i>Figura 4.36: istogramma del diametro medio dell'alone di inibizione (mm)(Risultati del test di Kirby- Bauer per il batterio S.aureus).</i>	73
<i>Figura 4.37: istogramma del diametro medio dell'alone di inibizione (mm), calcolati sul campione PEO-TMPTA-10Ag (Risultati del test di Kirby- Bauer per il batterio S.aureus e E.coli).</i>	73

Elenco delle tabelle

<i>Tabella 2.1 :Materiali e solventi maggiormente diffusi nell'electrospinning [1], [2], [5], [6].</i>	7
<i>Tabella 2.2: Applicazioni biomediche delle nano particelle d'argento.</i>	21
<i>Tabella 2.3: Proprietà meccaniche di membrane nanofibrose chitosano/PEO con quantità variabili di AgNO₃ [75].</i>	26
<i>Tabella 2.4: sintesi delle attività antibatteriche [76].</i>	27
<i>Tabella 2.5: Resistenza a trazione e allungamento a rottura delle nanofibre composite con FK/PVA/PEO, con differenti quantità di nanoparticelle [77].</i>	28
<i>Tabella 2.6: Diametro della zona di inibizione delle nanofibre composite per E. coli e S. aureus [77].</i>	28
<i>Tabella 2.7: Proprietà meccaniche delle nanofibre PEO-PCL [78].</i>	29
<i>Tabella 3.1: composizione dei campioni investigati.</i>	32
<i>Tabella 3.2: Tabella rappresentante gli spessori medi ottenuti per circa 4 ore di electrospinning.</i>	35
<i>Tabella 3.3: Potenza di irraggiamento, tempo e dose utilizzati per l'analisi FESEM.</i>	38
<i>Tabella 3.4: Potenza di irraggiamento, tempo e dose utilizzati per la spettroscopia UV-Vis.</i>	40
<i>Tabella 4.1: Dimensioni medie dei diametri delle fibre PEO-TMPTA, PEO-TMPTA-5Ag,</i>	

<i>PEO-TMPTA-10Ag, espresse in nm, come media \pm deviazione standard, dopo essere state irradiate, misurate su ingrandimenti di 15, 20 e 50 KX.</i>	47
<i>Tabella 4.2: Numeri d'onda caratteristici del PEO, analizzato mediante spettroscopia ATR FT-IR.</i>	57
<i>Tabella 4.3: Numeri d'onda caratteristici del TMPTA, analizzato mediante spettroscopia ATR FT-IR.</i>	57
<i>Tabella 4.4: Numero d'onda caratteristico del nitrato di argento, analizzato mediante spettroscopia ATR FT-IR.</i>	57
<i>Tabella 4.5: Numeri d'onda caratteristici delle nanoparticelle di argento, analizzato mediante spettroscopia ATR FT-IR.</i>	57
<i>Tabella 4.6: Percentuali di conversione C=C.</i>	61
<i>Tabella 4.7: Grandezze meccaniche per un provino PEO-TMPTA-10Ag, sottoposto a 2 prove meccaniche consecutive. Con TEST 1 si identifica la prima prova di trazione, mentre con TEST 2 la seconda prova di trazione.</i>	71
<i>Tabella 4.8: diametri medi dell'alone di inibizione (mm) (media \pm deviazione standard), calcolati su <i>S.Aureus</i> e <i>E.Coli</i> (Risultati del test di Kirby- Bauer).</i>	72

Capitolo 1

Introduzione

Questo elaborato prende le mosse dall'interesse nel campo della produzione di nanofibre, attraverso la tecnica dell'electrospinnig. Questa tecnica viene riconosciuta a livello internazionale come una delle nanotecnologie con un ruolo chiave nel futuro. Attualmente risulta essere la tecnologia più economica, versatile ed efficiente per produrre membrane polimeriche attraverso l'applicazione di una differenza di tensione. Come mostra la Figura 1.1, la ricerca e l'utilizzo di questa tecnica è aumentata nel corso dell'ultimo ventennio, non solo per la sua versatilità nel produrre membrane, ma anche per la capacità di creare fibre che vanno dalla decina di nanometri ai micrometri [1][2], partendo da diverse soluzioni polimeriche. La tecnica dell'electrospinning può essere usata sia con polimeri naturali (polisaccaridi, polipeptidi e proteine) che sintetici (poliammidi, poliolefine, poliesteri, aramidici e poliacrilato).

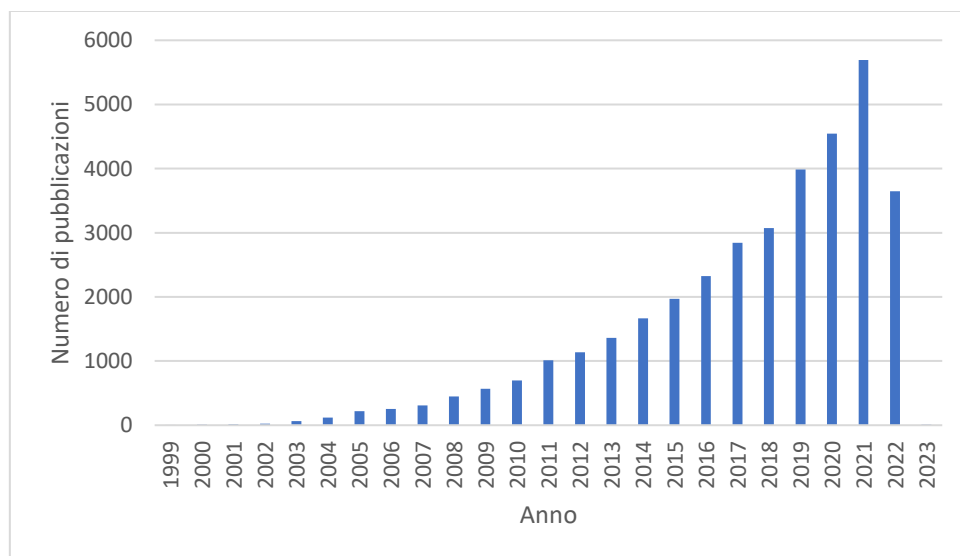


Figura 1.1: Grafico rappresentante il numero di articoli pubblicati nel corso dell'ultimo ventennio, in cui compare nel titolo come parola chiave "Electrospinning". (La fonte è Science Direct con "Electrospinning" come parola chiave).

Il motivo principale per il quale l'elettrospinning si è sviluppato è riconducibile al suo vasto campo di applicazione delle nanofibre. Queste vengono non solo impiegate come rinforzo per i materiali compositi, ma anche adoperate nei sistemi di filtrazione, negli indumenti protettivi, nella realizzazione di protesi di tessuti molli in area biomedica, ecc...

In questo lavoro di tesi sono state prodotte e caratterizzate membrane di nanofibre polimeriche, inglobanti (nano)particelle d'argento, contestualizzando la trattazione in ambito biomedico. Entrando nel merito della struttura dell'elaborato, questo è diviso in due parti.

Una parte (Capitolo 2) che descrive lo stato dell'arte sull'argomento trattato in questa tesi, illustrando quindi la tecnica di elettrospinning, le caratteristiche delle (nano)particelle di argento ed il processo di fotoreticolazione. Vengono inoltre presentati alcuni studi che riportano la preparazione e caratterizzazione di membrane fibrose composite contenenti particelle d'argento come filler.

Un'altra parte (Capitoli 3 e 4) che presenta il lavoro sperimentale svolto. Questo propone lo studio di membrane fibrose composite a base polietilenoossido (PEO) e particelle d'argento. In particolare, soluzioni acquose polimeriche sono state sottoposte ad elettrospinning e le membrane fibrose ottenute sono state irradiate con luce UV, per permettere la reticolazione delle catene di PEO e la generazione delle particelle di argento tramite la riduzione fotoindotta del nitrato d'argento. Le membrane nanofibrose sono poi state caratterizzate morfologicamente, chimicamente e meccanicamente, ed infine ne sono state analizzate le proprietà antibatteriche.

Il lavoro svolto ha l'obiettivo di analizzare e verificare:

- L'influenza delle particelle di argento sulla morfologia e sul diametro delle nanofibre;
- L'effettiva comparsa delle particelle di argento, a seguito dell'irradiazione UV;
- L'effetto delle particelle di argento sulle proprietà meccaniche delle membrane composite;
- Le proprietà antibatteriche delle nanofibre polimeriche inglobanti particelle di argento.

In particolare, sono state eseguite analisi al microscopio elettronico FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) per valutare la morfologia delle fibre, analisi di spettroscopia UV-Vis (UV-

Visible) e EDX (Energy Dispersive X-ray Analysis) per confermare la presenza delle particelle di argento, analisi di spettroscopia FT-IR (Fourier Transform Infrared) per verificare la corretta fotoreticolazione. Infine, sono stati compiuti test di trazione per lo studio delle proprietà meccaniche e test di Kirby Bauer, per valutare le proprietà antibatteriche conferite dalle particelle di argento alle nanofibre.

Infine, la tesi si conclude con le conclusioni (Capitolo 5).

Capitolo 2

Stato dell'arte

L'oggetto di questo capitolo è descrivere lo stato dell'arte sulle membrane fibrose composite contenenti particelle d'argento ottenute tramite electrospinning. Verrà quindi descritto il processo di electrospinning per la realizzazione di (nano)fibre polimeriche, il processo di reticolazione fotoindotta ed il processo di formazione di (nano)particelle d'argento. Verranno infine riportati alcuni studi di letteratura riguardanti la preparazione e la caratterizzazione di sistemi compositi con particelle d'argento sotto forma di membrane fibrose.

2.1 Processo di electrospinning

‘La nanotecnologia è la comprensione e il controllo della materia a dimensioni comprese tra 1 e 100 nanometri, dove fenomeni unici possono permettere nuove applicazioni’[3]. La definizione sopra riportata è stata data dalla National Nanotechnology Initiative. Questa definizione ci vuol dire che alla nanoscala i materiali presentano delle proprietà fisiche, chimiche e biologiche differenti da quelle che si hanno alla macroscale, proprietà che possiamo sfruttare a nostro vantaggio in campo biologico e medicale. Dunque, in questo ultimo caso si parlerà di bionanotecnologie. Le bionanotecnologie sono un tema vastissimo, che abbraccia numerose tematiche. Tra queste emerge un processo produttivo elettrodinamico, l'electrospinning, che si contraddistingue per la sua semplicità di utilizzo, ma al tempo stesso efficacia.

L'electrospinning (o elettrofilatura) è un processo di lavorazione di materiali polimerici che permette di ottenere delle fibre di dimensioni micrometriche e nanometriche, attraverso un procedimento *contactless*, che consiste nel depositare su un collettore fibre sottili estruse da una siringa (Figura 2.1).

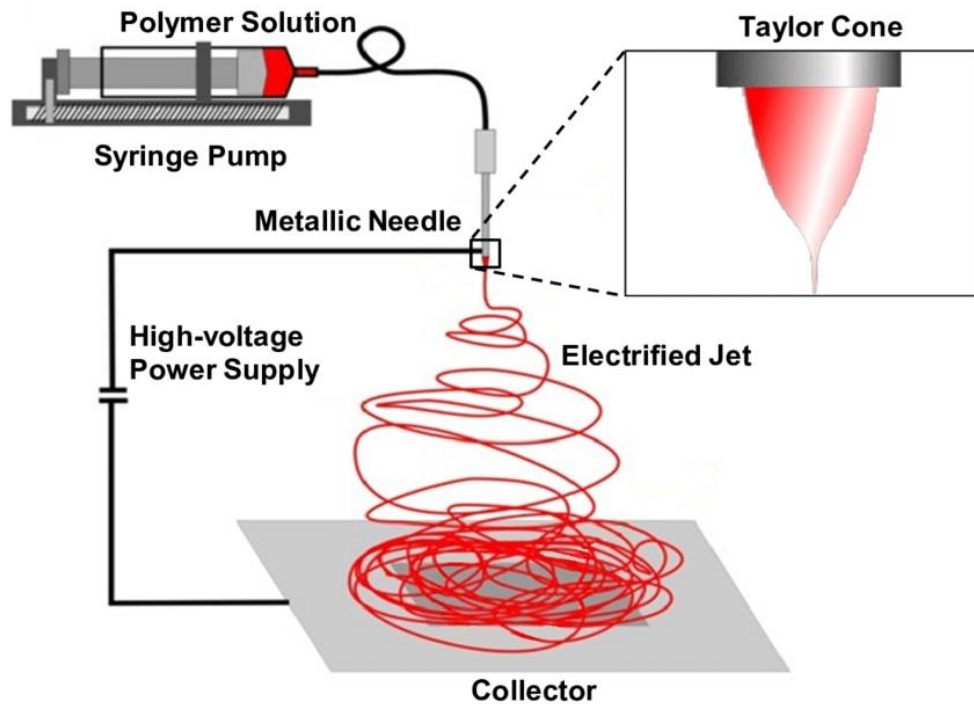


Figura 2.1: Schema semplificato dell'electrospinning [4].

Questa tecnica è molto versatile in quanto trova spazio in molte applicazioni. Alcuni esempi applicativi [2][5] sono la realizzazione di:

- materiali fibrosi per la filtrazione, impiegati come filtri per l'aria ad esempio
- compositi rinforzati con nanofibre, la cui funzione è quella di migliorare le proprietà meccaniche (rigidezza e resistenza a trazione), oppure conferire maggiore resistenza ai laminati (quando tra questi è frapposto uno strato di nano fibre che non altera spessore e peso)
- sensori flessibili a base di nanofibre, come ad esempio sistemi permeabili a vapore acqueo e aria, ma reattivi verso gas nervini e altri prodotti chimici, utilizzabili nell'abbigliamento protettivo
- nanofibre conduttive per la realizzazione di: sensori, attuatori e elettrodi porosi per batterie ad alte prestazioni; membrane per la protezione dalla corrosione; membrane per apparecchiature fotovoltaiche

- compositi con particolari proprietà ottiche, come ad esempio sistemi a base di cristalli liquidi e nanofibre che, per effetto di un campo elettrico, cambiano da uno stato in cui sono trasparenti alla luce ad uno in cui sono opachi, sfruttabili in applicazioni ottiche.

In particolare, nei campi biomedici [2][5] l'electrospinning trova applicazione in:

- membrane coinvolte nel rilascio di farmaci
- tessuti nanofibrosi che si frappongono tra protesi e tessuti biologici
- scaffold che mimano la struttura dell'ECM (ingegneria tissutale)
- maschere per la pelle a base di nanofibre, per il settore cosmetico
- cerotti per la medicazione delle ferite.

La Figura 2.2 schematizza i vari campi di applicazione dell'electrospinning.

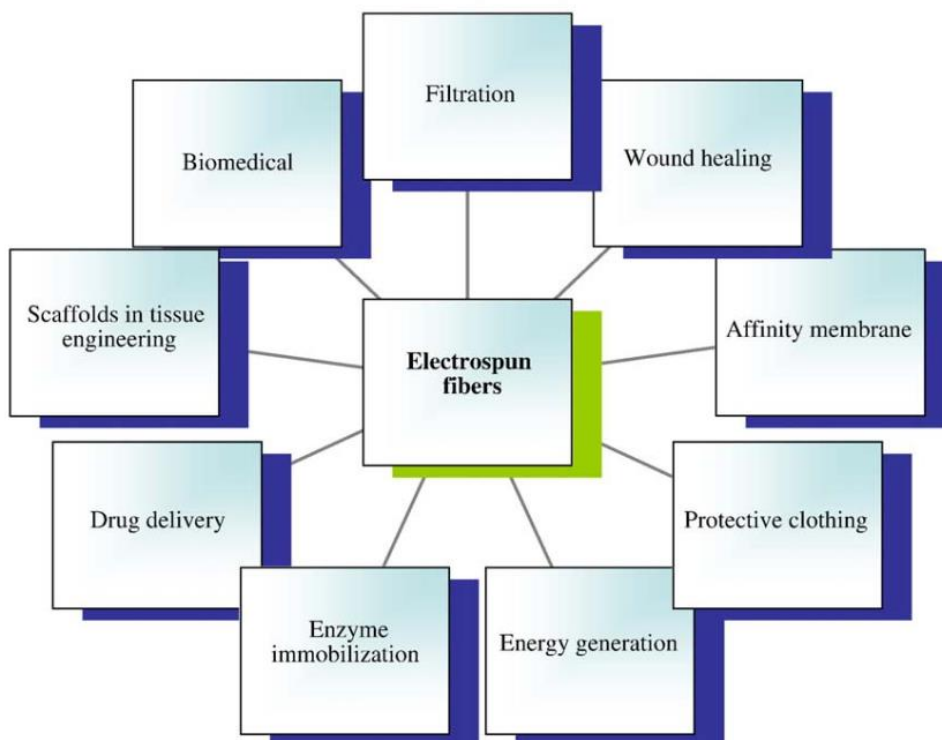


Figura 2.2: Applicazioni dell'electrospinning [2].

Questa versatilità è dovuta soprattutto all'elevato rapporto superficie/volume, all'ampia area superficiale, alle eccellenti prestazioni meccaniche delle membrane tridimensionali,

all'interconnessione tra i pori e infine all'ampia gamma di polimeri sintetici e naturali che possono essere utilizzati. Tra i polimeri sintetici impiegati in questa tecnica rientrano poliammidi, poliolefine, poliesteri, fibre di aramide e poliacrilati. Invece tra i polimeri naturali si annoverano proteine, polisaccardi e polipeptidi [2][5].

La Tabella 2.1 riporta i principali polimeri impiegati nell'electrospinning per la produzione di nanofibre, insieme ai solventi utilizzati per ogni sistema.

Materiale	Solvente
Nylon - 6	Acido formico e acido acetico
Poliacrilonitrile (PAN)	Dimetilsolfossido (DMSO), N,N-dimetilformammide (DMF) e acido trifluoroacetico
Policrapolattone (PCL)	Esafluoroisopropanolo (HFIP), cloroformio : metanolo (3:1), toluene : metanolo (1:1) e diclorometano : metanolo (3:1)
PEO	Acqua, cloroformio, acetone e etanolo
Acido polilattico (PLA)	DMF, cloroformio e diclorometano
Polistirene (PS)	DMF, tetraidrofurano (THF), metiletilchetone (MEK), toluene, cloroformio, solfuro di carbonio (CS ₂) e DMF
Polivinilcloruro (PVC)	THF e DMF
Policarbonato (PC)	THF, THF : DMF (1:1) e diclorometano
Chitosano	Acido trifluoroetano
Chitosano - PEO	Acqua
Collagene	HFIP e esafluoro-2-propanolo
Collagene - PEO	Acido cloridrico
Gelatina	Trifluoroetano e HFIP
Alcol polivinilico (PVA)	Acqua, propanolo, isopropanolo e etanolo
Polivinilpirrolidone (PVP)	DMF, acqua, etanolo, isopropanolo e acido acetico
Polimetilmetacrilato (PMMA)	DMF e cloroformio

Tabella 2.1 :Materiali e solventi maggiormente diffusi nell'electrospinning [1], [2], [5], [6].

Come riportato in Tabella 2.1, uno dei materiali più utilizzati nell'electrospinning è il PEO, un polietere sintetico cristallino e termoplastico con formula generale $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$. Il PEO viene ampiamente utilizzato nelle applicazioni biomediche [7][8][9][10], per via della sua biocompatibilità, ovvero la sua proprietà di essere ben tollerato dall'essere umano e non immunogenicità, perciò la sua capacità di non indurre una risposta immunitaria. Inoltre, il PEO si contraddistingue per la sua eccezionale stabilità, perciò la sua tendenza a conservare la propria composizione chimica e inerzia, dunque la sua attitudine a non reagire chimicamente con gli altri materiali o specie chimiche. Tuttavia, questo polimero è solubile in acqua, così come nei comuni solventi organici [11]. La solubilità del PEO limita il suo utilizzo, motivo per cui è necessario reticolare le catene di PEO, per rendere la membrana insolubile in acqua e per migliorarne le sue proprietà [12][13].

2.1.1 Principi di funzionamento

Un sistema per electrospinning, come mostrato nella Figura 2.3, è costituito principalmente da:

- una siringa, che contiene la soluzione polimerica (o il fuso polimerico)
- una pompa, che genera il flusso di soluzione polimerica, quindi spinge la soluzione fuori dall'ugello
- un generatore di tensione, che genera la differenza di potenziale tra l'ugello e il collettore
- un collettore metallico, che raccoglie le fibre.

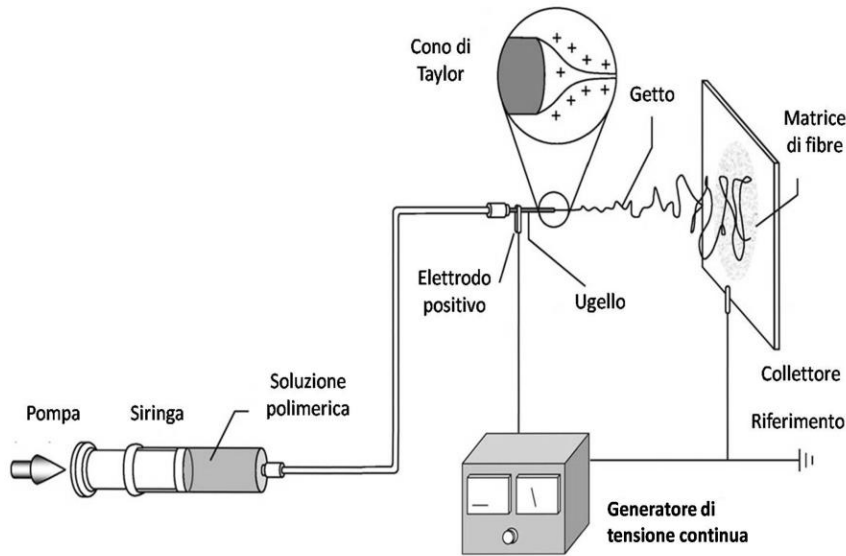


Figura 2.3: Struttura base dell'elettrospinning.

In particolare, la pompa spinge la siringa e la soluzione polimerica fuoriesce dall'ugello dell'ago della siringa. L'ugello è collegato al polo positivo del generatore di tensione continua, mentre il collettore è collegato a terra. Per effetto del campo elettrico applicato, il diametro della soluzione che fuoriesce dall'ago si assottiglia e questo permette di generare il filamento di dimensione nanometrica, che si depositerà sul collettore. In particolare, incrementando il campo elettrico, la superficie emisferica del fluido alla cima del capillare si allunga a forma conica. Quindi da un cilindro diventa un cono, che viene chiamato 'cono di Taylor'. Esiste un valore critico di intensità del campo elettrico per cui la forza elettrostatica vince la tensione superficiale, responsabile di tenere insieme il fluido, e dunque il getto di fluido carico elettricamente fuoriesce dalla punta del cono di Taylor. Durante il tragitto, il solvente presente nel filamento evapora lasciando dietro di sé una fibra polimerica con un diametro ulteriormente ridotto.

Inizialmente il getto è rettilineo, successivamente quando le forze agenti sulle cariche elettriche portate dal getto superano le forze coesive dentro il getto, il singolo getto si divide in più getti carichi con approssimativamente lo stesso diametro e carica per unità di lunghezza. Si è nella cosiddetta 'zona del getto'. Il filamento poi entra nella 'zona di instabilità', in cui a causa delle forze agenti sulle cariche

elettriche il getto incomincia a descrivere delle traiettorie circolari. Dunque, il getto curva in un crescendo di spirali con circonferenze sempre più larghe e diametri della fibra sempre più sottili, come rappresentato nella Figura 2.4.

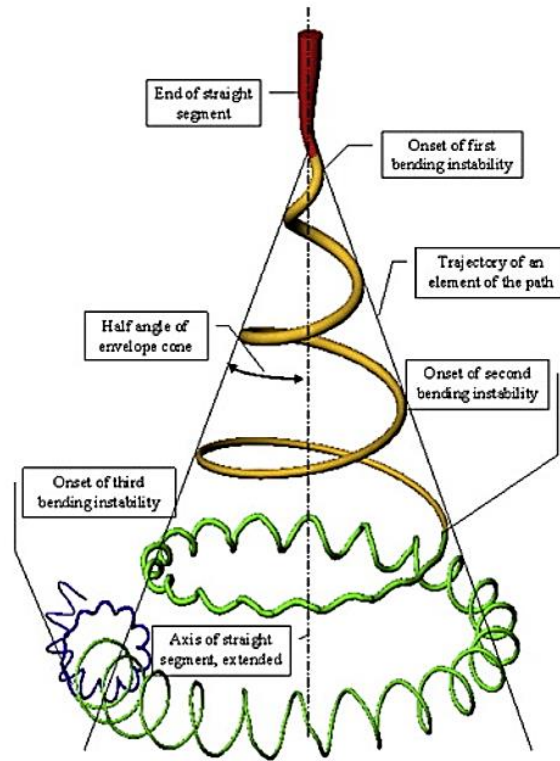


Figura 2.4 : Rappresentazione della traiettoria del getto polimerico [5].

Alla fine, le fibre si depositeranno su un collettore, che può essere un piano metallico (come sarà per questa tesi), una rete, oppure sistemi avanzati, per ottenere fibre allineate: un cilindro rotante, degli anelli o delle bacchette metalliche (Figura 2.5).

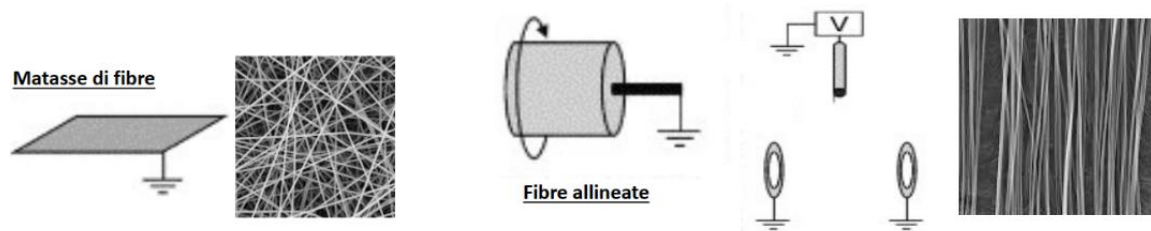
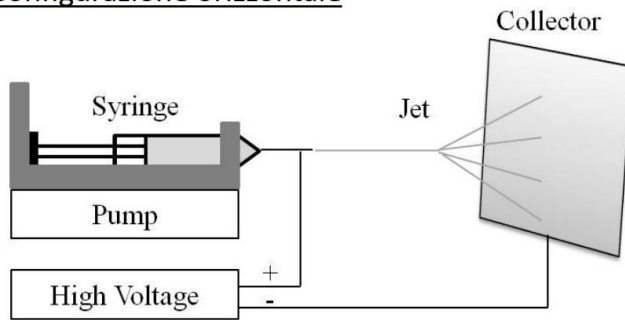


Figura 2.5: Collettori comunemente utilizzati nell'electrospinning.

L'electrospinning è quindi un sistema abbastanza semplice da realizzare che può configurarsi in due modi diversi: una configurazione orizzontale e una configurazione verticale (Figura 2.6).

CONFIGURAZIONI ELECTROSPINNING

Configurazione orizzontale



Configurazione verticale

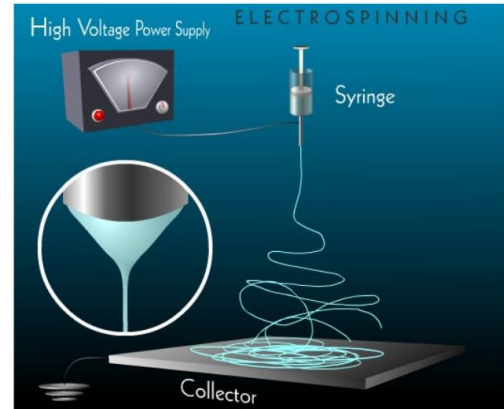


Figura 2.6: Configurazioni dell'electrospinning.

Il sistema fibroso ottenuto per electrospinning può presentare dei difetti quali i beads (perline), i nastri e i difetti superficiali, come si può vedere in Figura 2.7. I beads sono dei rigonfiamenti della fibra, dei punti in cui la fibra si allarga in strutture di forma globulare. I nastri sono fibre ancora ricche di solvente che collassano su sé stesse perdendo la geometria cilindrica, infine i difetti superficiali sono ad esempio la porosità e la rugosità delle fibre, dovute in genere ad un'incompleta evaporazione del solvente.

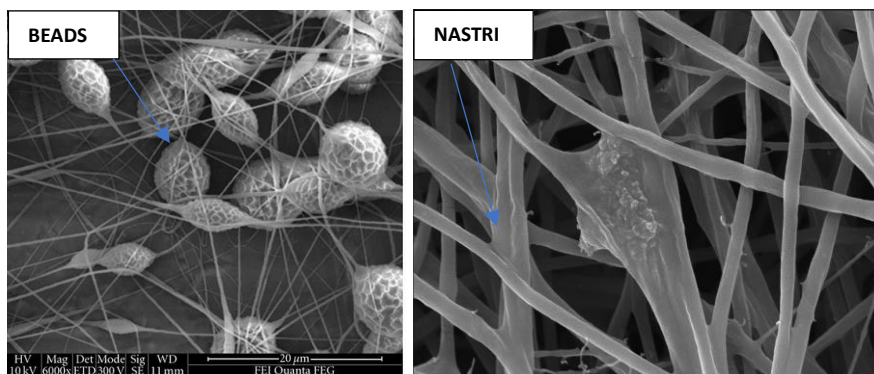


Figura 2.7: Esempi di difetti ottenuti dal processo di electrospinning [14].

2.1.2 Parametri dell'electrospinning

Per ridurre questi difetti ed ottenere fibre con morfologia e dimensioni controllate è necessario ottimizzare i parametri di sistema e di processo. I parametri di sistema sono il peso molecolare, la struttura del polimero (lineare, ramificato, ecc.) e le proprietà della soluzione (viscosità, conducibilità, tensione superficiale, concentrazione). I parametri di processo sono invece il potenziale elettrico, la distanza tra capillare e collettore, la velocità del flusso della soluzione polimerica, i parametri ambientali (temperatura, umidità, velocità dell'aria nella camera) ed infine la movimentazione del collettore.

2.1.2.1 Parametri della soluzione

Per un processo ottimale di electrospinning è necessario che la concentrazione della soluzione polimerica utilizzata stia all'interno di un certo intervallo, perché altrimenti al di sotto della concentrazione minima invece di generarsi un filamento continuo si hanno delle goccioline, al contrario al di sopra di una concentrazione massima la soluzione diventa troppo viscosa da poter uscire in maniera continua dall'ugello.

Anche la viscosità della soluzione deve rientrare in un range, in particolare aumentando la viscosità il diametro delle fibre tende ad aumentare. A viscosità troppo basse, non si formano fibre continue, mentre a viscosità troppo elevate, il getto polimerico ha difficoltà a formarsi.

Un altro fattore da considerare per la riduzione dei difetti è la tensione superficiale, che dipende principalmente dal tipo di solvente utilizzato. Una bassa tensione superficiale riduce la presenza di difetti come i beads. Al contrario, una elevata tensione superficiale rende il getto instabile, portando all'insorgenza di difetti.

L'alto peso molecolare, inoltre, facilita la filabilità dei polimeri; al contrario con un basso peso molecolare è più probabile che si formino dei beads. In aggiunta, questo parametro è correlato al diametro delle fibre: all'aumentare del peso molecolare, il diametro delle fibre incrementerà.

L'ottenimento desiderato delle fibre è determinato anche dalla conduttività elettrica della soluzione, poiché il diametro delle fibre aumenta al decrescere della conduttività. Tuttavia, se quest'ultima è al di

sotto di un valore minimo la fibra mostrerà dei difetti (beads); all'opposto soluzioni smisuratamente conduttive potranno portare a fibre con diametri molto disomogenei. Risulta dunque che anche in questo caso esistere un range di conduttività ottimale.[5]

Anche dalla struttura del polimero può dipendere l'ottenimento di membrane fibrose con desiderate proprietà: un polimero a struttura lineare si dimostrerà più facilmente filabile, maggiormente solubile e con una minor tendenza a creare strutture disordinate, a causa delle molte interazioni intercatena.

2.1.2.2 Parametri di processo

Tra i parametri di processo che influenzano la morfologia e la dimensione delle fibre si ha sicuramente la tensione applicata. Come per gli altri parametri, anche in questo caso esiste un valore minimo al di sotto del quale le fibre non si formano; invece aumentandone il valore, il diametro delle fibre tenderà a diminuire. Alcuni autori hanno però osservato che ad alte tensioni si ha un incremento del diametro, causato dal maggiore getto eiettato [5].

La velocità con cui viene alimentata la siringa influenza la velocità del getto e il processo di evaporazione del solvente, che è anche influenzato dalla distanza del collettore dall'ago. Sono preferibili basse velocità di alimentazione, dunque bassi flussi, e una distanza adeguata, per consentire al solvente di evaporare, prima di adagiarsi sul collettore; al contrario, quando il flusso è troppo elevato oppure la distanza non è corretta, l'evaporazione non è idonea, con conseguente formazione di fibre con difetti. Tuttavia, se si vuole un diametro delle fibre maggiore e pori più grandi il flusso deve essere aumentato [15].

2.1.2.3 Parametri ambientali

Tra i parametri di processo rientrano i parametri ambientali. È stato osservato che la velocità di evaporazione del solvente aumenta al diminuire del tasso di umidità. Quando il tasso di umidità è troppo basso, sarà impossibile il processo di elettrofilatura, in quanto non sarà possibile estrarre il getto dalla

punta dell'ago, per via dell'elevata velocità di evaporazione del solvente. Anche la dimensione dei pori e il diametro delle fibre dipendono dal valore di umidità: se quest'ultimo è troppo elevato dapprima si hanno piccoli pori, che in seguito si uniscono; quando invece il tasso di umidità è basso, le fibre presenteranno un diametro minore e una superficie più compatta [5].

Anche la temperatura influenza il processo di elettrofilatura, agendo sulla viscosità del soluto o del fuso. Ad un aumento della temperatura consegue una diminuzione del diametro della fibra, dovuto all'abbassamento della viscosità, contemporaneamente una maggiore evaporazione del solvente che potrebbe essere causa di difetti [5].

2.2 Cenni sulla fotoreticolazione

La reticolazione chimica è una reazione che crea dei legami fra diverse catene polimeriche sfruttando gruppi funzionali reattivi. Questi legami possono essere di tipo covalente oppure ionico, che sono entrambi dei legami forti.

In questo studio la reticolazione covalente è avvenuta per irradiazione UV tramite meccanismo radicalico. Questa tecnica (fotoreticolazione), già adottata in letteratura per la reticolazione del PEO [12][16][17], si è mostrata essere accessibile e *eco-friendly* sia quando il polimero era allo stato solido che quando era in soluzione [18]. Inoltre, la reticolazione per irradiazione UV presenta ulteriori vantaggi: tempi brevi di conversione, consumi energetici bassi, reticolazione selettiva e possibilità di condurre una polimerizzazione rapida anche a temperatura ambiente. Questa tecnica dunque risulta applicabile anche per quei materiali che non possono essere processati a temperature elevate [19]. Tuttavia ha però uno svantaggio, ovvero il potere di penetrazione della luce, che riesce a penetrare soltanto per circa 200 μm dalla superficie [20]. Ciò nonostante, tale problema non si pone per membrane molto sottili, come nel caso di quelle ottenute per *electrospinning*.

Per comprendere nel dettaglio come avviene il processo di reticolazione radicalica, è bene introdurre come avviene la polimerizzazione radicalica, poiché i due processi condividono lo stesso schema di reazione: generazione delle specie reattive (radicali) a cui segue l'inizio, la propagazione e la

terminazione della catena. La differenza principale è che nella fotopolimerizzazione i radicali vengono generati a partire dai monomeri, mentre nella fotoreticolazione le lunghe catene polimeriche formano macro-radicali. Dunque, nella fotopolimerizzazione le reazioni vengono avviate dai monomeri e di conseguenza vengono generati i polimeri. Al contrario, nella fotoreticolazione, le reazioni vengono avviate dai polimeri, i legami covalenti si formano tra le catene polimeriche e di conseguenza si genera la struttura reticolata tridimensionale. Spesso fotopolimerizzazione e fotoreticolazione avvengono in modo concomitante.

2.2.1 Fotopolimerizzazione radicalica

La fotopolimerizzazione può essere innescata da diversi tipi di radiazioni: luminosa, raggi UV, raggi IR oppure raggi ad alta energia quali raggi γ o fascio di elettroni.[21] Sebbene esistano diverse tipologie di fotopolimerizzazione, nel seguito sarà esposta unicamente la fotopolimerizzazione per via radicalica, poiché è il tipo di polimerizzazione adottato in questo lavoro di tesi.

Nel processo di fotopolimerizzazione, è necessario un fotoiniziatore che assorba la radiazione e produca radicali liberi, dando inizio alla reazione di polimerizzazione. Il fotoiniziatore è molto importante in quanto determina la velocità della reazione di polimerizzazione e la profondità di reticolazione. I fotoiniziatori UV radicalici possono essere classificati in:

- Fotoiniziatori Norrish tipo I, che sono costituiti principalmente da carbonili aromatici. In presenza di radiazione luminosa questi fotoiniziatori sono soggetti a rottura omolitica, generando due radicali che possono far avvenire la reazione, come mostrato in Figura 2.8.

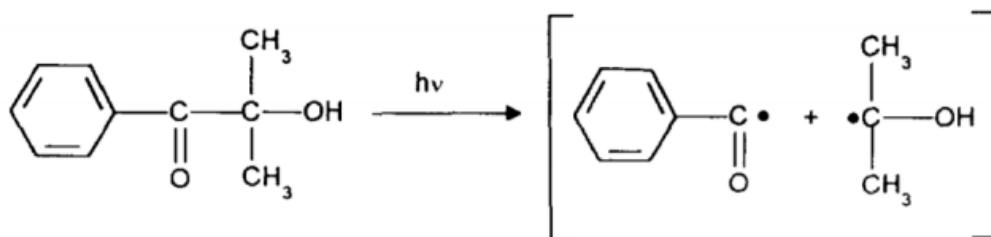


Figura 2.8 : Schema della reazione dei fotoiniziatori Norrish tipo I [22].

- Fotoiniziatori Norrish tipo II, in cui rientra il benzofenone. Essi assorbono la radiazione UV, formando uno stato eccitato in grado di estrarre un idrogeno dalla molecola donatrice (monomero o polimero). Si formano dunque un gruppo ossidrilico e due radicali che fanno partire la reazione. La Figura 2.9 mostra la reazione di un fotoiniziatore Norrish tipo II.

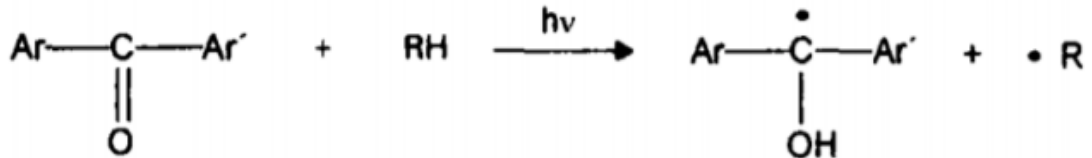


Figura 2.9 : Schema della reazione dei fotoiniziatori Norrish tipo II [22].

Nella Figura 2.10 è presentato uno schema del processo di fotopolimerizzazione, dove PI è il fotoiniziatore, R· il radicale formato e M il monomero.

- I) $\text{PI} + h\nu \rightarrow \text{R}\cdot + \text{R}\cdot$ Scissione omolitica del fotoiniziatore e formazione dei radicali
- II) $\text{R}\cdot + \text{M} \rightarrow \text{R-M}\cdot$ Iniziazione della polimerizzazione radicalica
 $\text{R-M}\cdot + \text{M} \rightarrow \text{R-M-M}\cdot$
- III) $\text{R-M-M}\cdot + \text{M} \rightarrow \text{R-M-M-M}\cdot$ Propagazione
 [...]

 $\text{R-M}_n\cdot$
- IV) a. $\text{M}_n\cdot + \text{M}_{m-n}\cdot \rightarrow \text{M}_m$ (accoppiamento) Terminazione
 b. $\text{M}_n\cdot + \text{M}_{m-n}\cdot \rightarrow \text{M}_n + \text{M}_{m-n}$ (disproporzione) Terminazione

Figura 2.10 : Schema della fotopolimerizzazione per addizione radicalica.

Nella fase iniziale il fotoiniziatore assorbe la radiazione incidente e genera due radicali, dei quali solitamente uno solo è attivo nella fase di iniziazione della polimerizzazione; il radicale formatosi per via fotochimica attacca un monomero per formare una nuova specie radicalica.

In seguito, si ha la propagazione della reazione radicalica, con le catene polimeriche che crescono rapidamente, aggiungendo alle terminazioni radicaliche nuovi monomeri. Infine, la terminazione può avvenire per accoppiamento di due catene radicaliche o per disproporzione con spegnimento dei radicali [23]. Nel caso reale può anche accadere che la catena polimerica radicalica si inattivi per estrazione di idrogeno da una seconda catena polimerica, al quale viene conseguentemente trasferita la specie radicalica [23].

2.2.2 Fotoreticolazione radicalica

Analogamente al processo di fotopolimerizzazione, anche la fotoreticolazione include le fasi di ‘inizio’, ‘propagazione’ ed ‘terminazione’, definite ciascuna da una propria cinetica di reazione. In una prima fase avviene l’assorbimento della luce da parte del fotoiniziatore e la conseguente generazione dei radicali. Quest’ultimi reagendo con le funzionalità presenti sulla catena polimerica danno origine a dei legami covalenti e a radicali intermedi, che, legandosi ad altre funzionalità sulla catena, continueranno la fase di propagazione. Alla propagazione segue la fase di terminazione, che, analogamente alla fotopolimerizzazione, può avvenire attraverso accoppiamento radicalico, disproporzione e trasferimento.

Al termine del processo di fotoreticolazione si può assistere ad un restringimento volumetrico (fenomeno dello *shrinkage*), poiché la distanza tra le catene polimeriche, a seguito della formazione dei legami covalenti, si riduce.

2.2.3 Fotoreticolazione del PEO

Come accennato prima, la fotoreticolazione può avvenire anche sul PEO, tramite l’estrazione di idrogeno, grazie alla presenza del benzofenone, un chetone aromatico, come fotoiniziatore. Difatti, mediante irradiazione UV, in presenza del fotoiniziatore, gli idrogeni vengono estratti dalle catene

carboniose del PEO e sono dunque generati radicali, che combinandosi tra loro inducono la reticolazione delle catene di PEO [24] (Figura 2.11), attraverso la formazione di legami covalenti.

Nella figura 2.11 il benzofenone è accompagnato da un asterisco (*), che indica il suo stato eccitato, a seguito dell'assorbimento della radiazione luminosa.

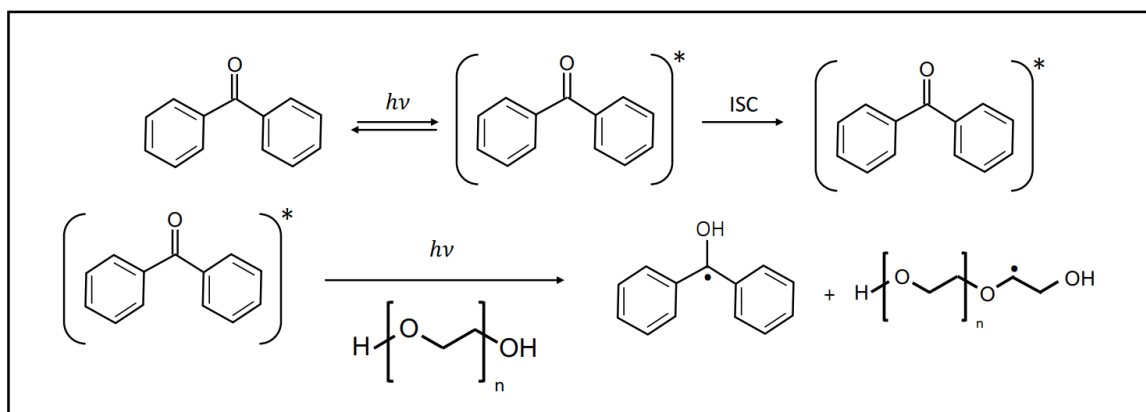


Figura 2.11: Schema della generazione di radicali mediante irradiazione UV del PEO in presenza del fotoiniziatore (benzofenone).

Durante l'irradiazione UV, il PEO può subire una scissione della catena, dunque i legami C-O si rompono e si generano radicali liberi, con conseguente degradazione del PEO. Il prevalere della reticolazione sulla scissione dipende da molti fattori quali il tempo di irradiazione, la concentrazione di fotoiniziatore, la presenza di ossigeno e la presenza o meno dell'agente di reticolazione [18][25] [26]. L'aggiunta di un appropriato fotoiniziatore e di un agente di reticolazione migliora l'efficacia del processo di fotoreticolazione, in quanto il *crosslinker* riduce la scissione dei legami C-O e dunque la degradazione del polimero [24][28]. Un agente di reticolazione ampiamente utilizzato nella reticolazione del PEO è il trimetilolpropano triacrilato (TMPTA), un monomero acrilico trifunzionale. Esso viene ampiamente utilizzato in campo biomedico e farmaceutico, perché non tossico e con minima risposta immunitaria [27][28].

Durante la fotoreticolazione è bene prevenire i fenomeni di inibizione della polimerizzazione a causa della presenza di ossigeno, aumentando la concentrazione dell'iniziatore, oppure facendo avvenire la reazione in atmosfera inerte, mediante azoto ad esempio [29].

2.3 Particelle di argento

Le particelle d'argento sono comunemente impiegate per la realizzazione di diversi materiali compositi, grazie alle loro proprietà antibatteriche. In letteratura vi sono anche esempi di membrane fibrose polimeriche contenenti (nano)particelle d'argento, ottenute tramite electrospinning.

2.3.1 Proprietà e campi d'applicazione dell'argento

L'argento è noto per le sue proprietà antibatteriche. Tuttavia, come si può vedere in Figura 2.12, l'argento può essere potenzialmente tossico, man mano che aumenta la sua concentrazione; dunque, è bene che la quantità di tale metallo stia in un certo range, affinché risulti antibatterico. Al contrario, al di fuori di questo range, l'argento diventa citotossico, ovvero attacca tutte le cellule e non solo i batteri.

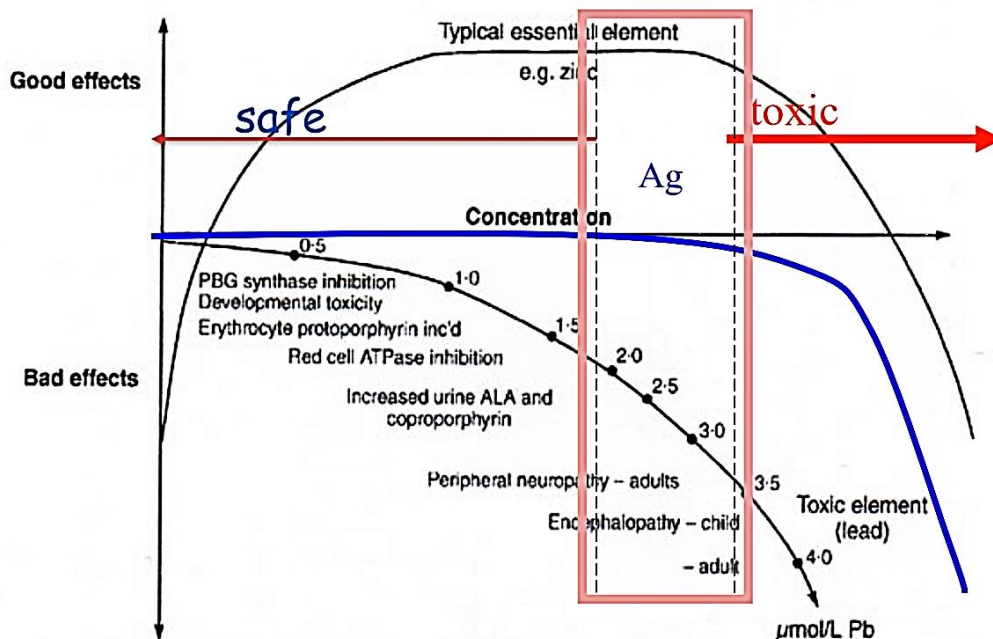


Figura 2.12: grafico che mostra come varia il comportamento dell'argento in funzione della sua concentrazione.

In aggiunta, l'argento presenta un particolare effetto che prende il nome di 'oligodinamico': una cellula batterica contaminata da argento viene attaccata su più fronti. Esso inibisce la sintesi del DNA, dunque la divisione cellulare, interagisce con gli enzimi e le proteine importanti per la respirazione batterica e il trasporto di sostanze, attraverso la membrana, alterandone le funzionalità. In aggiunta, è in grado di distruggere la membrana di alcuni batteri. Ebbene, non viene svolta unicamente una funzione battericida, ma anche batteriostatica, in quanto l'argento impedisce al batterio di replicarsi, senza ucciderlo direttamente. A tal proposito, è stato osservato che l'azione batteriostatica aumenta al crescere della dimensione del batterio. La Figura 2.13 sintetizza sia come varia l'azione battericida al variare della concentrazione di argento, sia come cambia l'azione batteriostatica al mutare della dimensione cellulare.

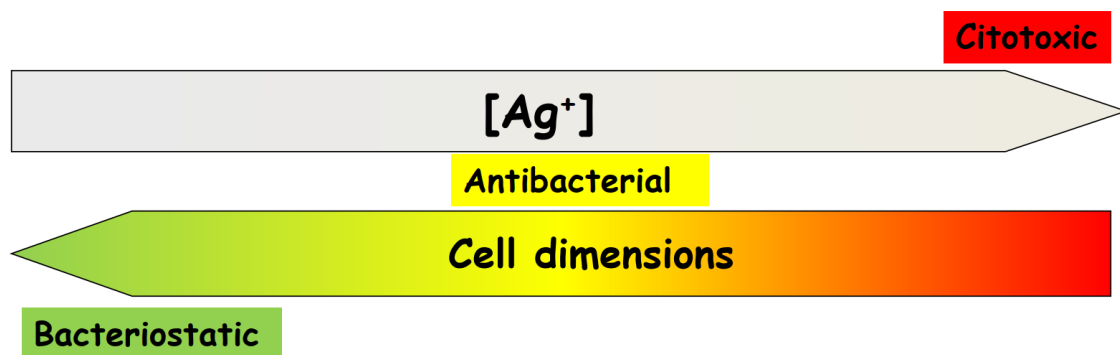


Figura 2.13: Azioni biologiche dell'argento in funzione della $[Ag^+]$ e della dimensione del batterio.

Come se non bastasse, a differenza di altri materiali antibatterici (gli antibiotici ad esempio), l'argento è più ad ampio spettro: agisce su una grande quantità di batteri. Ad esempio, batteri Gram-negativi e Gram-positivi, come l'*Escherichia coli* (*E. coli*), il *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), entrambi Gram-positivi e lo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), Gram-negativo, non riescono a sviluppare una resistenza contro di esso. Tuttavia, sebbene le eccellenti proprietà antibatteriche del metallo, è stato visto che l'argento può anche causare irritazione e legarsi al DNA, prevenendo la replicazione, entrambi fattori che possono ostacolare il processo di guarigione di una ferita [30].

Viste le interessanti proprietà di questo metallo, le nanoparticelle di argento vengono impiegate in molte applicazioni biomediche, come mostrato in Tabella 2.2. In particolare, le membrane composite con argento vengono ad esempio ampiamente impiegate nella guarigione delle ferite cutanee, poiché diminuiscono l'infiammazione superficiale e promuovono la formazione del calcio, stimolando l'epitelizzazione [2][30].

APPLICAZIONI BIOMEDICHE DELLE NANOPARTICELLE DI ARGENTO	REFERENZE
Trattamento della colite ulcerosa e acne	[31][32][33]
Trattamento della dermatite	[34]
Inibizione della replicazione della HIV-1	[35]
Rilevazione delle strutture virali (SERS <i>nanorods</i> d'argento)	[36]
Marcatura delle cellule mediante nanocomposito d'argento/dendrimero	[37]
Imaging molecolare delle cellule tumorali	[38]
Rivestimento del tessuto utilizzato in ambito ospedaliero (camici, maschere chirurgiche e garze ad esempio)	[39]
Rivestimento del catetere per il drenaggio del liquido cerebrospinale	[40] [41] [42]
Rivestimento della <i>mesh</i> chirurgica per la ricostruzione pelvica	[43]
Rivestimento della maschera facciale	[44]
Rivestimento del tubo endotracheale per il supporto ventilatorio meccanico	[45]
Rivestimento della <i>driveline</i> del dispositivo di assistenza ventricolare (<i>Ventricular Assist Device</i> , VAD)	[46]
Rivestimento del catetere venoso centrale	[41][47] [48]
Rivestimento del catetere per il rilascio di farmaco	[41][49]
Rivestimento del chiodo intramidollare per le fratture delle ossa lunghe	[50][51]
Rivestimento dell'impianto ortopedico (protesi, perno del fissatore esterno, placca)	[52]
Rivestimento del dispositivo medico cardiovascolare (valvola cardiaca e stent)	[41][53]
Rivestimento impiegato nella medicazione delle ferite (parafarmaco)	[41][54][55]
Impiego nella produzione di prodotti antibatterici (gel per mani, disinfettanti, vernici antimicrobiche), dato l'effetto antimicrobico dell'argento contro organismi infettivi	[41][56] [57][58]
Impiego in calze ortopediche	[59]
Additivo per cemento osseo	[41][51] [60]
Impiego in idrogel super assorbente per materiali per l'incontinenza/ idrogel per la medicazione delle ferite	[61] [62]

APPLICAZIONI BIOMEDICHE DELLE NANOPARTICELLE DI ARGENTO	REFERENZE
Additivo in brevetti per materiali dentali polimerizzabili	[63]
Riempitivo in resina nano composita SiO ₂ caricato di argento (composito di resina dentale)	[64]

Tabella 2.2: Applicazioni biomediche delle nanoparticelle d'argento.

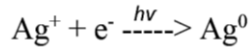
2.3.2 Generazione delle nanoparticelle di argento

Per produrre le (nano)particelle di argento vi sono molteplici metodi: metodi fisici, chimici e fotochimici. Uno dei metodi più utilizzati è la riduzione chimica che utilizza come precursore l'AgNO₃, diversi agenti riducenti, ad esempio DMF, paraffina e diversi stabilizzanti come il citrato di sodio e la surfattina. Le particelle ottenute tramite questa tecnica hanno dimensioni che vanno da 1,6 a 650 nm [65]. Un altro metodo molto importante è la riduzione fotochimica e in particolare la fotoriduzione: attraverso l'AgNO₃ come precursore e in presenza di luce UV si riescono ad ottenere particelle con dimensione compresa tra 4 e 10 nm. La riduzione fotochimica può avvenire non solo in presenza di luce UV, ma anche in presenza di raggi X ed Ag₂SO₄ come precursore, in questo caso si parla di radiolisi a raggi X e le particelle ottenute hanno dimensioni maggiori (circa 28 nm). Esistono inoltre altri metodi, come la sintesi fisica e il metodo elettrochimico da cui si ottengono particelle che vanno dai 10 ai 27 nm e 11 nm rispettivamente[65][66].

2.3.2.1 Generazione di particelle di argento tramite foto-riduzione

Come riportato precedentemente, in questo studio la generazione delle nanoparticelle è stata possibile esponendo il nitrato d'argento e il fotoiniziatore alla luce UV. Infatti, è noto che quando un sistema è sottoposto ad irradiazione UV, se sono presenti delle specie che si comportano da elettrondonatori (agenti riducenti), in questo caso il fotoiniziatore, gli ioni argento (Ag⁺) acquistano un elettrone,

formando argento metallico (Ag^0). L'acquisizione di uno o più elettroni è detto in chimica riduzione. In particolare, se la riduzione viene indotta dalla luce UV, si parla di foto-riduzione. [67] La reazione di foto-riduzione sarà dunque:



Dove Ag^+ rappresenta la forma ossidata, ovvero l'elemento sprovvisto di un elettrone, mentre Ag^0 è la forma ridotta, infine $h\nu$ sta ad indicare la luce UV [68].

Successivamente, dagli atomi metallici avverrà la nucleazione e crescita delle particelle di argento.

Negli anni passati, in diversi lavori di letteratura, sono state sintetizzate nanoparticelle d'argento, mediante foto-riduzione con luce UV. Questo metodo risulta essere semplice ed efficace, motivo per cui molti studiosi hanno sfruttato questa metodologia.

Ad esempio, nel 2007 la foto-riduzione con luce UV è stata messa in pratica da Huang e Yang in sospensioni inorganiche stratificate di laponite, che fungevano da agente stabilizzante, per prevenire l'aggregazione delle nanoparticelle [69].

In uno studio condotto al Politecnico di Torino nel 2016 [67] sono stati realizzati, con una stampante 3D DLP (digital light processing), degli oggetti elettromeccanici di dimensione micrometrica con una resina acrilica e nanoparticelle di argento. Monomeri, sali metallici e fotoiniziatori sono stati irradiati con luce UV; le specie fotoiniziatrici generate hanno indotto sia la fotoriduzione dei sali metallici a nanoparticelle d'argento per trasferimento elettronico, sia la polimerizzazione dei monomeri (Figura 2.14).

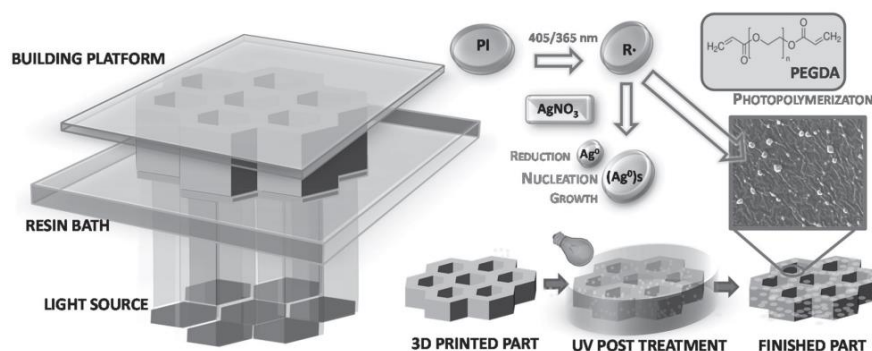


Figura 2.14: Funzionamento di una stampante DLP e schematizzazione del trattamento UV [67].

Il processo di fotoriduzione UV diretta di AgNO_3 può avvenire anche in presenza di citrato di sodio (NaCit) a temperatura ambiente. Sato-Berrù [70] ha mostrato che, in questo caso, si forma un colloide aventi proprietà ottiche dipendenti dalle dimensioni e dalla forma delle particelle.

Ghosh [71] invece, attraverso fotoattivazione UV, ha realizzato delle nano particelle di argento stabili in una soluzione acquosa di Triton X-100, le cui molecole agiscono sia come agente riducente che come stabilizzante delle nanoparticelle.

È stato inoltre visto che l'utilizzo di una soluzione tensioattiva permette di controllare il processo di crescita delle nanoparticelle e di ottimizzarne la dimensione. Huang e i suoi collaboratori [72] sono riusciti a sintetizzare, mediante irradiazione UV, nanoparticelle d'argento in una soluzione acquosa alcalina di chitosano carbossimetilato (CMCTS). Quest'ultimo fungeva sia da agente riducente per gli ioni argento (Ag^+) che da agente stabilizzante per le nanoparticelle, le cui dimensioni variavano tra 2 e 8 nm.

2.3.3 Membrane fibrose composite contenenti particelle d'argento ottenute tramite electrospinning

In questa sezione sono stati riportati alcuni esempi di letteratura, in cui sono state realizzate, tramite electrospinning, delle membrane composite funzionalizzate con nanoparticelle d'argento. La finalità è indagare come la presenza delle nanoparticelle influenzi le proprietà meccaniche ed antibatteriche delle membrane, così da poter effettuare un confronto con le membrane realizzate in questa tesi.

Nel 2010 sono state prodotte delle nanofibre di N-carbossietilchitosano (CECh), PEO e nanoparticelle di argento, al 5 e 10 wt% rispetto al peso totale di polimero [73]. Dalle analisi antibatteriche è emerso che le membrane al 5 wt% di argento presentavano attività batteriostatica, mentre quelle al 10 wt% di argento attività battericida, verso i batteri *S. aureus* (Figura 2.15).

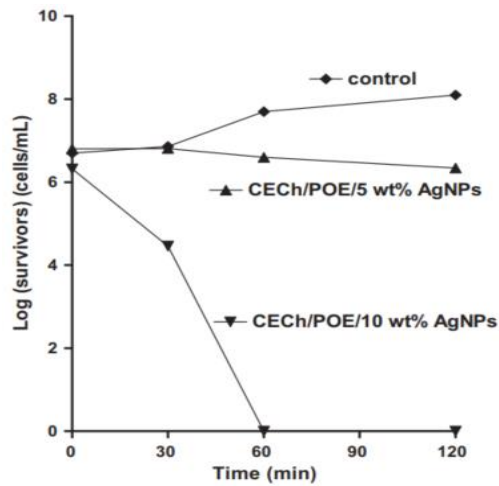


Figura 2.15: Grafico logaritmico del numero di cellule vitali dei batteri *S. aureus* rispetto al tempo di esposizione, su membrane CECh/PEO contenenti il 5% e il 10% in peso di nanoparticelle di Ag [73].

Schiffman e collaboratori nel 2011 [74] hanno prodotto delle membrane di polisolfone (PSf), modificate in superficie, mediante un trattamento al plasma, per far avvenire il legame con le nanoparticelle di argento, rivestite di polietilenimina. Gli effetti antimicrobici di queste membrane sono stati rilevati sia sull'*Escherichia coli*, sia contro i batteri Gram positivi (Figura 2.16) [74].

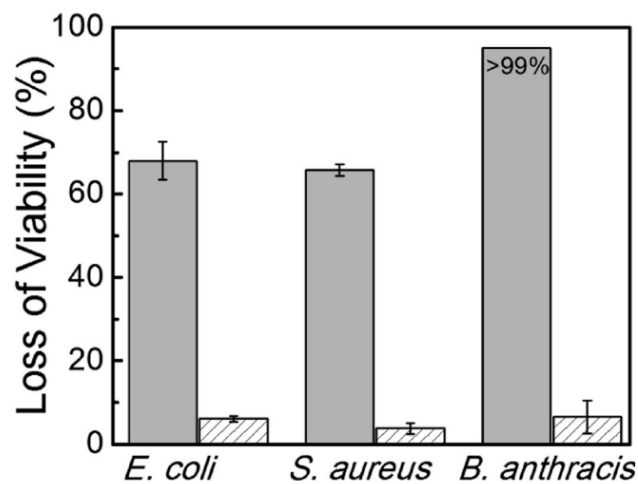


Figura 2.16: Risultato del saggio di tossicità in fluorescenza per vari batteri posti a contatto con membrane di PSf (istogrammi tratteggiati) e membrane sottoposte ad un trattamento al plasma, della durata di 60 s (istogrammi pieni)[74].

Successivamente, nel 2014 sono state realizzate nanofibre di chitosano e PEO, inglobanti nanoparticelle d'argento [75]. È emerso che le membrane nanofibrose con il 2 wt% di AgNO_3 , rispetto al polimero, sono meccanicamente migliori rispetto a quelle senza nanoparticelle e quelle al 4wt % di AgNO_3 , dal momento che presentano la maggiore resistenza a trazione media ed allungamento a rottura medio (Tabella 2.3).

Campione	AgNO_3 (%)	Resistenza a trazione media (MPa)	Allungamento a rottura medio (%)
CS/PEO75/25	0	6,40±0,47	16,46±1,09
CS/PEO75/25	2	7,54±0,74	27,47±2,81
CS/PEO75/25	4	5,50±0,19	22,49±0,84

Tabella 2.3: Proprietà meccaniche di membrane nanofibrose chitosano/PEO con quantità variabili di AgNO_3 [75].

Invece, dal test della zona di inibizione è emerso un incremento dell'attività antibatterica contro *E. coli* ed *S. aureus* all'aumentare della quantità di argento, molto più evidente per il batterio Gram-negativo (Figura 2.17) [75].

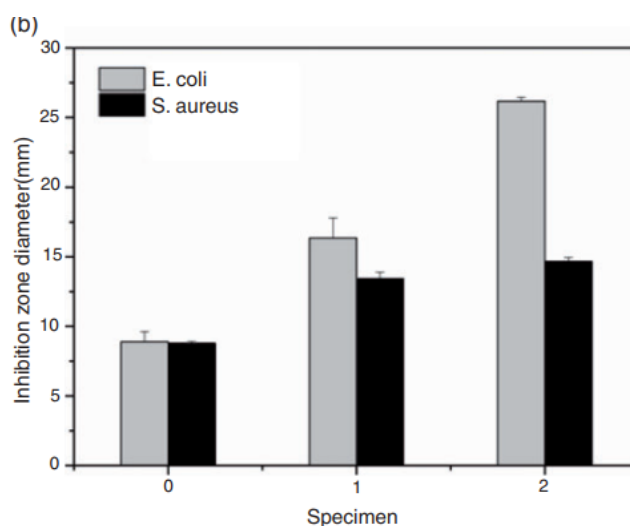


Figura 2.17: Calcolo dei diametri delle zone di inibizione: (0) 0% AgNO_3 ; (1) 4% AgNO_3 ; (2) 8% AgNO_3 [75].

Un anno più tardi sono state preparate delle membrane nanofibrose di chitosano e ossido di polietilene (CS-PEO), contenenti lo 0,25% e lo 0,5% (rapporto in peso, w/w) di nanoparticelle di argento, aventi come agente riducente un estratto di pianta medicinale, denominata *Falcaria vulgaris* [76]. Dai test batterici è emerso che le membrane con le nanoparticelle, in presenza dell'estratto della pianta, presentavano attività battericida contro i batteri *E. coli* e *S. aureus* (Tabella 2.4). Tuttavia, l'efficacia battericida non è data solo dalle nanoparticelle, ma anche dalla presenza dell'estratto della pianta, come osservano gli autori [76].

<i>Campione</i>	<i>Potenza antibatterica contro lo Staphylococcus aureus (ATCC 25923)</i>	<i>Potenza antibatterica contro l'Escherichia coli (ATCC 25922)</i>
<i>CS-PEO</i>	79,56%	76,11%
<i>CS-PEO-F.vulgaris</i>	85,41%	81,38%
<i>CS-PEO-F.vulgaris-0,25% Ag NPs</i>	Nessuna crescita (>99%)	Nessuna crescita (>99%)
<i>CS-PEO-F.vulgaris-0,50% Ag NPs</i>	Nessuna crescita (>99%)	Nessuna crescita (>99%)

Tabella 2.4: sintesi delle attività antibatteriche [76].

Dai test meccanici, invece, è emersa una diminuzione dell'allungamento a rottura e un aumento della resistenza a trazione delle fibre e del modulo di Young con l'aggiunta delle nanoparticelle [76].

Quattro anni più tardi sono state realizzate delle membrane composte da nanofibre composite di PEO, PVA (alcool polivinilico) e cheratina, inglobanti diverse quantità di nanoparticelle d'argento [77]. Dall'analisi meccanica è emerso un miglioramento delle proprietà meccaniche per quantità inferiori al 1,2%, percentuale in peso di nanoparticelle che ha garantito il più alto valore di resistenza a trazione ed allungamento a rottura (Tabella 2.5) [77].

Campioni	Resistenza a trazione (MPa)	Allungamento a rottura (%)
0%-AgNPs	2,62±0,51	42,75±0,25
0,6%-AgNPs	4,30±0,64	31,25±5,30
1,2%-AgNPs	5,52±0,71	51,50±9,19
1,8%-AgNPs	4,83±1,23	30,50±5,57
2,4%-AgNPs	2,60±0,51	20,93±10,42
3,0%-AgNPs	2,38±0,57	12,5±3,27

Tabella 2.5: Resistenza a trazione e allungamento a rottura delle nanofibre composite con FK/PVA/PEO, con differenti quantità di nanoparticelle [77].

Il test di diffusione dell'Agar (Tabella 2.6) ha invece mostrato, incrementando il contenuto di nanoparticelle, una maggior efficacia antibatterica contro l'*E. coli* rispetto al *S. aureus* [77].

Campioni	Diametro della zona di inibizione (mm) per <i>E. coli</i>	Diametro della zona di inibizione (mm) per <i>S. aureus</i>
0%-AgNPs	0	0
0,6%-AgNPs	5,02	2,12
1,2%-AgNPs	8,24	2,08
1,8%-AgNPs	8,40	1,70
2,4%-AgNPs	8,17	1,56
3,0%-AgNPs	8,60	2,96

Tabella 2.6: Diametro della zona di inibizione delle nanofibre composite per *E. coli* e *S. aureus* [77].

Infine, in quest'ultimo anno sono state prodotte mediante una tecnica avanzata di electrospinning delle nanofibre ibride di PCL e PEO, contenenti nanoparticelle d'argento, rivestite da *Centella asiatica* (CA) a differenti concentrazioni (1%, 5% e 10% (v:v)). Ad eccezione del modulo elastico che per le nanofibre

di PEO-PCL risulta superiore a quello delle fibre all'1 e 5% di nanoparticelle, si è osservato un incremento delle proprietà meccaniche con l'aggiunta delle nanoparticelle (Tabella 2.7) [78].

<i>Nanofibra</i>	<i>Modulo Elastico (MPa)</i>	<i>Resistenza a trazione (MPa)</i>	<i>Allungamento a rottura (%)</i>
<i>PEO/PCL</i>	<i>19,6</i>	<i>3,14</i>	<i>276</i>
<i>1% CA-AgNPs in PEO/PCL</i>	<i>9,6</i>	<i>3,06</i>	<i>174</i>
<i>5% CA-AgNPs in PEO/PCL</i>	<i>14,0</i>	<i>5,40</i>	<i>157</i>
<i>10% CA-AgNPs in PEO/PCL</i>	<i>23,0</i>	<i>7,69</i>	<i>73</i>

Tabella 2.7: Proprietà meccaniche delle nanofibre PEO/PCL [78].

I test antibatterici, compiuti sui batteri *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, hanno mostrato invece che al crescere della concentrazione di argento, aumentava il diametro della zona di inibizione [78].

Dal confronto degli studi analizzati emerge che nel caso di nanofibre ibride di PCL e PEO, l'aggiunta di nanoparticelle ai polimeri comporta una riduzione della deformazione a rottura [78]; tuttavia nel caso delle nanofibre di chitosano e PEO, al contrario, l'allungamento a rottura viene aumentato dall'aggiunta di nanoparticelle [75] [76].

Per quanto riguarda la resistenza a trazione e il modulo elastico, si è visto che nel caso delle nanofibre CS-PEO-*F.vulgaris* e PEO-PCL, queste grandezze aumentano, all'aumentare del contenuto di nanoparticelle [76][78]; tuttavia, è emerso anche che nel caso delle nanofibre composite di PEO, PVA e cheratina e per quelle CS-PEO, la resistenza a trazione è massimizzata per contenuti intermedi di nanoparticelle [75][77]. Come spiegano gli autori, il miglioramento delle proprietà meccaniche è probabilmente correlato all'eccellente cristallinità delle nanoparticelle, raggiunta dall'appropriato contenuto del precursore delle particelle, che non necessariamente è il più alto [75]. Infatti, per contenuti superiori, si ha la perdita di integrità delle nanofibre, causata da accumuli di aggregati di nanoparticelle sovrabbondanti [77]. E' risultato infatti che le membrane senza particelle di argento abbiano proprietà meccaniche superiori a quelle delle nanofibre inglobanti nanoparticelle [75][78].

Da questo confronto, dunque, non emerge un chiaro ruolo delle nanoparticelle di argento nell'influenzare le proprietà meccaniche.

Per quanto riguarda invece l'efficacia antibatterica, tutti gli studi hanno confermato l'efficacia antibatterica delle membrane composite con argento, contro il Gram-positivo *S. aureus* e contro il Gram negativo *E. coli*.

In particolare, nello studio condotto su membrane CS-PEO-F.vulgaris inglobanti nanoparticelle [76] è stata rilevata una maggior efficacia contro il batterio *S. aureus*, affermando che sebbene i batteri *Gram-positivi* abbiano uno strato peptidoglicano più spesso nella loro parete cellulare, essi sono più suscettibili alle sostanze chimiche rispetto ai Gram-negativi [79]. Tuttavia, per le nanofibre composite di PEO, PVA e cheratina inglobanti nanoparticelle [77] e per quelle di chitosano-PEO con incorporate le nanoparticelle [75] è stata osservata una maggior efficacia antibatterica nei confronti del Gram-negativo *E. coli*. Questa minore efficacia contro i Gram positivi è da ricercare nella loro parete cellulare più densa e spessa, che rende conseguentemente più difficile la loro neutralizzazione [75].

In generale, i test antibatterici confermano un miglioramento dell'attività antibatterica con l'aumentare del contenuto di nanoparticelle [73][75][77][78]; anche se questo non è sempre vero, come nel caso dei test eseguiti sul batterio *S. aureus* per le nanofibre composite di PEO, PVA, cheratina inglobanti nanoparticelle d'argento [77].

Capitolo 3

Materiali e metodi

Il lavoro sperimentale è stato effettuato presso il laboratorio Polymat del dipartimento DISAT del Politecnico di Torino.

3.1 Materiali

I materiali utilizzati sono:

- l'ossido di polietilene (PEO, peso molecolare $M_w = 1000000$ g/mol), un polietere sintetico semicristallino e termoplastico con formula generale $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$;
- il benzofenone come fotoiniziatore, un chetone aromatico con formula $C_6H_5-CO-C_6H_5$;
- il trimetilolpropano triacrilato (TMPTA, peso molecolare $M_w = 296$ g/mol, viscosità 70-12 cP), monomero acrilico trifunzionale con formula $C_{15}H_{20}O_6$, come agente di reticolazione;
- il nitrato di argento (peso molecolare $M_w = 169,87$ g/mol).

Queste sostanze sono state acquistate da Sigma-Aldrich, eccetto il nitrato d'argento, il quale è stato acquistato dalla PanReac Applichem. Le strutture molecolari dei materiali sono mostrate in Figura 3.1.

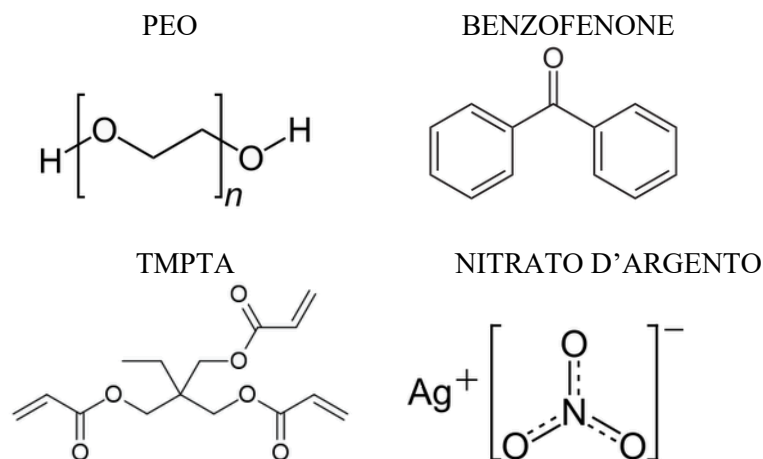


Figura 3.1: Strutture molecolari dei composti utilizzati.

Come solvente, invece, è stata utilizzata acqua distillata, il che rende il processo di produzione delle membrane fibrose *eco-friendly*.

3.2 Preparazione delle soluzioni

Inizialmente, sono state preparate delle soluzioni acquose di nitrato di argento, con tre diverse concentrazioni (1wt%, 5 wt% e 10wt % rispetto al peso di PEO che verrà aggiunto successivamente). Dopo 30 minuti di agitazione, alla soluzione è stato addizionato il PEO (soluzione acquosa al 5 wt%) e la soluzione è stata lasciata omogenizzare per tutta la notte. Avvenuta l'omogenizzazione, alla soluzione acquosa di AgNO₃ e PEO è stato aggiunto il TMPTA al 33,33 wt% rispetto al peso di PEO. Il preparato è stato dunque posto sopra agitatore magnetico per 30 minuti. È stato poi aggiunto alla soluzione il benzofenone (2 wt%, rispetto al peso del PEO), il quale è stato precedentemente solubilizzato in 4 gocce di etanolo per 5 minuti mediante agitatore magnetico. Il preparato finale è stato infine lasciato omogenizzare per 10 minuti.

Come riferimento, sono state preparate anche soluzioni a cui non è stato aggiunto il nitrato d'argento, rispettando le stesse quantità e la stessa procedura di preparazione appena descritta.

La Tabella 3.1 riporta la composizione dei materiali utilizzati, mentre la figura 3.2 schematizza gli step seguiti per la preparazione della soluzione finale.

MATERIALE	PERCENTUALE IN PESO
<i>PEO</i>	<i>5 wt% in acqua</i>
<i>AgNO₃</i>	<i>(1,5, 10) wt% rispetto al peso di PEO</i>
<i>TMPTA</i>	<i>33,33 wt% rispetto al peso di PEO</i>
<i>BENZOFENONE</i>	<i>2 wt% rispetto al peso di PEO</i>

Tabella 3.1: composizione dei campioni investigati.

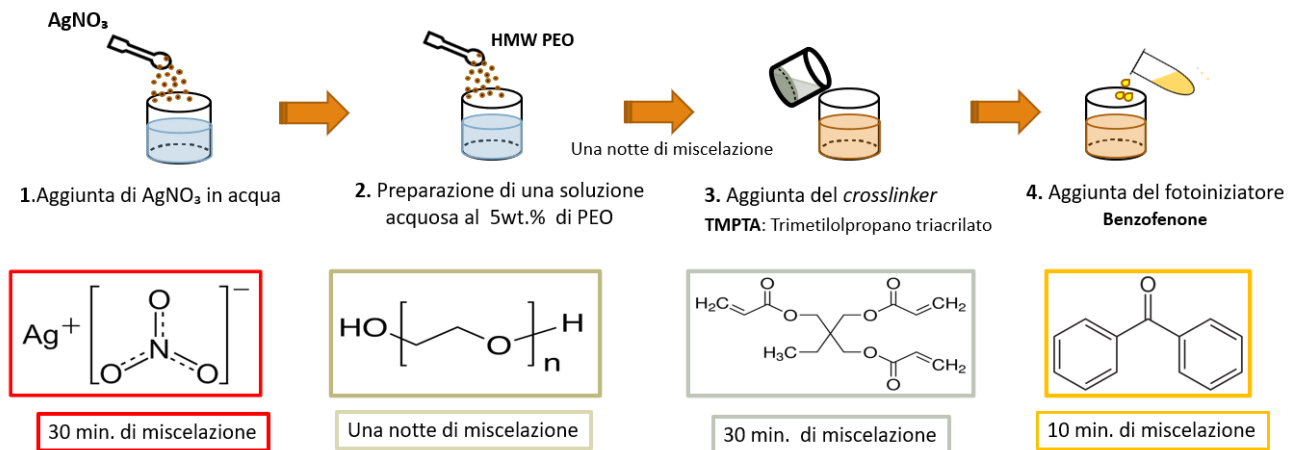


Figura 3.2: schematizzazione degli step seguiti per la preparazione delle soluzioni.

3.3 Procedura di Electrospinning

Le soluzioni allo 0%, 1%, 5% e 10% di nitrato di argento descritte nel paragrafo 3.2 sono state poste in una siringa, per poi essere sottoposte ad electrospinning. Il processo di electrospinning è stato effettuato mediante un sistema E-fiber, apparato SKE, in configurazione orizzontale (Figura 3.3). Il sistema è dotato di alimentazione ad alta tensione, una pompa a siringa programmabile ed un collettore piano stazionario. Come mostrato dalla Figura 3.3, il collettore è stato rivestito da uno strato di alluminio, per permettere la facile rimozione della membrana.

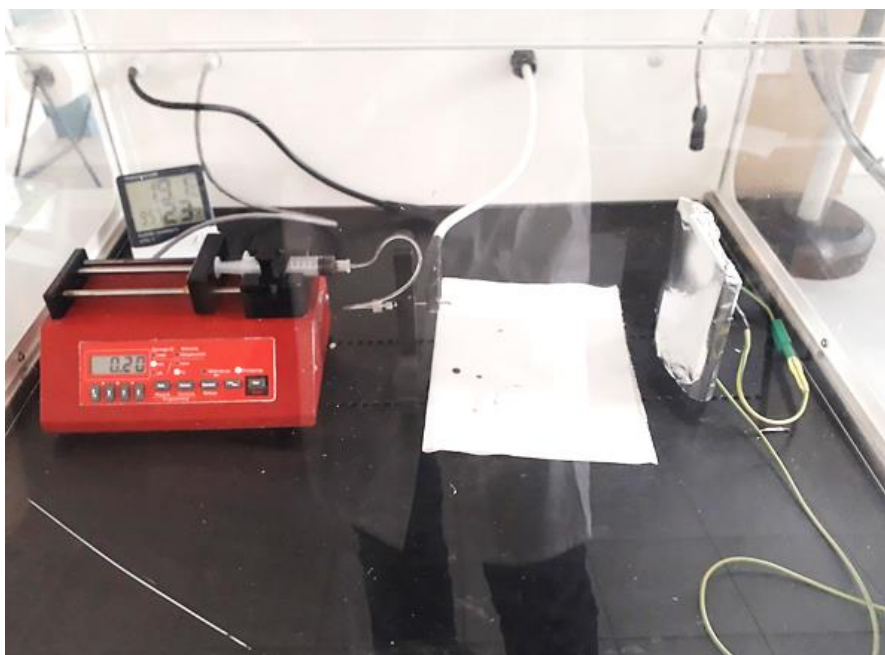


Figura 3.3: Sistema di electrospinning in configurazione orizzontale.

Successivamente, sono state valutate la tensione, la portata e la distanza di lavoro (distanza tra la punta del collettore e l'ago) ottimali per condurre l'electrospinning, in modo da garantire la continuità del getto. La tensione è stata fatta variare da 10 kV fino a 19 kV, la portata da 0,10 ml/h fino a 0,25 ml/h e infine la distanza di lavoro è stata posta a 15 cm e a 20 cm. Dopo questa prima fase di sperimentazione, condotta sulle soluzioni al 5% di nitrato d'argento, è stato deciso di applicare una tensione di 17,5 kV, una portata di 0,10 ml/h ed una distanza di lavoro di 20 cm. Una volta azionato il sistema di electrospinning, sono stati rilevati i valori di temperatura e umidità relativa; la temperatura è variata da 20 °C fino a 26 °C, mentre l'umidità percentuale è variata dal 28% al 56%. L'electrospinning è stato condotto per un tempo variabile compreso tra 30 min e 4 ore, in base allo spessore desiderato della membrana. Con il processo di electrospinning ottimizzato si sono ottenute delle membrane prive di difetti (Figura 3.4).

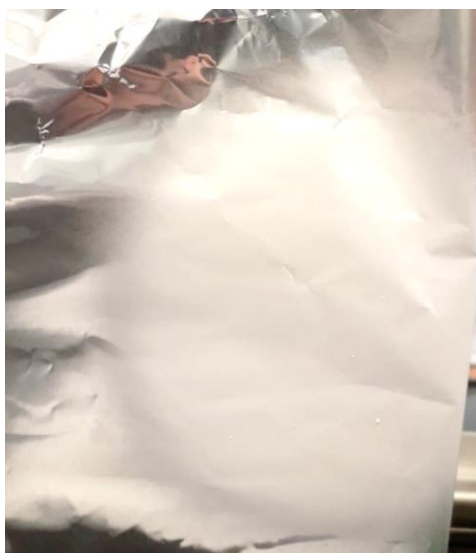


Figura 3.4: esempio di membrana priva di difetti.

In questo studio sono state quindi investigate quattro tipologie di membrane fibrose: con le sigle PEO-TMPTA 1Ag, 5Ag e 10Ag si stanno ad indicare le membrane filate a partire da soluzioni con contenuto percentuale in peso di AgNO_3 rispettivamente di 1, 5 e 10 %, rispetto al peso del PEO; invece con la sigla PEO-TMPTA si stanno ad indicare la membrane ottenute a partire da una soluzione a cui non era stato aggiunto AgNO_3 .

Conducendo l'electrospinning per 4 ore si sono ottenute membrane con uno spessore di circa 50-100 μm ; i valori di spessore ottenuti, espressi come media \pm deviazione standard, sono mostrati in tabella 3.2. Per ogni tipologia di membrana, sono stati mediati gli spessori di 3 provini. In particolare, per ogni provino lo spessore è stato misurato in 2 o 3 punti diversi e poi ne è stata fatta la media.

	<i>~ 240 min.</i>
<i>Sample PEO-TMPTA</i>	$(105 \pm 15) \mu\text{m}$
<i>Sample PEO-TMPTA-1Ag</i>	$(96 \pm 17) \mu\text{m}$
<i>Sample PEO-TMPTA-5Ag</i>	$(45 \pm 7) \mu\text{m}$
<i>Sample PEO-TMPTA-10Ag</i>	$(49 \pm 13) \mu\text{m}$

Tabella 3.2: Tabella rappresentante gli spessori medi ottenuti per circa 4 ore di electrospinning.

Come si può osservare dalla tabella 3.2, i valori di spessore dei campioni senza argento e di quelli PEO-TMPTA-1Ag risultano essere superiori agli spessori delle membrane PEO-TMPTA-5Ag e PEO-TMPTA-10Ag. Infatti, durante l'elettrospinning, in questi ultimi 2 casi, è stato osservato, con maggior frequenza la formazione della goccia sull'ago della siringa e la conseguente discontinuità del filo.

3.4 Processo di fotoreticolazione

Dopo aver elettrofilato la membrana, si è proceduto alla fotoreticolazione UV. La fotoreticolazione UV è stata eseguita mediante una lampada a mercurio a media pressione (lampada Dymax ECE UV-curing flood) (Figura 3.5), che ha fornito un'intensità UV di 60 o 30 mW/cm² sulla superficie del campione. Il valore di intensità è stato misurato attraverso un radiometro UV Power Puck II (Figura 3.6). Simultaneamente all'irradiazione UV, è stato immesso gas azoto all'interno della camera, poiché la reticolazione radicalica degli acrilati viene inibita dalla presenza dell'ossigeno, e per evitare la fotoossidazione delle catene di PEO.



Figura 3.5: Lampada Dymax ECE UV-curing flood.



Figura 3.6: UV Power Puck II.

3.5 Caratterizzazione

Una volta prodotte le membrane, queste sono state caratterizzate. Le analisi effettuate sono state l'analisi FESEM, la spettroscopia UV-Vis e EDX. I campioni di membrana sono stati inoltre testati meccanicamente e ne sono state valutate le proprietà antibatteriche.

3.5.1. Analisi FESEM e spettroscopia EDX

La morfologia delle fibre è stata analizzata attraverso la microscopia FESEM. Sono stati analizzati al FESEM campioni ottenuti con diverse dosi, come in Tabella 3.3; dove per dose si intende la quantità di energia assorbita dal campione per unità di superficie. Questa grandezza è stata dunque misurata in J/cm^2 , moltiplicando la potenza dell'irraggiamento per il tempo di esposizione all'irradiazione UV.

POTENZA IRRAGGIAMENTO (mW/cm²)	TEMPO (min)	DOSE (J/cm²)
60	5	18
60	10	36
60	15	54
30	10 (a step di 5 minuti)	18
30	20 (a step di 5 minuti)	36

Tabella 3.3: Potenza di irraggiamento, tempo e dose utilizzati per l'analisi FESEM.

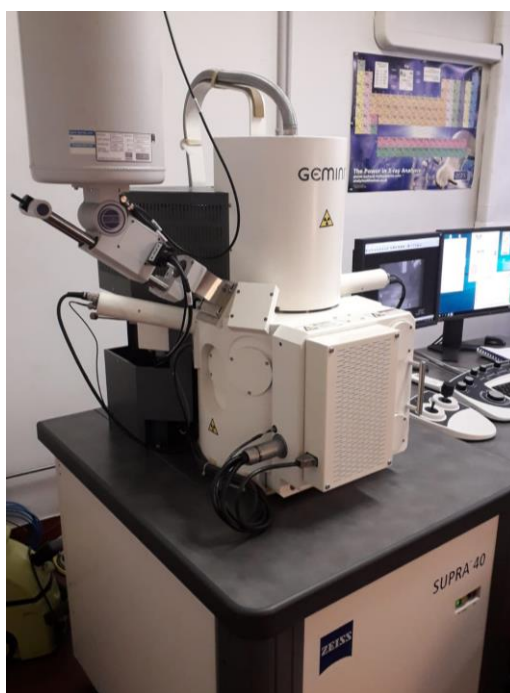


Figura 3.7: Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM).

Precedentemente alla scansione, alcuni campioni sono stati metallizzati, ovvero sono stati rivestiti superficialmente di un sottile strato di platino. Per l'effettuazione dell'analisi, è stato utilizzato il microscopio ZEISS SUPRA™ 40 Field FESEM (Figura 3.7). Acquisite le immagini, queste sono state analizzate attraverso il software ImageJ con lo scopo di ricavare la distribuzione dimensionale dei diametri delle fibre.

Alcuni campioni sono anche stati analizzati attraverso la spettroscopia EDX, per riscontrare la presenza delle nanoparticelle di argento. Quest'ultima analisi, infatti, consente l'identificazione degli elementi presenti sul campione e la quantificazione della loro relativa concentrazione.

3.5.2 Analisi UV-Vis

È stata effettuata la spettroscopia UV-Vis, per osservare l'incremento del contenuto di argento al crescere della dose. Per effettuare l'analisi UV-Vis, la soluzione è stata elettrofilata per 30 minuti su un vetrino, il quale è stato adagiato sull'alluminio, mediante nastro adesivo. Sono state utilizzate due tipologie di vetrini, un vetrino classico e un vetrino di quarzo, molto più piccolo del precedente, per andare ad osservare se l'utilizzo di un diverso supporto potesse influenzare l'andamento dello spettro.

Una volta terminato l'electrospinning, l'analisi spettroscopica dei campioni, ottenuti con diverse dosi (Tabella 3.4), è avvenuta tramite lo spettrofotometro 6850 UV/Vis. Spectrophotometer JENWAY, mostrato in figura 3.8, mentre per la visualizzazione degli spettri è stato utilizzato il software Prism.



Figura 3.8: 6850 UV/Vis. Spectrophotometer JENWAY.

POTENZA IRRAGGIAMENTO (mW/cm²)	TEMPO (min)	DOSE (J/cm²)
60	2	7,2
60	5	18
60	10	36
60	15	54

Tabella 3.4: Potenza di irraggiamento, tempo e dose utilizzati per la spettroscopia UV-Vis.

3.5.3. Spettroscopia FT-IR (Fourier Transform Infrared)

I dati sulla struttura e sulla composizione delle fibre sono stati acquisiti mediante analisi di spettrofotometria infrarossa a riflettanza totale attenuata (FT-IR ATR), usando un Thermo Fisher Scientific Nicolet iS50 (Figura 3.9).

L'analisi FT-IR è stata condotta su ogni tipologia di membrana prima dell'irradiazione e dopo aver irraggiato il campione a 30 mW/cm² per 20 minuti. Dopo aver acquisito lo spettro FT-IR, è stata valutata l'area sottostante i picchi di interesse per calcolarne la conversione.



Figura 3.9: Nicolet Thermo Scientific iS50 FTIR spectrometer.

3.5.4 Prove meccaniche

Per l'analisi delle proprietà meccaniche dei campioni sono state effettuate prove di trazione, eseguite con la macchina di test INSTRON 3366 electromechanical universal testing machine, dotato di una cella di carico da 500 N (Figura 3.10). Dalle prove meccaniche, sono stati valutati il modulo elastico, la resistenza a trazione (UTS, ultimate tensile strength) e l'allungamento a rottura.

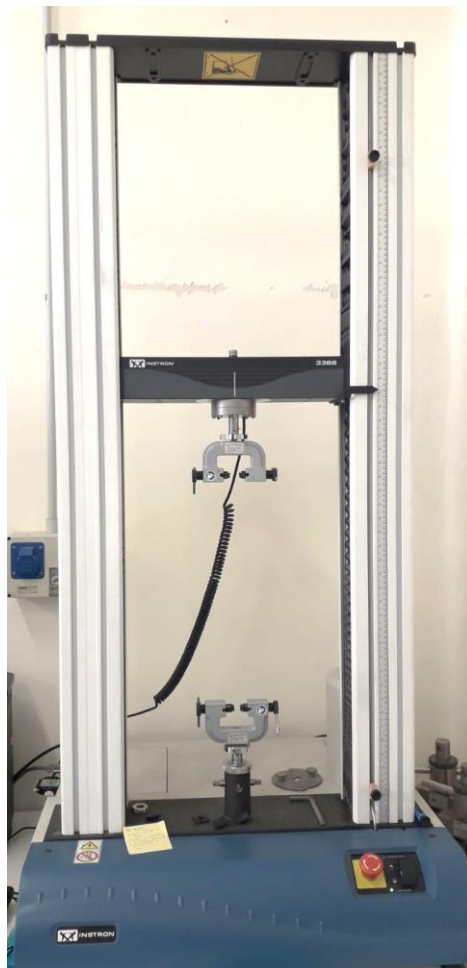


Figura 3.10: INSTRON 3366 electromechanical universal testing machine.

Le membrane impiegate per questi test hanno ricevuto una dose UV pari a 36 J/cm^2 .

Come provini sono state utilizzate delle striscioline larghe circa 1 cm e lunghe circa 6,5 cm, con una lunghezza del tratto utile compresa tra 1,5 e 2,9 cm. La Figura 3.11 mostra un campione utilizzato per i test meccanici.

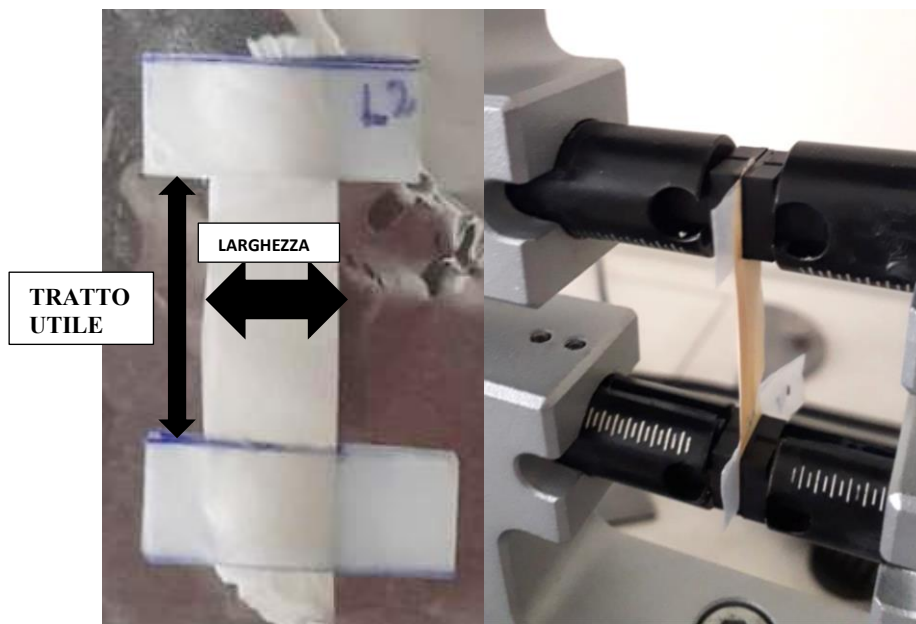


Figura 3.11: Esempio di campione utilizzato per i test meccanici.

Lo spessore dei provini è stato misurato mediante micrometro digitale. Dato che l'utilizzo del micrometro comportava spesso un danneggiamento del campione, è stato dunque deciso di assumere lo spessore di un campione come rappresentativo dello spessore degli altri provini della stessa membrana; a patto che visibilmente presentassero uno spessore simile.

Le prove meccaniche sono state effettuate a temperatura ambiente, applicando uno sforzo di trazione con velocità di allungamento costante di 5 mm/min, fino a determinare la rottura del provino. Avvenuta la rottura del provino, dai valori di output forniti, è stata ricavata la curva dello sforzo in trazione (MPa) versus la deformazione (mm/mm). L'UTS è stato ricavato come il massimo valore dello 'Sforzo in trazione (MPa)'; invece, per calcolare l'allungamento in corrispondenza del punto di rottura si è scelto il primo valore di deformazione per cui lo sforzo in trazione era prossimo allo zero. Successivamente, è stato considerato il primo tratto elastico lineare, la cui funzione è descritta dalla legge di Young: $\sigma = E \cdot \varepsilon$, dove σ è lo sforzo in trazione in MPa, E è il modulo di Young in MPa, ε è la deformazione in mm/mm, dato dal rapporto tra l'allungamento e la lunghezza a riposo del campione. Dunque, considerata la pendenza della retta, fino allo 0,1 % di deformazione, è stato calcolato il modulo di Young.

Infine, per ogni tipologia di membrana sono state effettuate almeno 3 prove ed è stata calcolata media e deviazione standard del modulo di Young, dell'allungamento a rottura e della massima resistenza del materiale.

3.5.5 Test antibatterici

È stata inoltre valutata l'antibattericità delle membrane, conferita dalle nanoparticelle d'argento. È stato quindi eseguito un antibiogramma con la metodica di Agar-diffusione (tecnica Kirby-Bauer) per testare la sensibilità dei batteri Gram-positivi *S.aureus* e dei batteri Gram-negativi *E.coli* alle membrane studiate. La figura 3.12 mostra i batteri su cui sono stati effettuati i test.

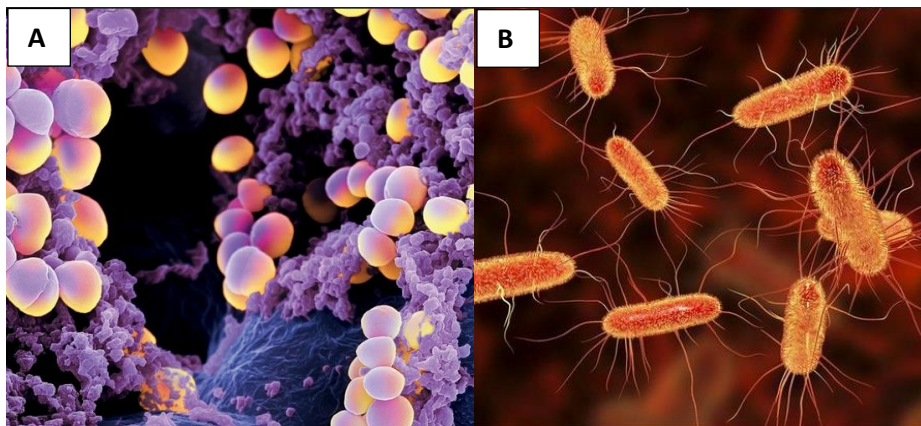


Figura 3.12: Batteri testati. (A)batterio Gram-positivo *S.aureus* . (B)batterio Gram-negativo *E.coli*.

Questa tipologia di test valuta l'antibattericità del campione, mediante la misura del diametro dell'alone di inibizione. L'alone di inibizione è quella regione che si manifesta attorno al campione, in cui la crescita del batterio è stata inibita. L'efficacia del campione sarà tanto maggiore quanto più grande risulterà l'alone di inibizione.

Per ogni campione, ottenuto con una dose di 36 J/cm^2 , sono state prodotti 6 dischi da 1 cm di diametro: tre campioni sono stati testati sul batterio *Gram-negativo*, i restanti tre sul batterio *Gram-positivo*.

Capitolo 4

Risultati e discussione

4.1 Preparazione delle membrane

In questo lavoro di tesi sono state preparate membrane a diversa concentrazione di nitrato d'argento (0%, 1%, 5% e 10%) mediante electrospinning. Inizialmente, in una prima fase di sperimentazione, il processo di electrospinning è stato ottimizzato per ottenere un getto stabile e membrane prive di difetti. La tensione è stata fatta variare da 10 kV fino a 19 kV, la portata da 0,10 ml/h fino a 0,25 ml/h e infine la distanza di lavoro a 15 cm e a 20 cm. Successivamente, è stato scelto di fissare la tensione a 17,5 kV, la portata a 0,10 ml/h e la distanza di lavoro a 20 cm.

L'umidità ha giocato un ruolo importante sul processo. Dalle mie osservazioni, è emerso che un'umidità inferiore al 40% può comportare una più frequente interruzione del getto; al contrario, umidità superiori sono maggiormente preferibili, poiché la formazione di gocce o l'interruzione del getto è meno frequente. Inoltre, è stato visto che filare una soluzione preparata lo stesso giorno è preferibile rispetto ad utilizzare soluzioni preparate i giorni precedenti: la formazione di gocce e l'interruzione del getto sono meno frequenti e la membrana occupa conseguentemente una superficie maggiore.

Successivamente al processo di electrospinning le membrane sono state sottoposte ad irradiazione UV. La membrana dopo essere stata sottoposta ad irradiazione UV ha assunto una colorazione che andava dal bianco per le membrane senza nitrato d'argento, fino al marrone per le membrane PEO-TMPTA-10Ag; assumendo una gradualità di colori man mano che aumentava il contenuto di nitrato d'argento nella soluzione di partenza (Figura 4.1) e il tempo di irradiazione (Figura 4.2)

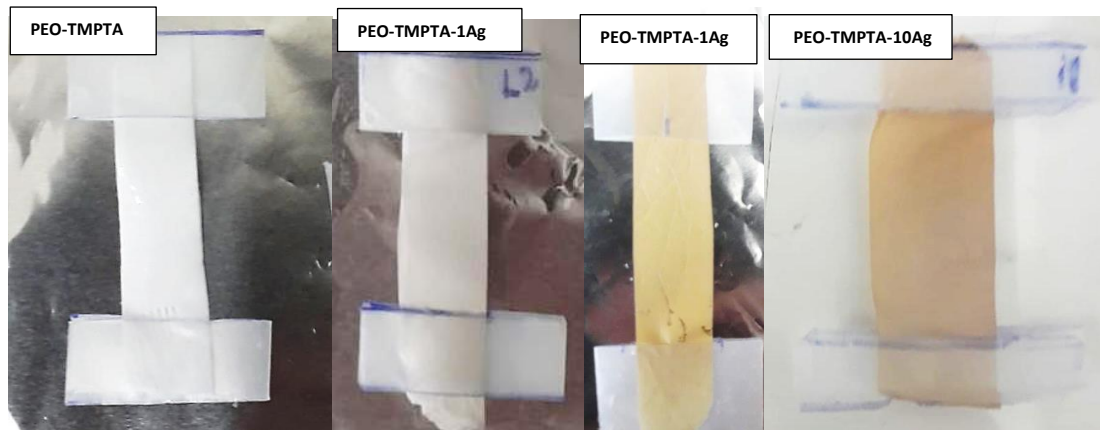


Figura 4.1: cambiamento di colore della membrana al variare del contenuto di nitrato d'argento, a parità di dose ricevuta.

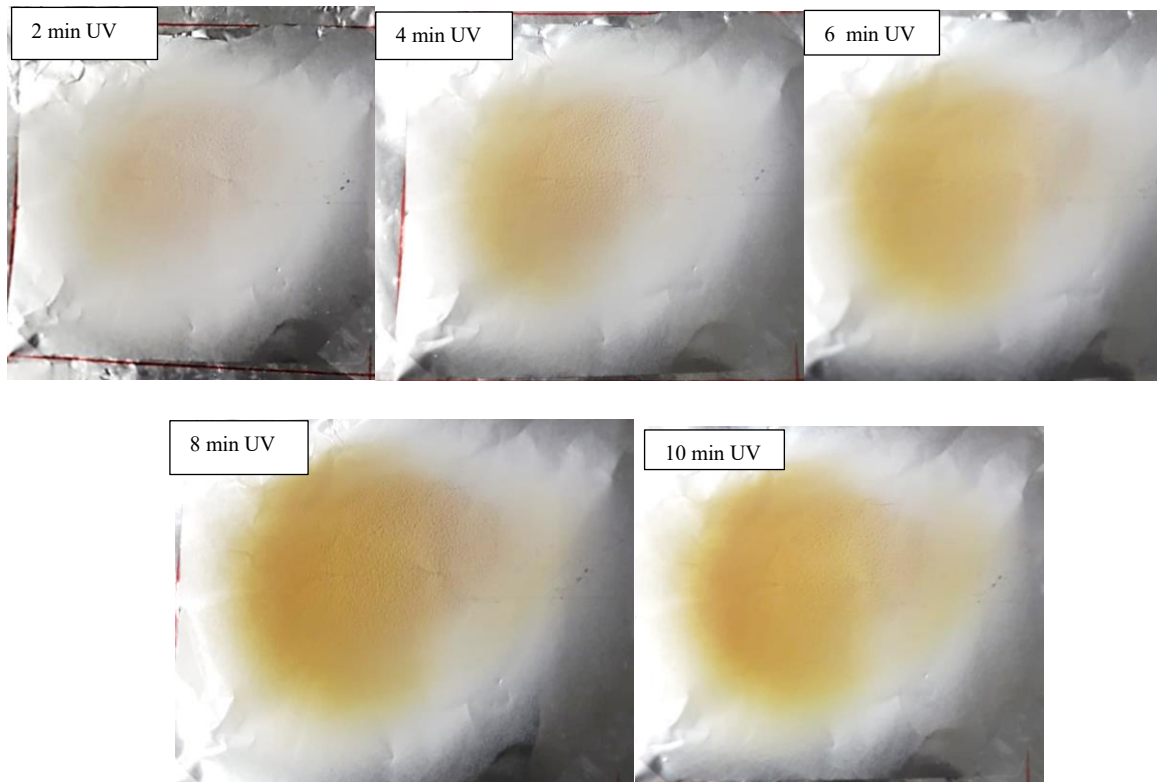


Figura 4.2: Esempio di cambiamento di colore per una membrana PEO-TMPTA-10Ag, al variare del tempo di irradiazione UV.

4.2 Analisi FESEM

Per studiare la morfologia delle membrane prodotte, dopo aver ricevuto l'irradiazione, queste sono state sottoposte ad analisi FESEM. Per ogni tipologia di campione si sono ottenute delle membrane formate da fibre continue, come mostrato nella Figura 4.3.

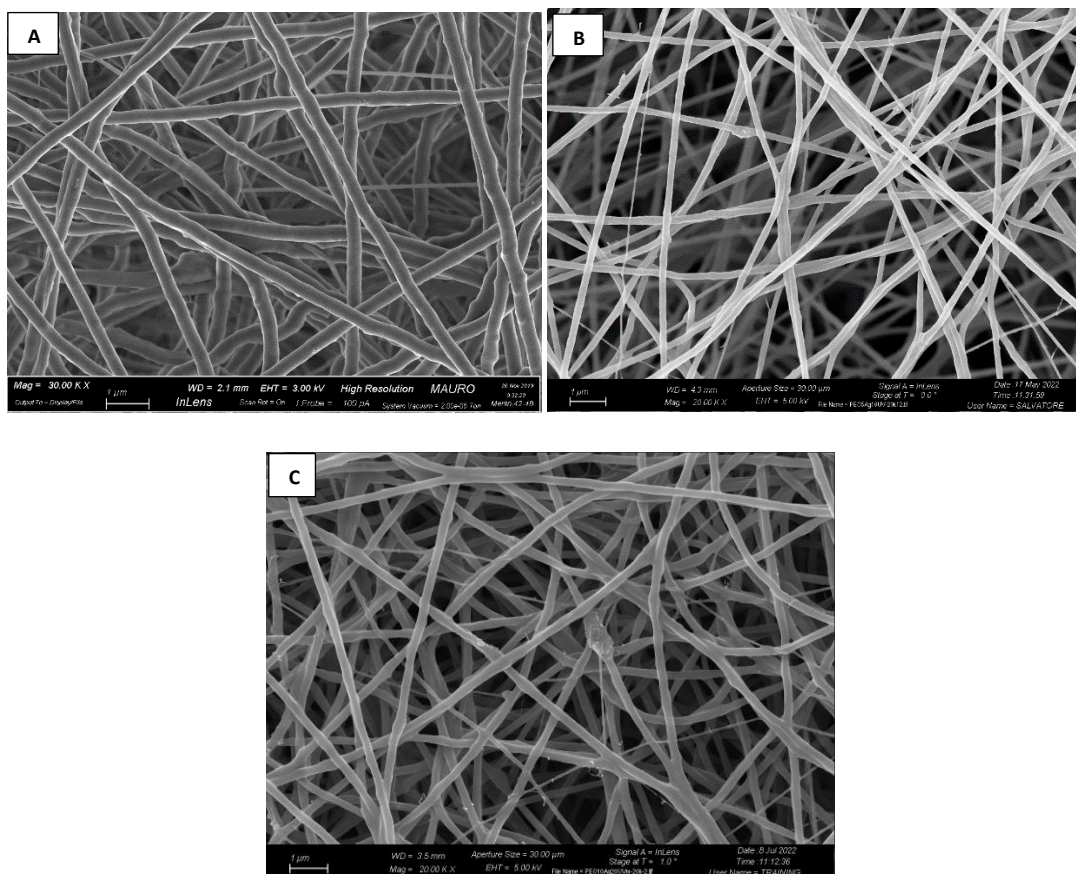


Figura 4.3: Immagini FESEM delle membrane a base PEO. (A) PEO-TMPTA. (B) PEO-TMPTA-5Ag. (C) PEO-TMPTA-10Ag.

Le immagini FESEM mostrano che la morfologia globale non varia all'aumentare della quantità di nitrato d'argento nella soluzione iniziale. Mediante il software ImageJ è stato valutato il diametro medio delle fibre, per ogni tipologia di membrana. I risultati espressi in nm come media \pm deviazione standard sono riportati in Tabella 4.1 mentre i relativi grafici ad istogrammi sono riportati in Figura 4.4

Tipologia di fibre	Dimensioni medie (nm) (media \pm deviazione standard) - ingrandimenti di 15 e 20 KX	Dimensioni medie (nm) (media \pm deviazione standard) - ingrandimenti di 50 KX
PEO-TMPTA	209,3 \pm 38,1	184,7 \pm 22,7
PEO-TMPTA-5Ag	183,3 \pm 15	169,5 \pm 13,1
PEO-TMPTA-10Ag	203,2 \pm 25,1	179 \pm 15,6

Tabella 4.1: Dimensioni medie dei diametri delle fibre PEO-TMPTA, PEO-TMPTA-5Ag, PEO-TMPTA-10Ag, espresse in nm, come media \pm deviazione standard, dopo essere state irradiate, misurate su ingrandimenti di 15, 20 e 50 KX.

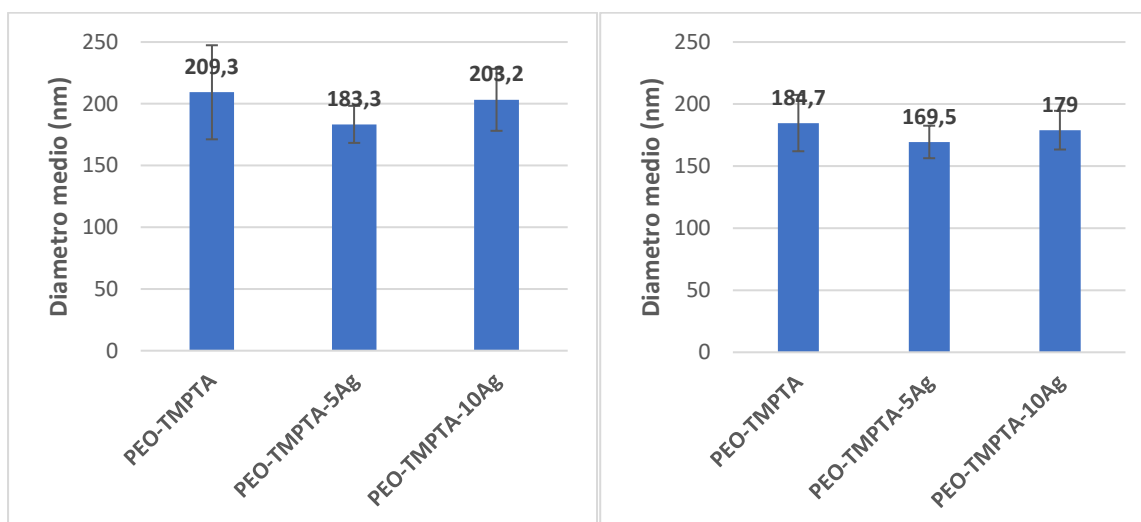


Figura 4.4: Istogrammi delle dimensioni medie dei diametri delle fibre irradiate, espresse in nm, come media \pm deviazione standard, misurate su ingrandimenti di 15 e 20 KX (sinistra) e 50 KX (destra)..

Come si osserva dalla Figura 4.4, la dimensione media delle fibre non varia di molto al mutare della quantità di nitrato d'argento nella soluzione iniziale, da cui si può concludere che l'aggiunta del nitrato di argento non influenza la dimensione dei diametri delle fibre.

Attraverso l'analisi FESEM è stato inoltre possibile visualizzare le particelle di argento, formatesi a seguito dell'irradiazione, come mostrato in Figura 4.5. A differenza di prima, in questo caso le fibre in figura non sono state metallizzate.

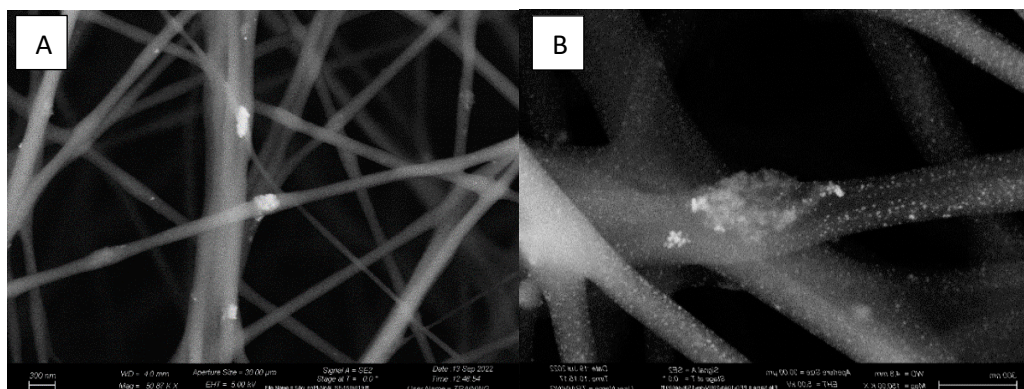


Figura 4.5: Immagini FESEM delle membrane a base PEO a diverse concentrazioni di nitrato d'argento. (A) PEO-TMPTA-5Ag. (B) PEO-TMPTA-10Ag.

Come mostrato dalla Figura 4.5, nel caso dei campioni PEO-TMPTA-5Ag, a differenza dei campioni PEO-TMPTA-10Ag, non sono state rilevate evidenti particelle. Infatti, nella Figura 4.5 A, si osservano poche particelle e sono ben evidenti agglomerati di particelle, della dimensione media stimata di $(210,9 \pm 83,5)$ nm. Al contrario, particelle ben disperse sono state riscontrate nelle fibre a più alto contenuto di argento (Figura 4.5 B). Il loro diametro medio è risultato essere di circa (19 ± 11) nm. Le immagini FESEM hanno dunque riscontrato la presenza di particelle nanometriche.

La morfologia delle membrane PEO-TMPTA-10Ag è stata analizzata anche dopo l'immersione dei campioni in acqua distillata, per un'ora, per osservare come cambiassero le fibre in ambiente acquoso (Figura 4.6). Le membrane si sono dimostrate resistenti all'acqua. Infatti, grazie alla reticolazione del polimero, la morfologia fibrosa si è mantenuta ed è risultata solamente una leggera riduzione del diametro delle fibre ((131 ± 32) nm), a seguito dell'immersione in acqua. Inoltre, come si può notare dalla Figura 4.6, anche dopo l'immersione in acqua, le particelle d'argento sono ancora presenti all'interno delle fibre.

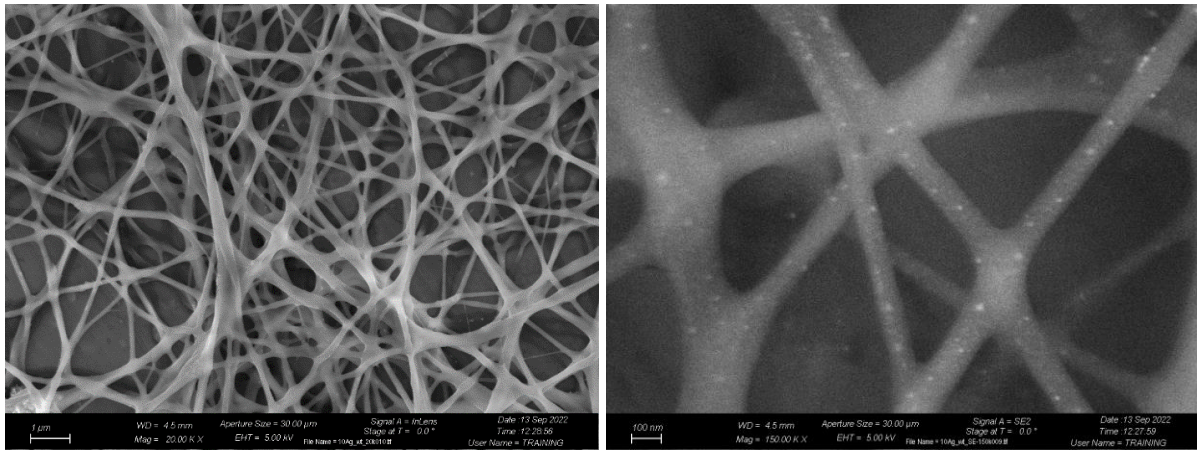


Figura 4.6: Immagine FESEM di una membrana PEO-TMPTA-10Ag, dopo essere stata immersa per un'ora in acqua distillata.

4.3 Studio sulla generazione in situ delle particelle di argento

Per confermare che le particelle osservate al FESEM siano effettivamente particelle di argento, le membrane sono state sottoposte a spettroscopia UV-Vis ed EDX.

4.3.1 Spettroscopia UV-VIS

Le varie tipologie di membrane sono state analizzate tramite spettroscopia UV-Vis per confermare la presenza di particelle di argento, formate a seguito dell'irradiazione UV del campione. Il picco caratteristico in spettroscopia UV-Vis della formazione di nanoparticelle di argento si presenta ad una lunghezza d'onda di circa 450 nm [67].

È stata preparata una soluzione acquosa di nitrato di argento, di concentrazione molare pari a 30 mM e benzofenone al 3,2 wt% rispetto al peso di nitrato d'argento. Successivamente, ne è stato ottenuto lo spettro UV-Vis. In seguito, la soluzione è stata sottoposta ad irradiazione UV a 60 mW/cm² per 2, 5, 10, 15, 20 e infine 25 minuti. Dopo ogni irradiazione ne è stato ottenuto lo spettro UV-Vis (Figura 4.7).

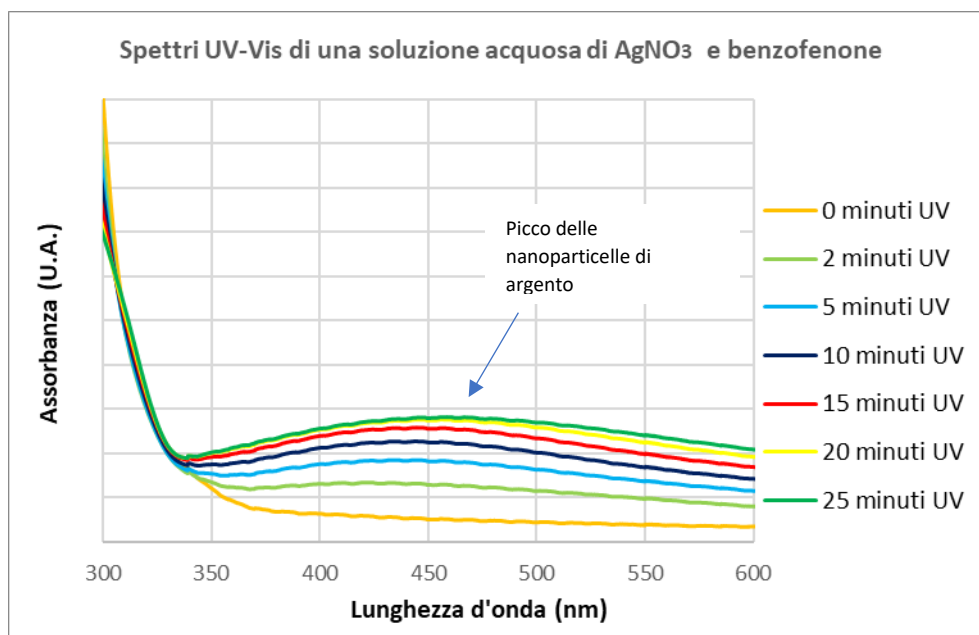


Figura 4.7: Spettri UV-Vis di una soluzione acquosa di nitrato d'argento (30mM) e benzofenone (3,2 wt% rispetto al peso di AgNO_3), sottoposta a irradiazione UV per 2, 5, 10, 15, 20 e 25 minuti a 60 mW/cm^2 .

Come da letteratura, è stato visto che, all'aumentare del periodo di irradiazione, si ha la formazione del picco tipico delle nanoparticelle, a conferma del fatto che si sono formate le particelle.

Inoltre, è stato osservato un inscurimento della soluzione al crescere della dose UV, ricevuta dal campione, causato dalla generazione delle particelle (Figura 4.8).

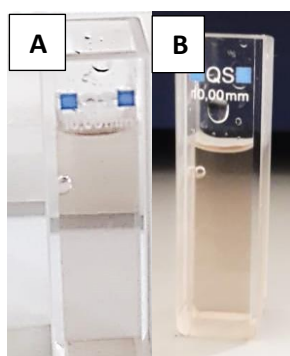


Figura 4.8: inscurimento di una soluzione di nitrato d'argento (30 mM) e benzofenone (3,2 wt% rispetto al peso di AgNO_3), sottoposto a 60 mW/cm^2 di irradiazione UV. (A) Campione irradiato per 10 minuti. (B) Campione irradiato per 20 minuti.

Inoltre, si è andato a studiare lo spettro del benzofenone, preparando una soluzione di benzofenone in etanolo (1 wt%). Il relativo spettro è rappresentato in Figura 4.9.

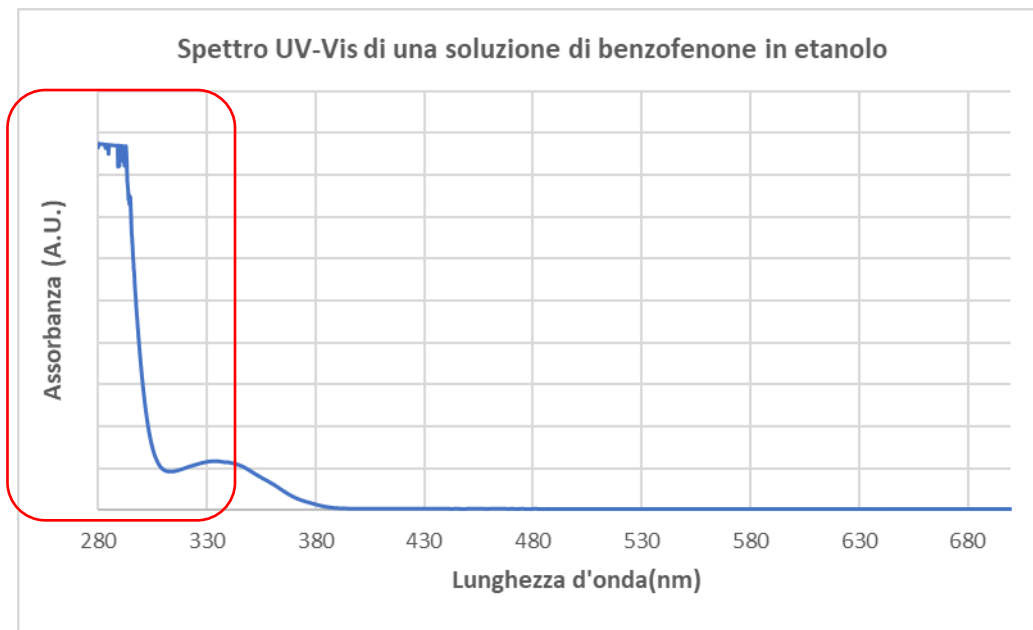


Figura 4.9: Spettro di assorbimento di una soluzione di benzofenone in etanolo (1 wt%).

Come mostra la Figura 4.9, l'assorbimento del benzofenone avviene al di sotto dei 380 nm e non ha quindi nessuna influenza nel range di lunghezze d'onda in cui vi è lo spettro di assorbimento delle particelle.

Successivamente, sono stati analizzati gli spettri delle membrane oggetto di questa tesi, osservati nel range di lunghezze d'onda di interesse, ovvero in un intorno di 450 nm. Tutti i campioni esaminati hanno ricevuto un'irradiazione UV di 60 mW/cm².

In Figura 4.10 sono riportati gli spettri di un campione PEO-TMPTA, inizialmente non irradiato e successivamente irradiato per 10 minuti. Come si osserva, i due spettri risultano paralleli tra loro e non è visibile nessun picco a 450 nm, vista l'assenza dell'argento.

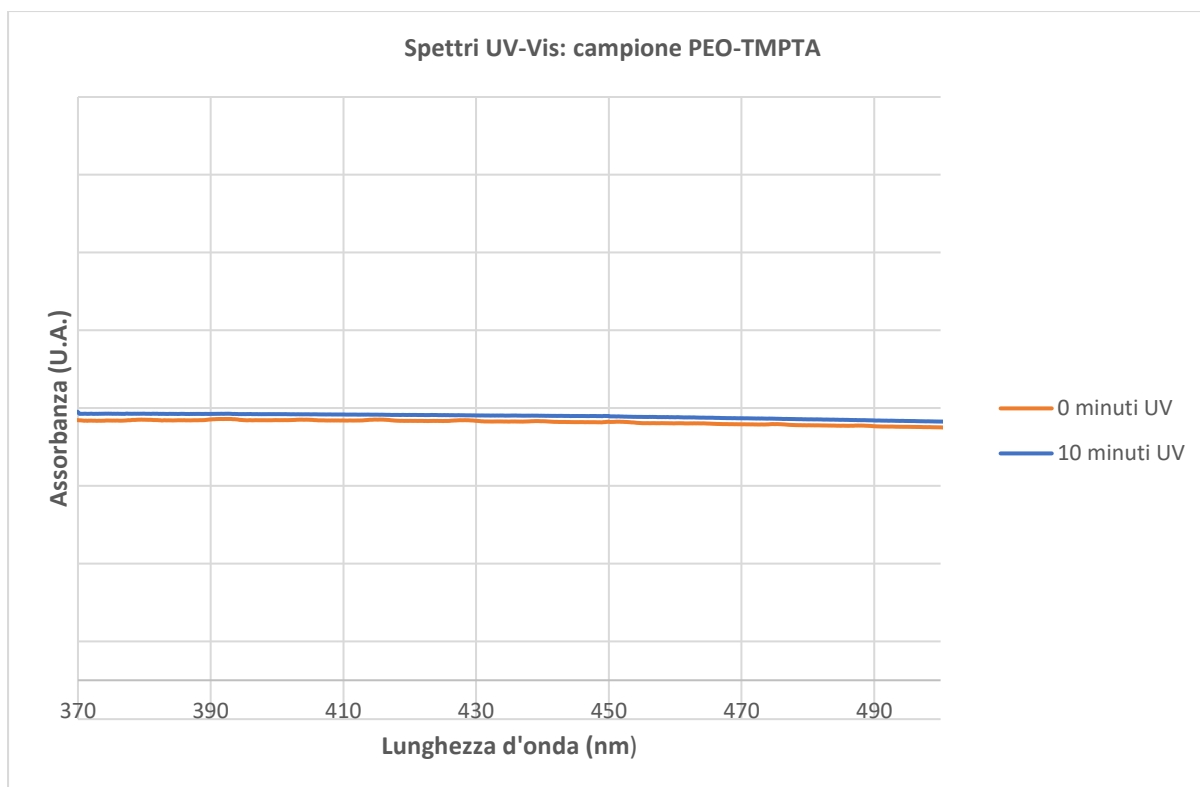


Figura 4.10: Spettro UV-Vis di un campione PEO-TMPTA non irradiato ed irradiato a 60 mW/cm^2 per 10 minuti .

In Figura 4.11 sono riportati gli spettri di un campione PEO-TMPTA-1Ag, inizialmente non irradiato e successivamente irradiato per 2, 5,10 e 15 minuti. Come si può osservare, gli spettri restano sostanzialmente piatti, analogamente al campione PEO-TMPTA; da cui si può concludere che una concentrazione pari al 1% di nitrato d'argento nella soluzione di partenza è insufficiente per rilevare il picco a 450 nm.

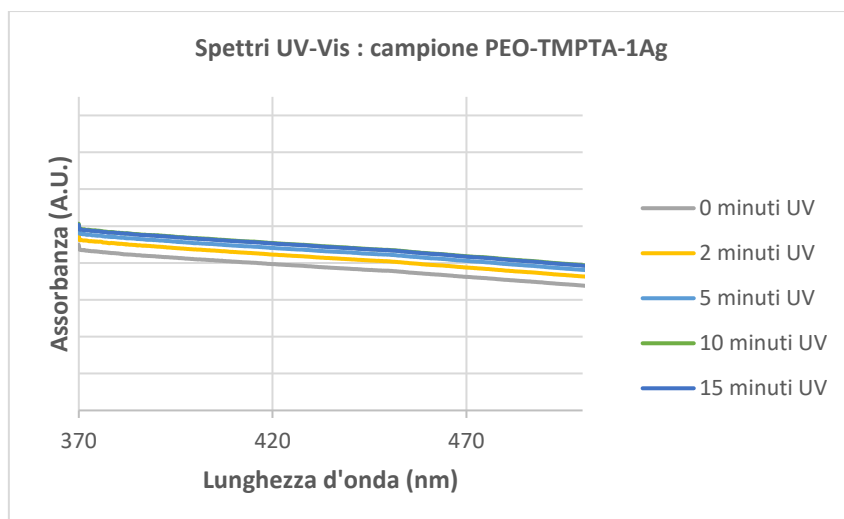


Figura 4.11: Spettro UV-Vis di un campione PEO-TMPTA-1Ag non irradiato, irradiato a 60 mW/cm^2 per 2, 5, 10 e infine 15 minuti.

Nella Figura 4.12, sono riportati invece gli spettri di un campione PEO-TMPTA-5Ag, non irradiato e sottoposto a 60 mW/cm^2 di irradiazione per 10 e 15 minuti. Come si può osservare dal grafico, con una concentrazione del 5 % di nitrato d'argento, all'aumentare del tempo di irradiazione lo spettro, a parità di lunghezza d'onda, aumenta il proprio valore di assorbanza, delineando a 15 minuti di irradiazione UV il picco delle particelle.

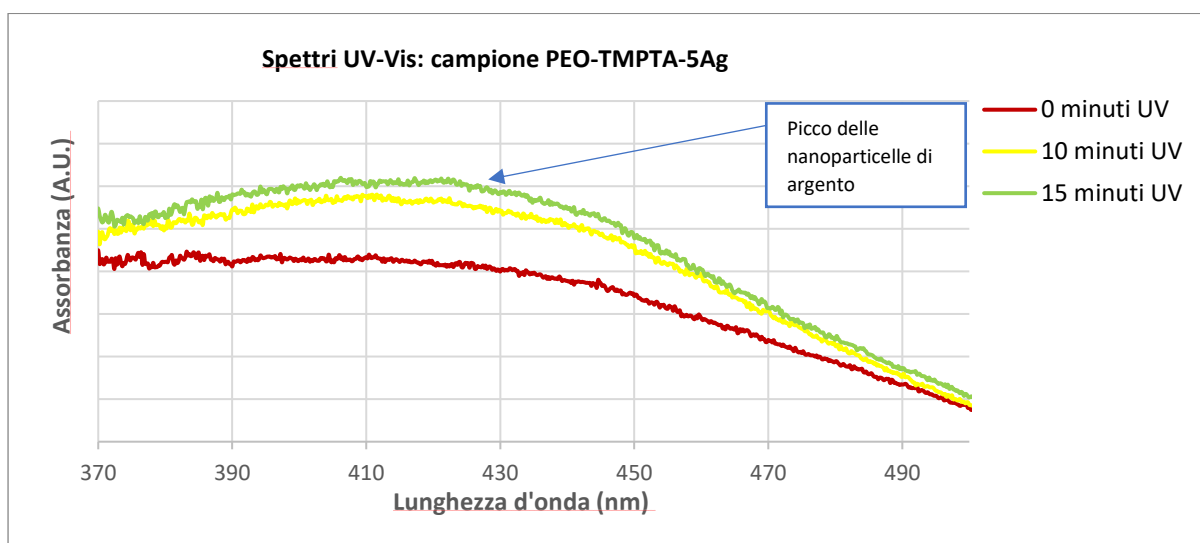


Figura 4.12: Spettro UV-Vis di un campione PEO-TMPTA-5Ag non irradiato e sottoposto a 10 minuti e 15 minuti di irradiazione UV, a 60 mW/cm^2 .

Infine, in Figura 4.13 sono presenti gli spettri di una membrana PEO-TMPTA-10Ag, senza essere irradiata e sottoposta a 60 mW/cm^2 di irradiazione UV per 2, 5, 10 e 15 minuti. Anche per i campioni con il 10 % di nitrato d'argento si è visto che al crescere della dose UV ricevuta dal campione lo spettro aumenta di assorbanza a parità di lunghezza d'onda. Anche in questo caso è evidente la presenza del picco attorno a 450 nm, a conferma della generazione delle particelle.

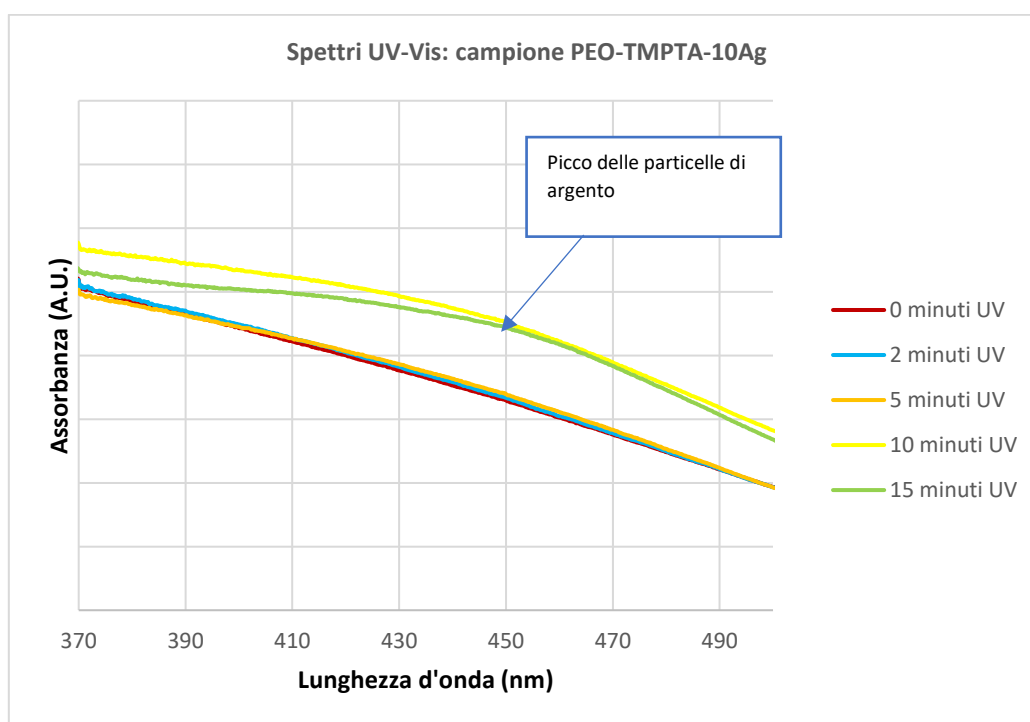


Figura 4.13: Spettri UV-Vis di un campione PEO-TMPTA-10Ag non irradiato, irradiato a 60 mW/cm^2 per 2 minuti, 5 minuti, 10 minuti e infine 15 minuti.

La spettroscopia UV-Vis, dunque, ha confermato la presenza delle particelle, prodotte a seguito dell'irradiazione.

4.3.2 Spettroscopia EDX

Le varie tipologie di membrane sono state analizzate tramite spettroscopia EDX per confermare la presenza di particelle di argento, formate a seguito dell'irradiazione UV del campione. Le Figure 4.14, 4.15 e 4.16 mostrano i risultati EDX rispettivamente per i campioni PEO-TMPTA, PEO-TMPTA-5Ag e PEO-TMPTA-10Ag

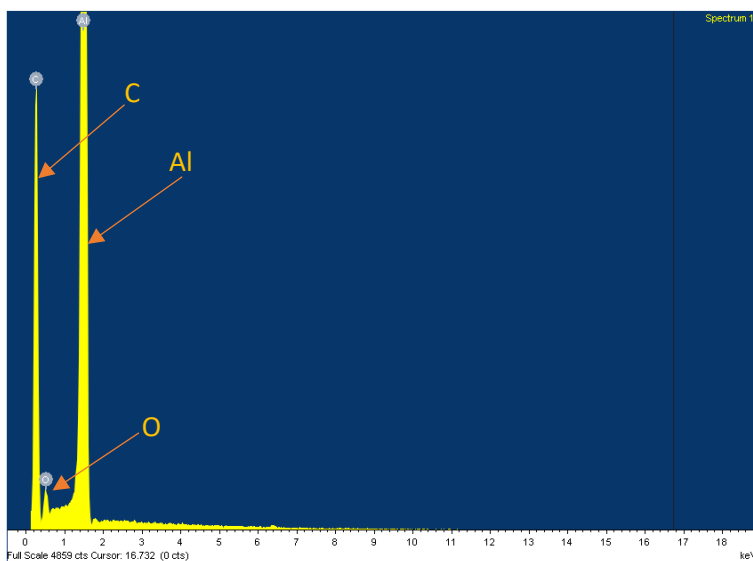


Figura 4.14: Spettro EDX di un campione PEO-TMPTA, irradiato a 30 mW/cm^2 per 20 minuti.

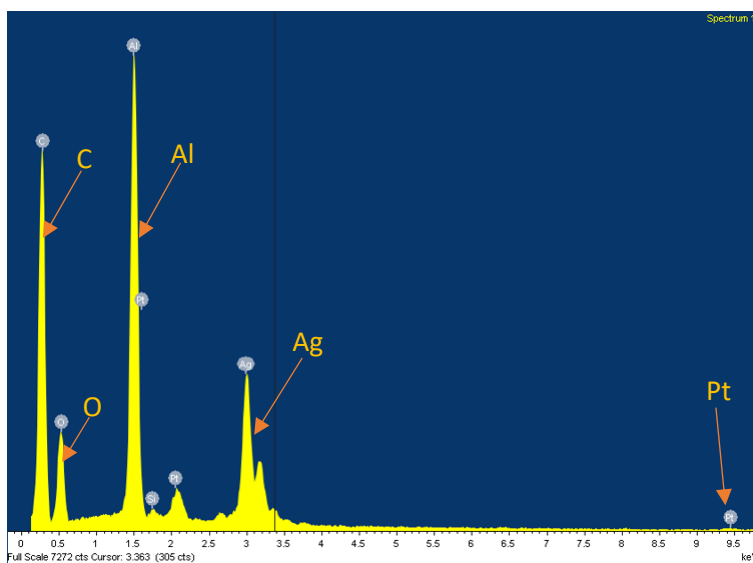


Figura 4.15: Spettro EDX di un campione PEO-TMPTA-5Ag, irradiato a 60 mW/cm^2 per 15 minuti.

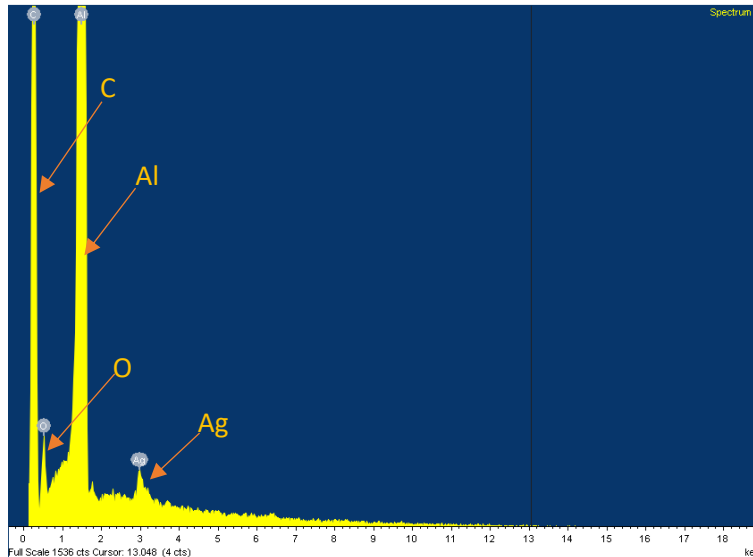


Figura 4.16: Spettro EDX di un campione PEO-TMPTA-10Ag, irradiato a 30 mW/cm^2 per 20 minuti.

In tutti gli spettri è evidente il picco dell'alluminio, presente perché i campioni sono stati analizzati sul supporto di alluminio. Inoltre, tutti gli spettri presentano i picchi di carbonio e ossigeno. In aggiunta, negli spettri dei campioni PEO-TMPTA-5Ag e PEO-TMPTA-10Ag è presente in più il picco dell'argento, ad indicare che le particelle osservate al FESEM sono realmente di argento. Nello spettro EDX del campione PEO-TMPTA-5Ag, oltre ad essere presente il picco dell'argento ad indicare la presenza delle particelle, è presente anche il picco del platino, causato dalla metallizzazione che ha subito il campione.

4.4 Spettroscopia FT-IR

Un campione rappresentativo per ogni percentuale di nitrato d'argento (0%, 1%, 5% e 10%) è stato sottoposto a spettroscopia FT-IR.

Questa analisi è stata funzionale a:

- verificare la corretta fotoreticolazione
- verificare l'influenza dell'argento sulle percentuali di conversione dei gruppi C=C

I Picchi caratteristici che identificano i materiali impiegati sono stati riportati in Tabella 4.2, Tabella 4.3, Tabella 4.4 e Tabella 4.5.

Caratteristica del PEO	Numero d'onda (cm⁻¹)	Referenze
<i>Stretching del C-H del PEO</i>	2876	[80]
<i>Bending del C-H</i>	1466	[80]
<i>Wagging del CH₂</i>	1360 e 1341	[80]
<i>Twisting del CH₂</i>	1279	[80]
Triplo picco dovuto al complesso di assorbimento C-O-C	1145 1100 1060	[80]
<i>Rocking e stretching del PEO</i>	843	[81]

Tabella 4.2: Numeri d'onda caratteristici del PEO, analizzato mediante spettroscopia ATR FT-IR.

Caratteristica del TMPTA	Numero d'onda (cm⁻¹)	Referenze
Stretching del -C=C-	1635	[82]
Vibrazioni del legame -C=O	1730	[82]
Twisting del -C=C-	810	[82]

Tabella 4.3: Numeri d'onda caratteristici del TMPTA, analizzato mediante spettroscopia ATR FT-IR.

Caratteristiche del nitrato di argento	Numero d'onda (cm⁻¹)	Referenze
Stretching del legame N=O	1384	[83]

Tabella 4.4: Numero d'onda caratteristico del nitrato di argento, analizzato mediante spettroscopia ATR FT-IR.

Caratteristiche delle nanoparticelle di argento	Numero d'onda (cm⁻¹)	Referenze
Stretching del (NH) C = O	1631	[84]
Stretching C-C e C-N	1383	[84]

Tabella 4.5: Numeri d'onda caratteristici delle nanoparticelle di argento, analizzato mediante spettroscopia ATR FT-IR.

Nelle Figure 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20, sono mostrate rispettivamente gli spettri FT-IR delle membrane allo 0%, 1%, 5% e 10 % di nitrato d'argento nella soluzione iniziale, prima di essere irradiate a 30 mW/cm² per 20 minuti e dopo l'irradiazione.

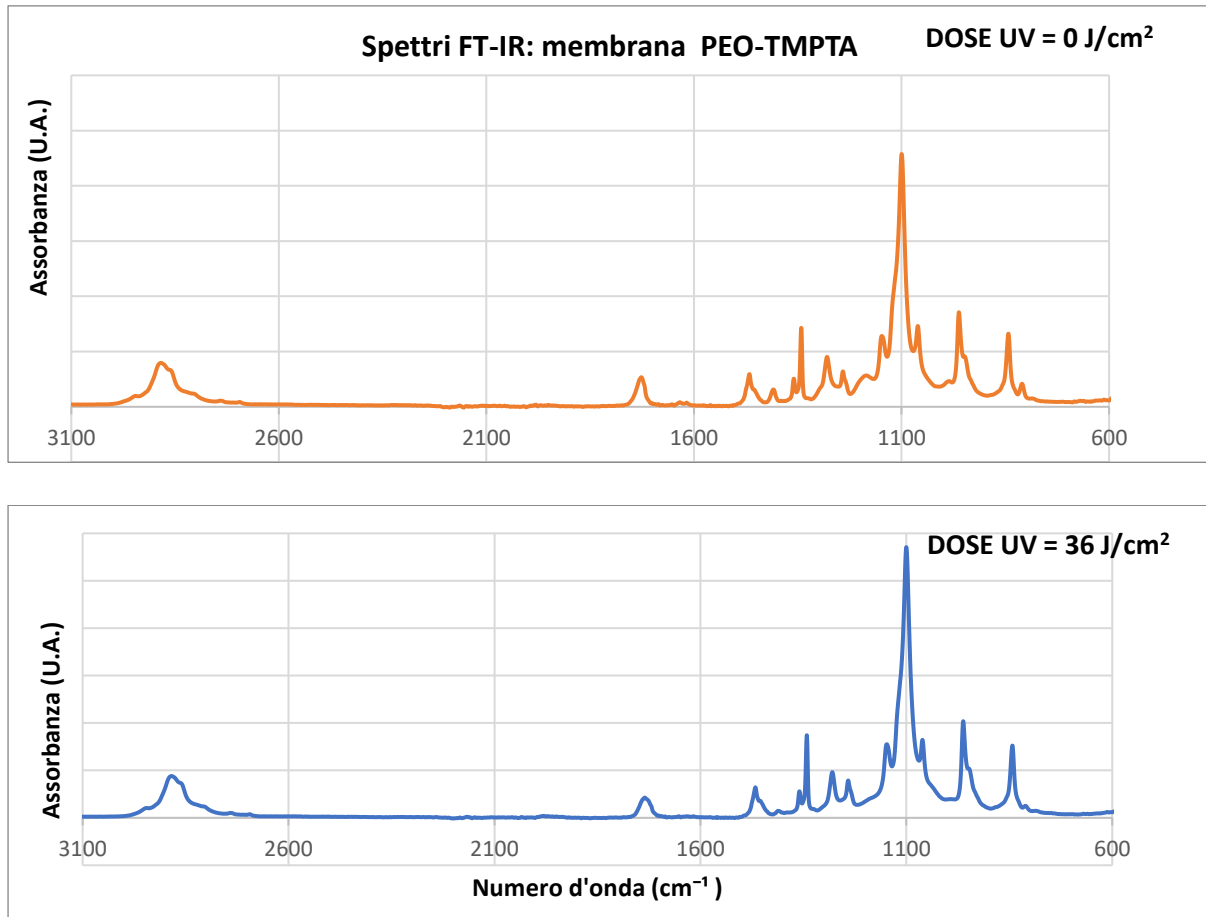


Figura 4.17: Spettri FT-IR di una membrana PEO-TMPTA, prima e dopo un'irradiazione a 30 mW/cm² per 20 minuti.

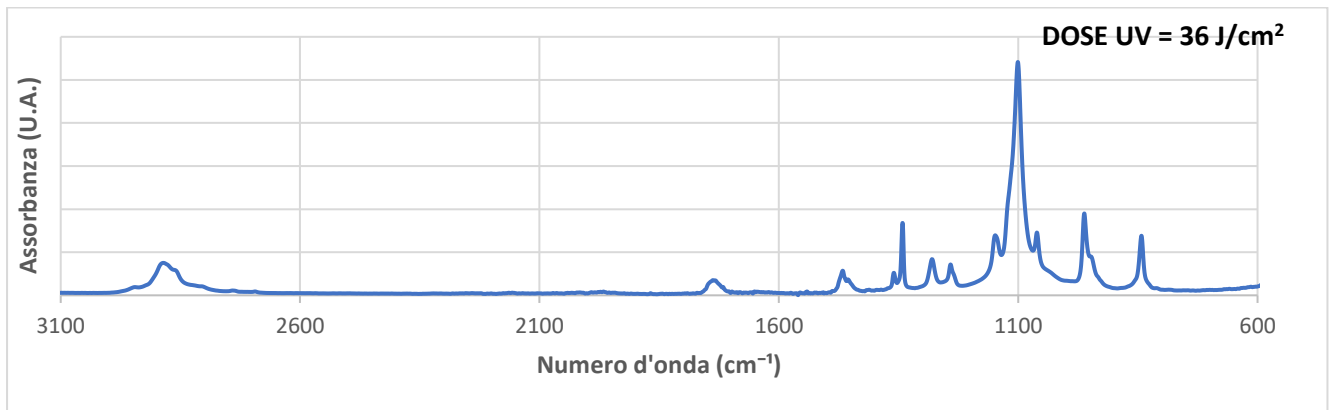
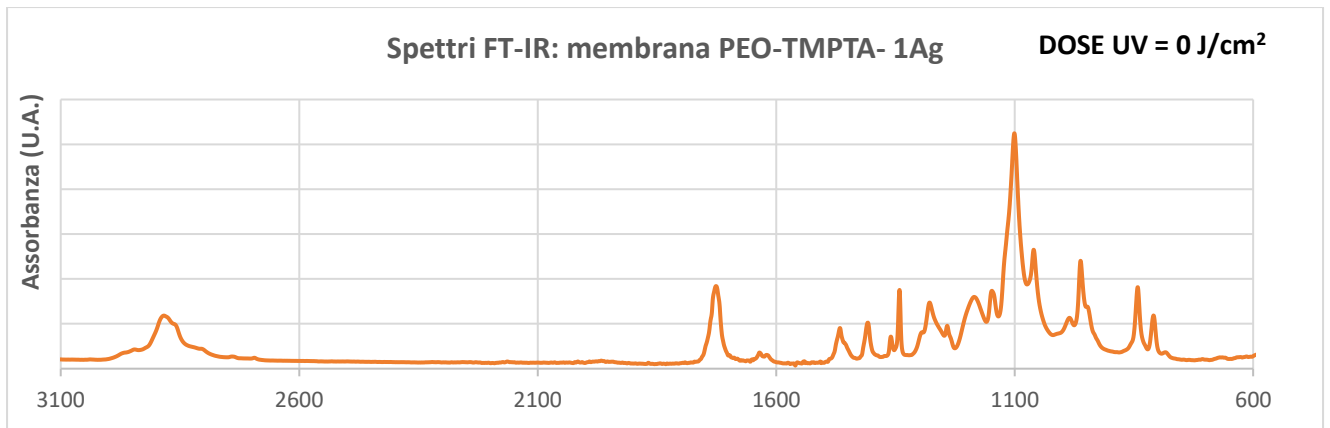
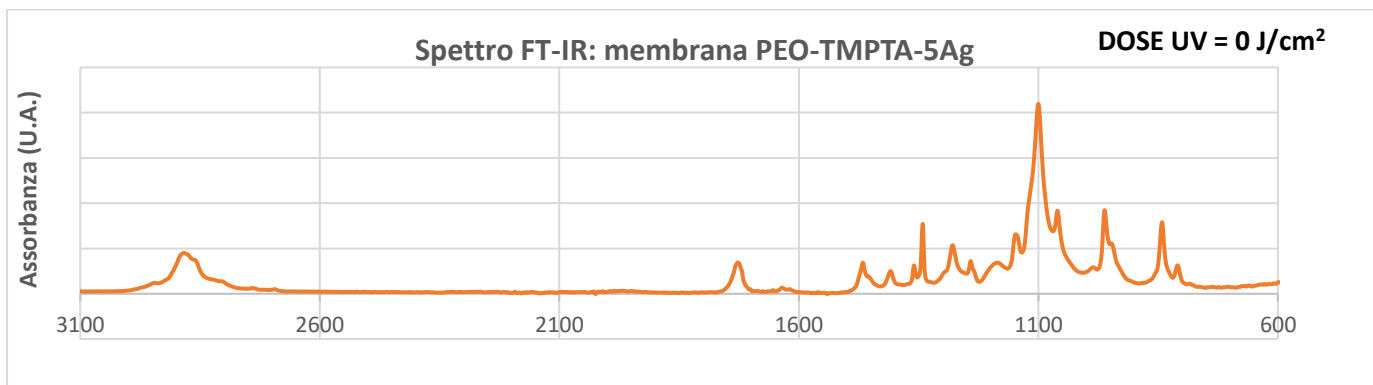


Figura 4.18: Spettri FT-IR di una membrana PEO-TMPTA-1Ag, prima e dopo un'irradiazione a 30 mW/cm² per 20 minuti.



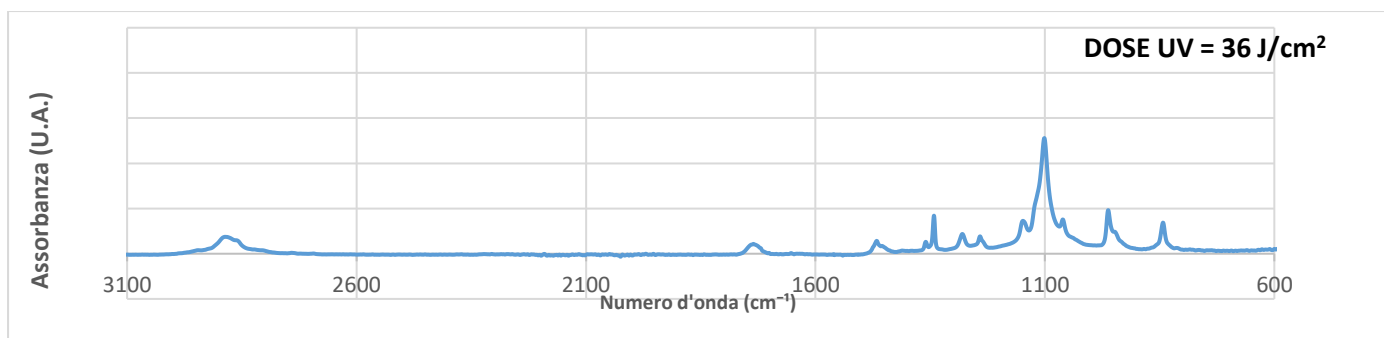


Figura 4.19: Spettri FT-IR di una membrana PEO-TMPTA-5Ag, prima e dopo un'irradiazione a 30 mW/cm² per 20 minuti.

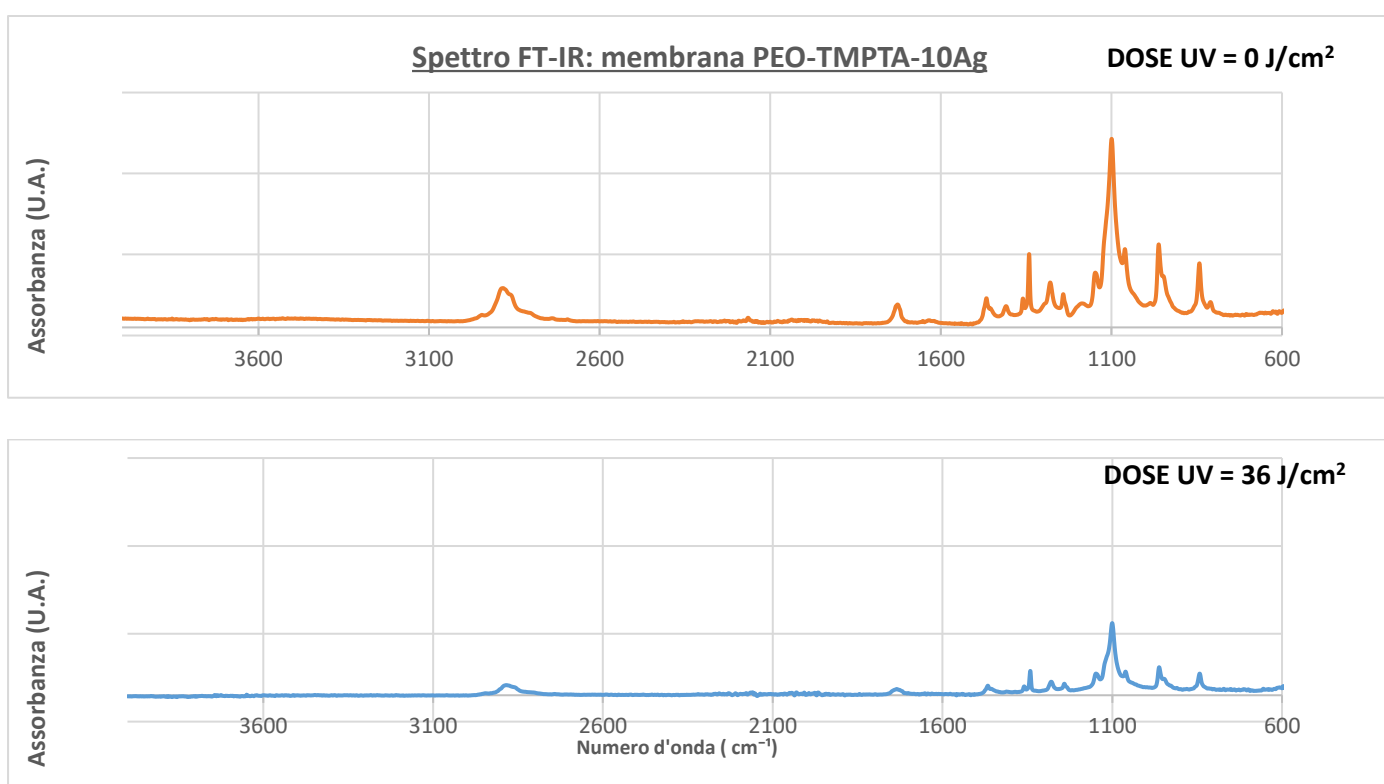


Figura 4.20: Spettri FT-IR di una membrana PEO-TMPTA-10Ag, prima e dopo un'irradiazione a 30 mW/cm² per 20 minuti.

Per tutti i campioni si osserva una diminuzione dello spettro, a seguito dell'irradiazione UV. In particolare, si è osservato che i picchi a 1177 cm⁻¹, a 1638 cm⁻¹, dei gruppi vinilici del TMPTA, a 810 cm⁻¹, responsabile del twisting del gruppo -C=C- nel TMPTA, presenti prima dell'irradiazione si appiattiscono a seguito dell'irradiazione, a conferma dell'avvenuta reticolazione.

Dall'analisi FT-IR non è stato possibile individuare i picchi delle nanoparticelle di argento. Una spiegazione plausibile è che i picchi che confermerebbero la presenza delle particelle sono 'nascosti' dai picchi che caratterizzano i materiali della membrana; il picco delle particelle a 1631 cm^{-1} potrebbe essere nascosto da quello relativo allo stretching del -C=C- del TMPTA (1635 cm^{-1}). Infine, il picco caratteristico delle particelle a 1383 cm^{-1} (a cui corrisponde anche il picco del nitrato di argento) potrebbe essere mascherato da quello di wagging del CH_2 del PEO, a 1360 cm^{-1} .

A ciò si aggiunge la rumorosità intrinseca degli spettri che rende ancora più difficoltosa l'identificazione dei picchi.

Ad eccezione per il campione PEO-TMPTA-5Ag, sono state calcolate le percentuali di conversioni C=C per le membrane, che sono riportate in Tabella 4.6.

Campione	CONVERSIONE C=C
PEO-TMPTA	17,2
PEO-TMPTA-1Ag	18,8
PEO-TMPTA-10Ag	22,99

Tabella 4.6: Percentuali di conversione C=C .

Come si osserva dalla Tabella 4.6, i valori di conversione C=C sono molto simili tra loro, da cui si può concludere che la presenza di argento non influisce in modo significativo sulle percentuali di conversione. Inoltre, è importante osservare che tali valori sono in accordo con la letteratura.[12]

4.5 Test meccanici

Per quanto riguarda i test meccanici, le membrane PEO-TMPTA-5Ag sono state irraggiate a 60 mW/cm^2 con un tempo di esposizione di 5 e 10 minuti. Tuttavia, utilizzando questa potenza si sono riscontrate delle problematiche con le membrane PEO-TMPTA-10Ag: queste, una volta irraggiate,

rimanevano molto adese all'alluminio, rendendo difficile la loro rimozione da quest'ultimo. La causa è da attribuire al calore emanato dalla sorgente di irradiazione.

Dunque, è stato deciso di abbassare la potenza di irradiazione a 30 mW/cm^2 , raddoppiando il tempo di esposizione, per mantenere costante la dose. Pertanto, si è irraggiato per 10 minuti, ma è stato osservato che la membrana non assumeva la colorazione che ci si aspettava; perciò, è stato raddoppiato il tempo di esposizione, portandolo a 20 minuti. Questa durata ha ulteriormente inscurito la membrana. (Figura 4.21)

Motivo per cui tutte le successive prove meccaniche sono state effettuate su campioni irradiati a 30 mW/cm^2 per 20 minuti di esposizione.

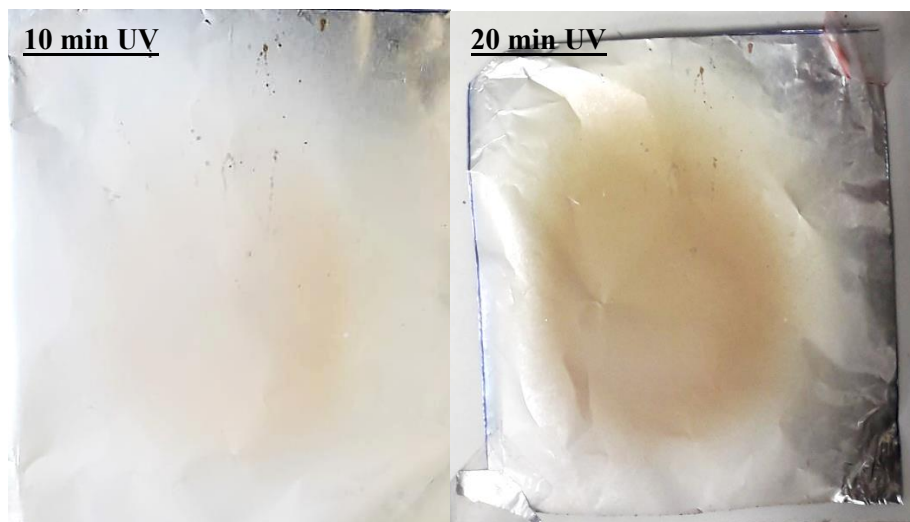


Figura 4.21: Membrana al 10 % di nitrato d'argento irradiata ad un'intensità di 30 mW/cm^2 , per un tempo di esposizione di 10 minuti (immagine a sinistra) e 20 minuti (immagine a destra).

Dopo l'irradiazione, i campioni sono stati sottoposti a test di trazione, per studiare se l'incremento di nitrato d'argento nella soluzione iniziale determinasse un cambiamento sulle proprietà meccaniche. Per ogni campione testato sono stati valutati il modulo di Young, espresso in MPa, l'allungamento a rottura, espresso in percentuale e infine la massima resistenza del materiale a rottura, in MPa. I test sono stati effettuati a temperatura ambiente, applicando una velocità di allungamento costante del provino pari a 5 mm/min . Per tutti i test effettuati, è stato visto che la rottura di tutti i campioni è avvenuta in corrispondenza o in prossimità dello strato di parafilm.

I grafici sforzo-deformazione sono riportati in Figura 4.22, mentre gli istogrammi con le barre di errore del modulo di Young, dell'allungamento a rottura e del massimo sforzo a trazione sono riportati rispettivamente in Figura 4.23, Figura 4.24 e Figura 4.25.

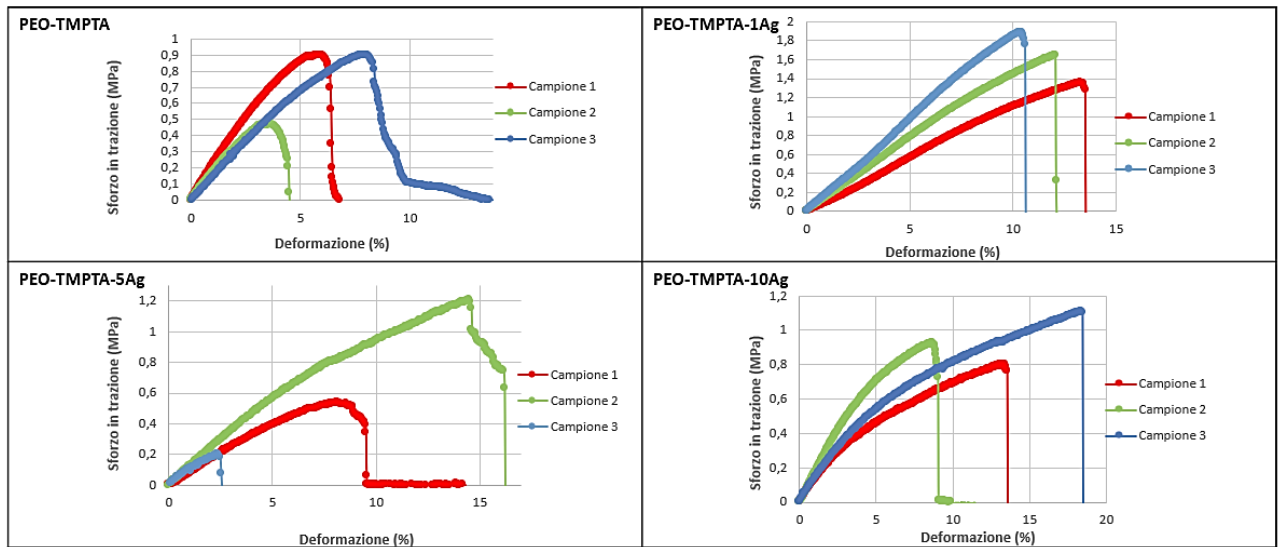


Figura 4.22: grafici sforzo in trazione, in MPa (in ordinata) – deformazione in % (in ascissa). Per ogni tipologia di campione sono state riportate 3 curve.

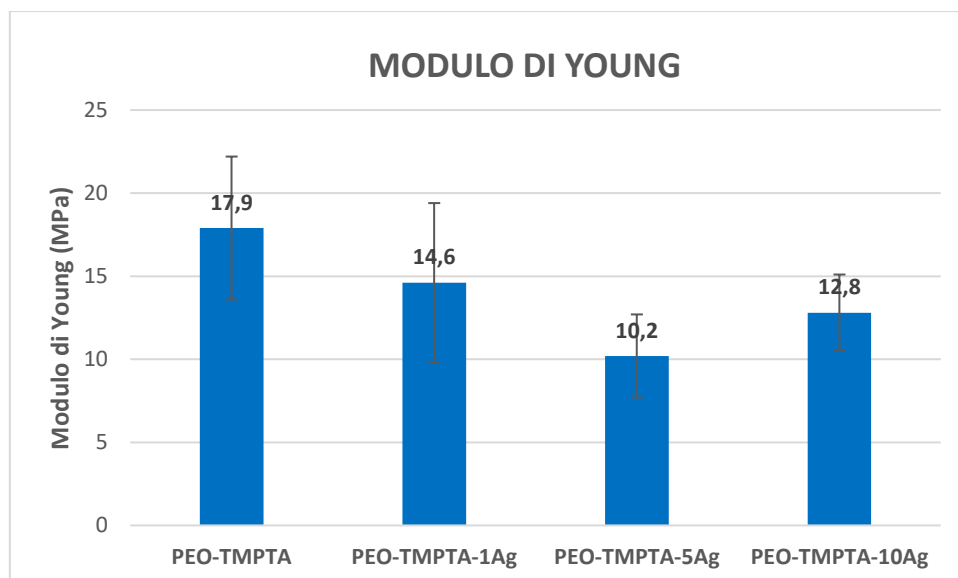


Figura 4.23: Istogramma del modulo di Modulo di Young.

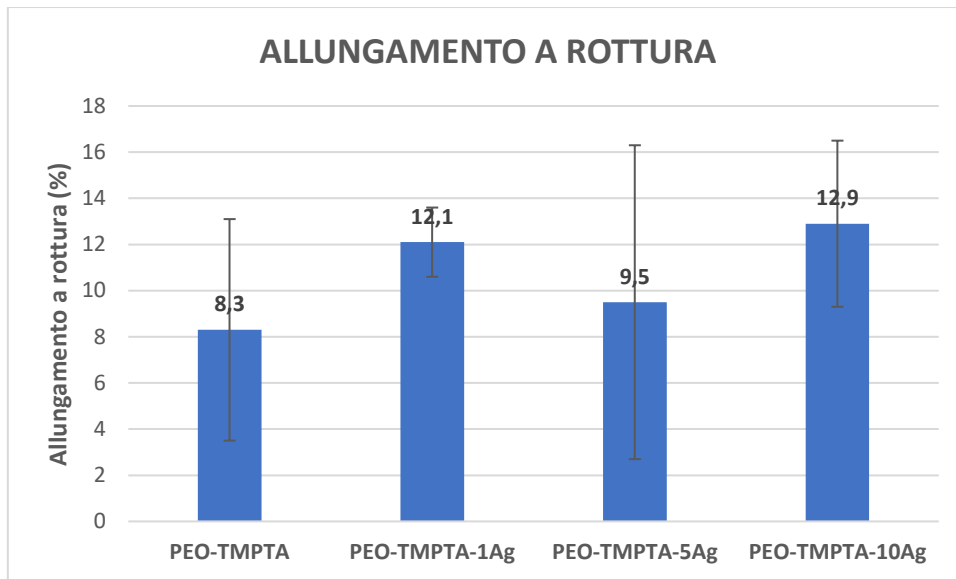


Figura 4.24: Istogramma dell'allungamento a rottura.

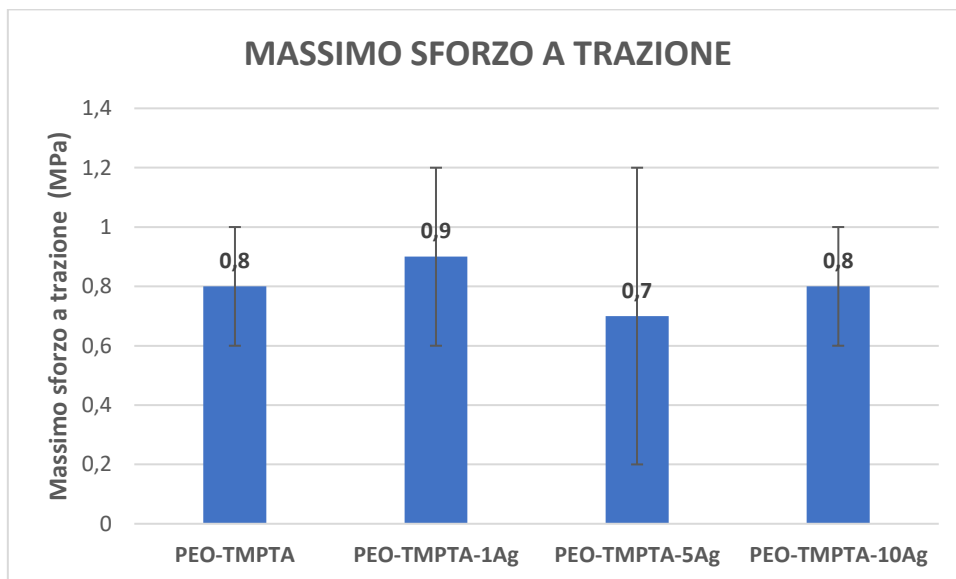


Figura 4.25: Istogramma del massimo sforzo a trazione.

Considerando le deviazioni standard, i valori delle proprietà meccaniche studiate per ogni tipologia di membrana sono uniformi tra loro, dunque possiamo concludere che la presenza delle particelle di argento non influenza le proprietà meccaniche.

Oltre a ciò, sono state condotte anche delle prove preliminari, per valutare l'effetto dei diversi parametri di processo (tensione e flusso), del diverso spessore sulle proprietà meccaniche. Inoltre, sono stati effettuati dei test per valutare come si comporta uno stesso provino al secondo sforzo meccanico.

Si è studiato, dunque, se il diverso spessore avesse influenza sulle proprietà meccaniche. Sono stati confrontati 3 campioni PEO-TMPTA-10Ag, con spessori di $(25\pm 5)\ \mu\text{m}$, $35\mu\text{m}$ e $(57\pm 3)\mu\text{m}$. I risultati sono mostrati in Figura 4.26, Figura 4.27 e Figura 4.28.

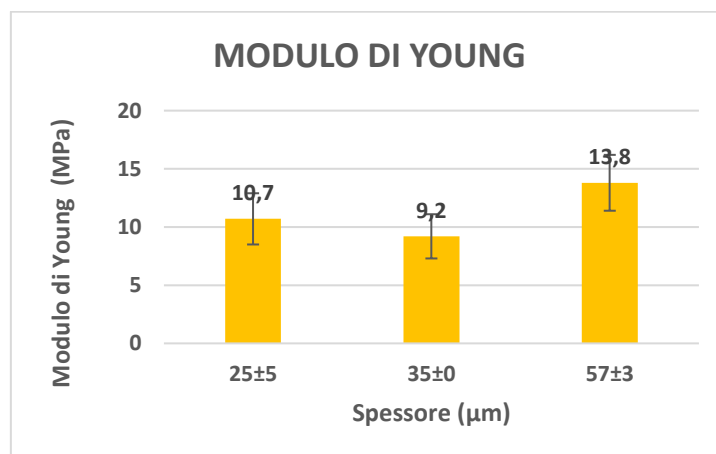


Figura 4.26: Istogramma del modulo di Modulo di Young per un campione PEO-TMPTA-10Ag, ottenuto a diversi spessori.

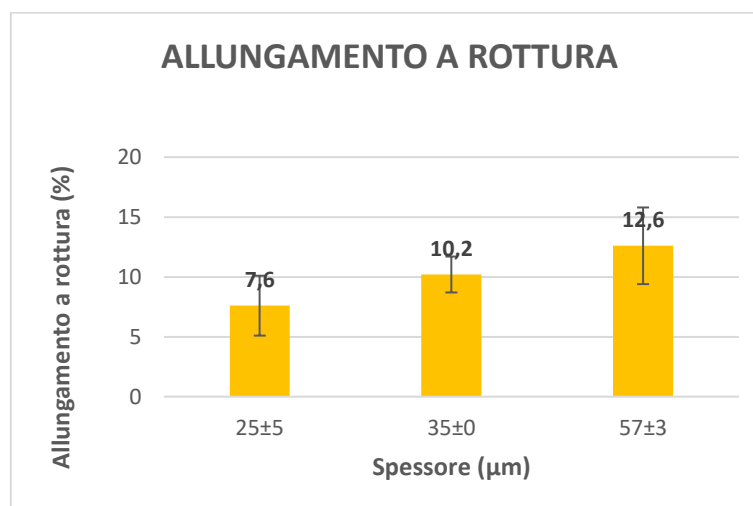


Figura 4.27: Istogramma dell'allungamento a rottura per un campione PEO-TMPTA-10Ag, ottenuto a diversi spessori.

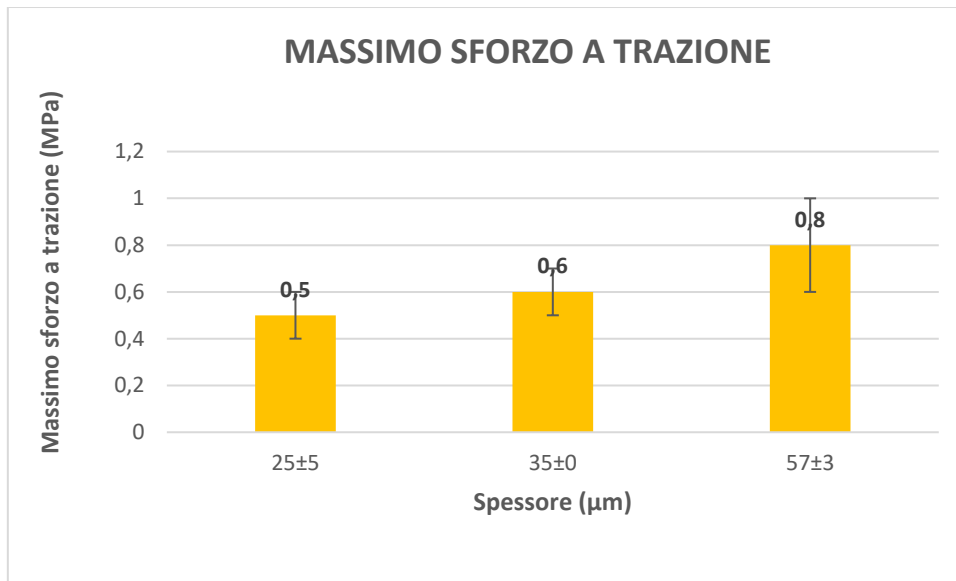


Figura 4.28: Istogramma del massimo sforzo a trazione per un PEO-TMPTA-10Ag, ottenuto a diversi spessori.

Come si può osservare dalla Figura 4.26, aumentando lo spessore da $(25 \pm 5) \mu\text{m}$ ad $35 \mu\text{m}$, il modulo di Young non varia; al contrario, con uno spessore di $(57 \pm 3) \mu\text{m}$ si osserva un incremento di tale grandezza. Per quanto riguarda l'allungamento a rottura (Figura 4.27) e il massimo sforzo a trazione (Figura 4.28), considerando i valori medi, si osserva un incremento di tali grandezze all'aumentare dello spessore; tuttavia, la presenza degli errori non ci permette di poter confermare questa conclusione.

Si è studiato inoltre come variassero le proprietà meccaniche al variare dei parametri di processo. Sono stati testati 2 campioni PEO-TMPTA ottenuti rispettivamente alla tensione di 17,5 kV, 0,10 ml/h, spessore di $(105 \pm 15) \mu\text{m}$ e 14 kV, 0,15 ml/h, spessore di $(51 \pm 11) \mu\text{m}$. I risultati sono mostrati in Figura 4.29, 4.30 e 4.31.

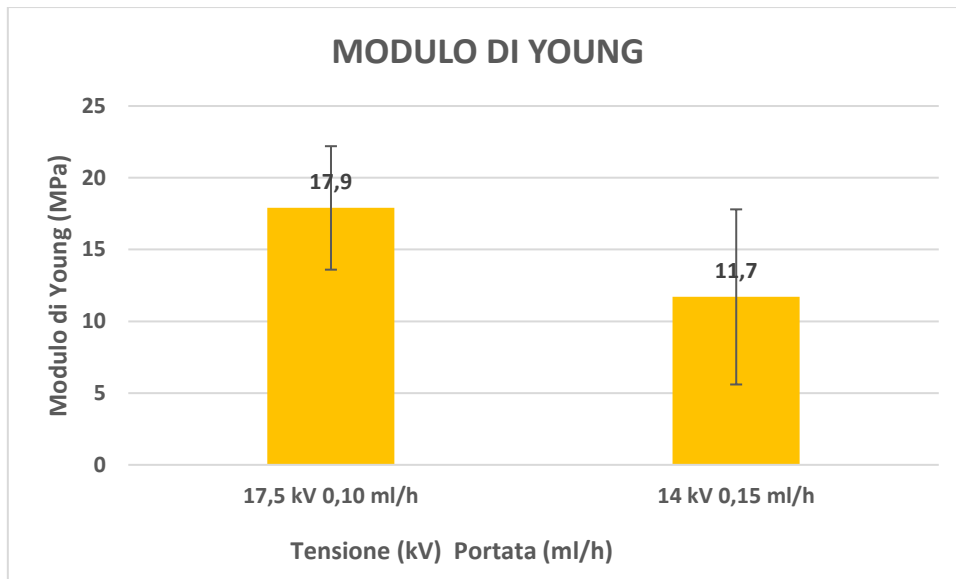


Figura 4.29: Istogramma del modulo di Modulo di Young per un campione PEO-TMPTA, ottenuto in condizioni di processo differente.

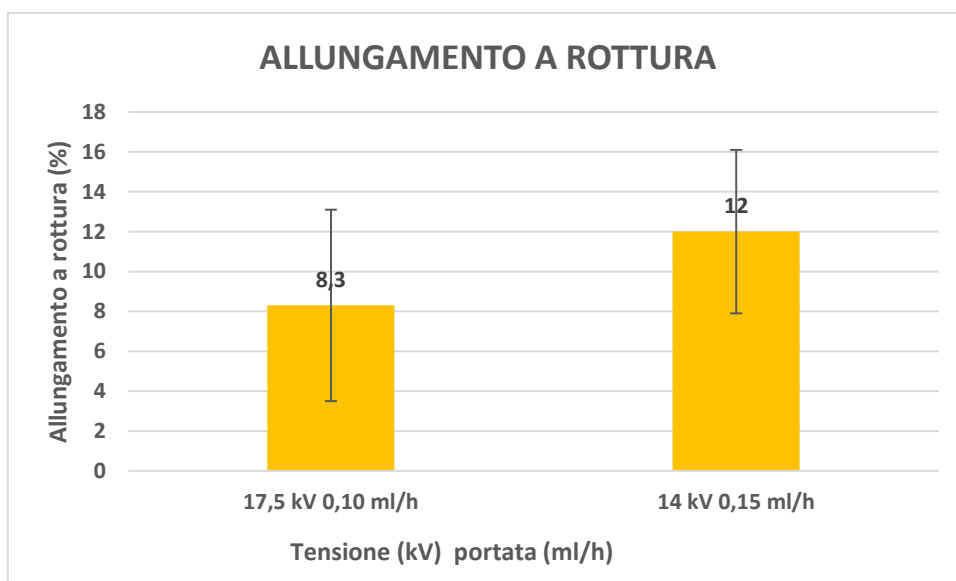


Figura 4.30: Istogramma dell'allungamento a rottura per un campione PEO-TMPTA, ottenuto in condizioni di processo differente.

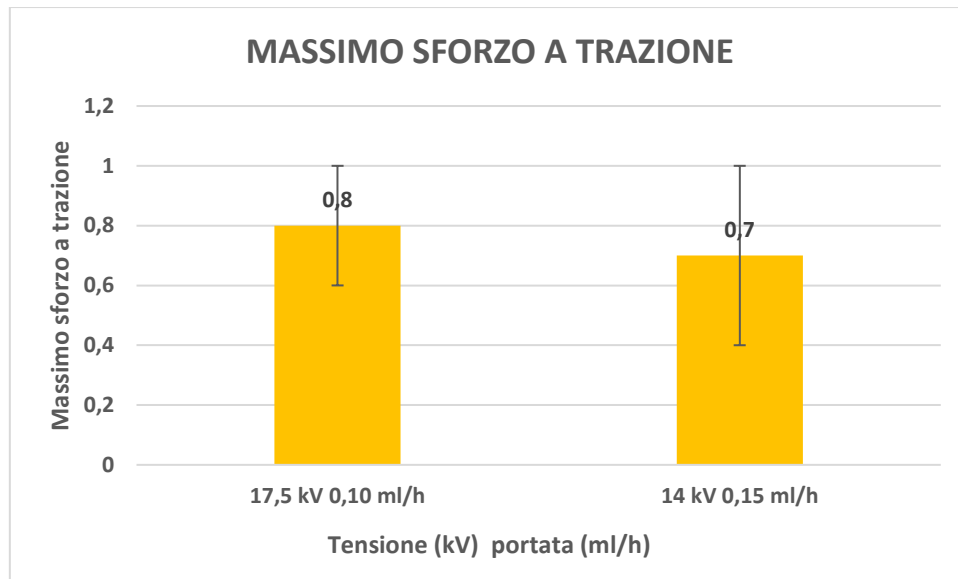


Figura 4.31: Istogramma del massimo sforzo a trazione per un campione PEO-TMPTA, ottenuto in condizioni di processo differente.

Per quanto riguarda il modulo di Young (Figura 4.29), considerando i valori medi, il campione filato a 17,5 kV e 0,10 ml/h presenta un valore maggiore rispetto al campione ottenuto a 14 kV e 0,15 ml/h. Dunque, diminuendo la tensione e incrementando la portata il valore del modulo di Young è diminuito. Questo risultato trova una spiegazione dalla letteratura e dalle formule della meccanica. Alcuni studi hanno infatti dimostrato come flussi elevati portino ad un aumento del diametro delle fibre, mentre un aumento della tensione applicata corrisponde a una riduzione del diametro [5]. Dunque, aumentando la portata e diminuendo la tensione il diametro aumenta, così come l'area della fibra. Come è noto dalle formule, il modulo di Young è direttamente proporzionale allo sforzo ($E = \sigma / \epsilon$), il quale è inversamente proporzionale all'area ($\sigma = \text{carico} / \text{Area}$), da cui risulta che il modulo di elasticità diminuisce all'aumentare della sezione della fibra. In conclusione, la teoria prevede una diminuzione del modulo di Young, quando diminuisce il diametro della fibra, ovvero quando si abbassa la tensione e si aumenta la portata. La teoria, dunque, spiegherebbe la diminuzione del valore medio del modulo di Young dei campioni filati ad 14 kV e 0,15 ml/h rispetto a quelli ottenuti a 17,5 kV e 0,10 ml/h.

Per quanto riguarda invece l'allungamento a rottura (Figura 4.30), il valor medio di tale grandezza risulta essere superiore per i campioni filati a 14 kV e 0,15 ml/h; tuttavia, la presenza della deviazione standard ci porta a concludere che tale grandezza non varia nei due casi.

Infine, per quanto riguarda il massimo sforzo a trazione (Figura 4.31) i valori ottenuti nei due casi sono sostanzialmente gli stessi.

Infine, si è voluto studiare come variassero le proprietà meccaniche, andando a sottoporre lo stesso campione a due prove di trazione consecutive: il campione dopo essere stato sotto al primo test meccanico, è stato nuovamente testato. I risultati sono mostrati in Figura 4.32, Figura 4.33 e Figura 4.34

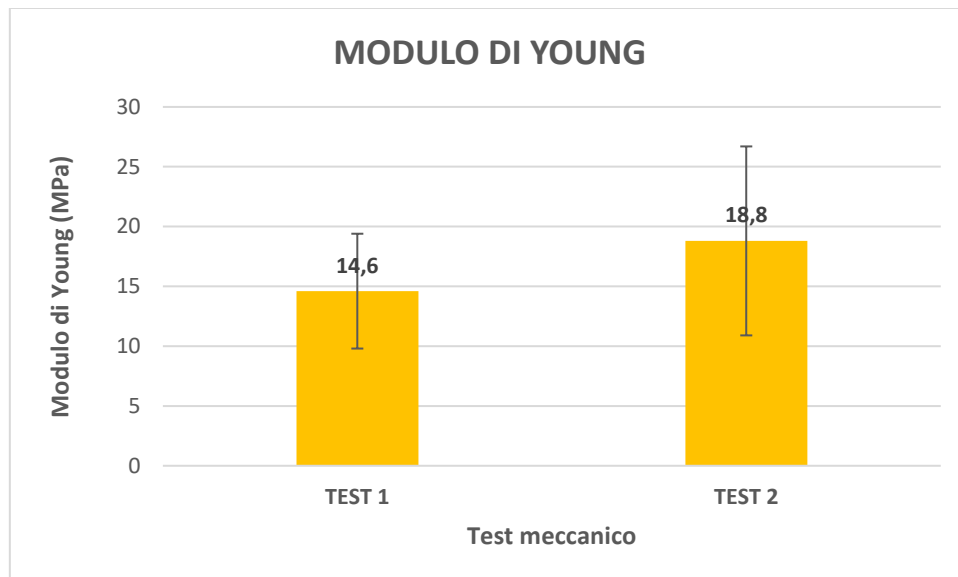


Figura 4.32: Istogramma del modulo di Young per un campione PEO-TMPTA-IAg, testato consecutivamente. In ascissa è riportato il test meccanico: TEST 1 (campione sottoposto al primo test di trazione), TEST 2 (campione testato dopo essere stato sottoposto al TEST 1).

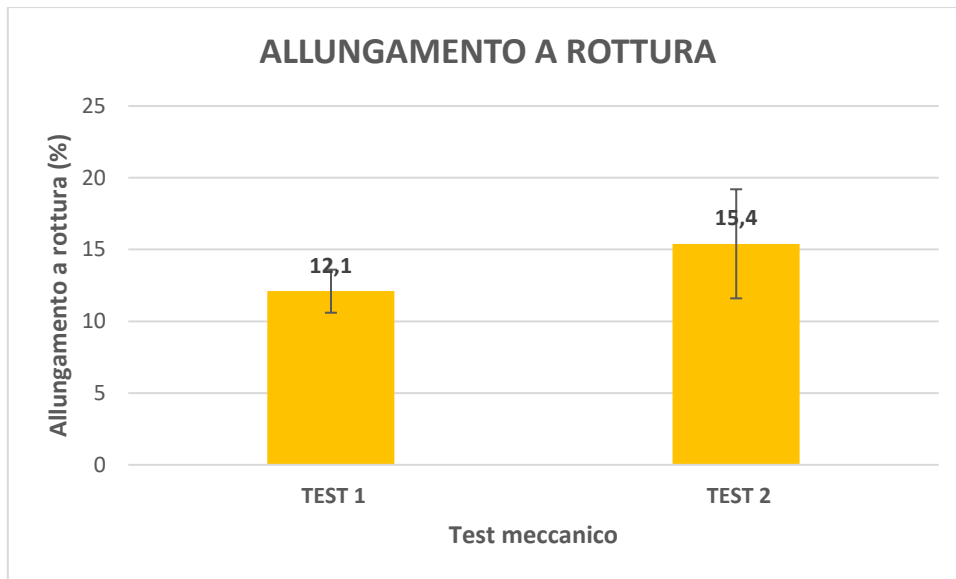


Figura 4.33: Istogramma dell'allungamento a rottura per lo stesso campione PEO-TMPTA-IAg, testato consecutivamente. In ascissa è riportato il test meccanico: TEST 1 (campione sottoposto al primo test di trazione), TEST 2 (campione testato dopo essere stato sottoposto al TEST 1).

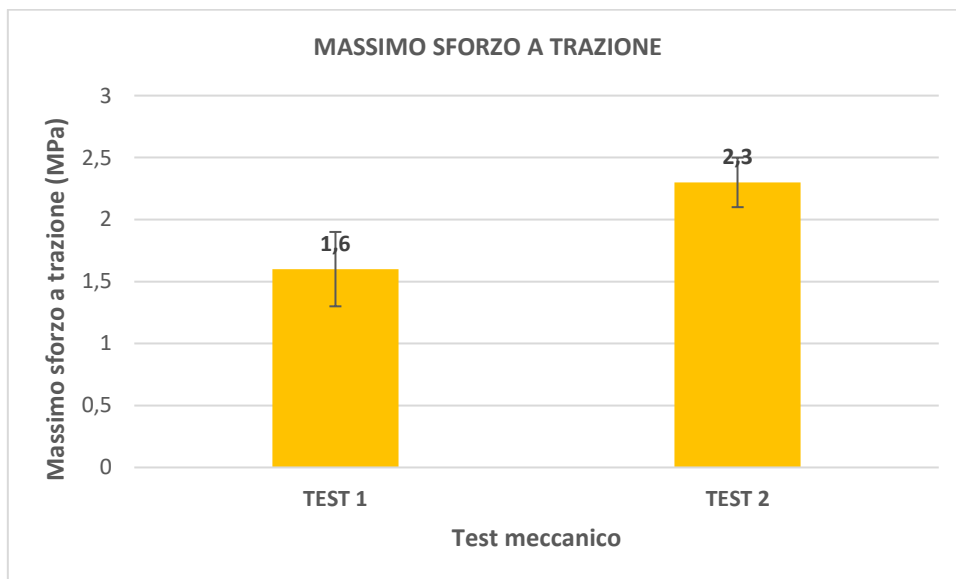


Figura 4.34: Istogramma del massimo sforzo a trazione per lo stesso campione PEO-TMPTA-IAg testato consecutivamente. In ascissa è riportato il test meccanico: TEST 1 (campione sottoposto al primo test di trazione), TEST 2 (campione testato dopo essere stato sottoposto al TEST 1).

Gli istogrammi mostrati nelle Figure 4.32, 4.33 e 4.34 mostrano un aumento delle grandezze meccaniche, a seguito del secondo sforzo meccanico. Questo comportamento può essere spiegato ipotizzando principalmente un maggior allineamento delle fibre della membrana dopo la prima prova

di trazione, unito secondariamente ad un possibile ri-allineamento delle catene polimeriche all'interno della fibra. Quest'ultimo fenomeno è meglio conosciuto come 'Stiro a freddo' o Cold drawing.

L'aumento delle grandezze meccaniche a seguito del secondo sforzo di trazione è stato verificato anche su un provino PEO-TMPTA-10Ag(Tabella 4.7).

	TEST 1	TEST 2
MODULO DI YOUNG (MPa)	8,9	10,5
ALLUNGAMENTO A ROTTURA (%)	13,3	19,4
MASSIMO SFORZO A TRAZIONE (MPa)	1,1	1,6

Tabella 4.7: Grandezze meccaniche per un provino PEO-TMPTA-10Ag, sottoposto a 2 prove meccaniche consecutive. Con TEST 1 si identifica la prima prova di trazione, mentre con TEST 2 la seconda prova di trazione.

4.6 Test antibatterici

Ogni tipologia di membrana, una volta aver ricevuto un dose di 36 J/cm^2 , è stata sottoposta al test di Kirby Bauer, per valutare l'efficacia antibatterica, mediante la misura dell'alone di inibizione (Figura 4.34), utilizzando un batterio Gram-positivo, *Staphylococcus Aureus* e un batterio Gram- negativo, *Escherichia Coli* (Figura 4.35).

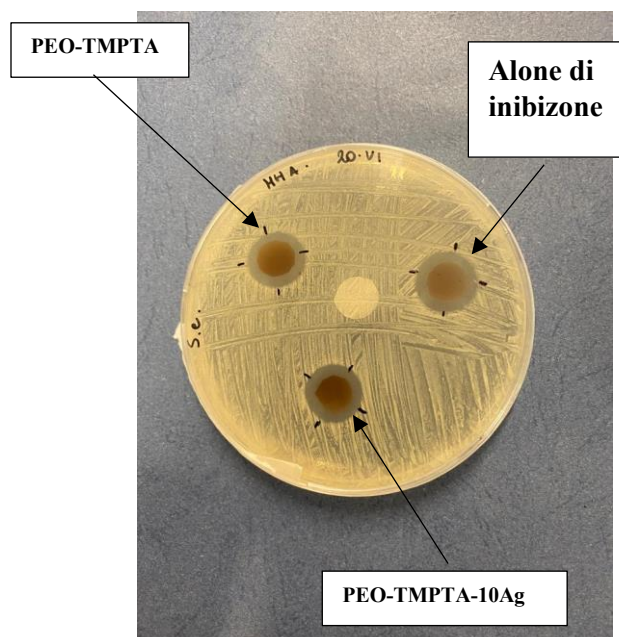


Figura 4.35: Esempio di antibiogramma eseguito con la metodica di Agar-diffusione, effettuato su campioni circolari di 1 cm di diametro.

I risultati sono mostrati in tabella 4.8 e la corrispettiva rappresentazione in istogrammi è mostrata in Figura 4.36 e Figura 4.37.

Campione	Diametro medio dell'alone di inibizione (mm) (media± dev.std)	
	<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>
PEO-TMPTA	0 ± 0	0 ± 0
PEO-TMPTA-1Ag	13,2±2,2	-
PEO-TMPTA-5Ag	22,7±2,3	-
PEO-TMPTA-10Ag	15,3 ± 0,8	12,7 ± 0,5

Tabella 4.8: diametri medi dell'alone di inibizione (mm) (media ± deviazione standard), calcolati su *S. Aureus* e *E. Coli* (Risultati del test di Kirby- Bauer).

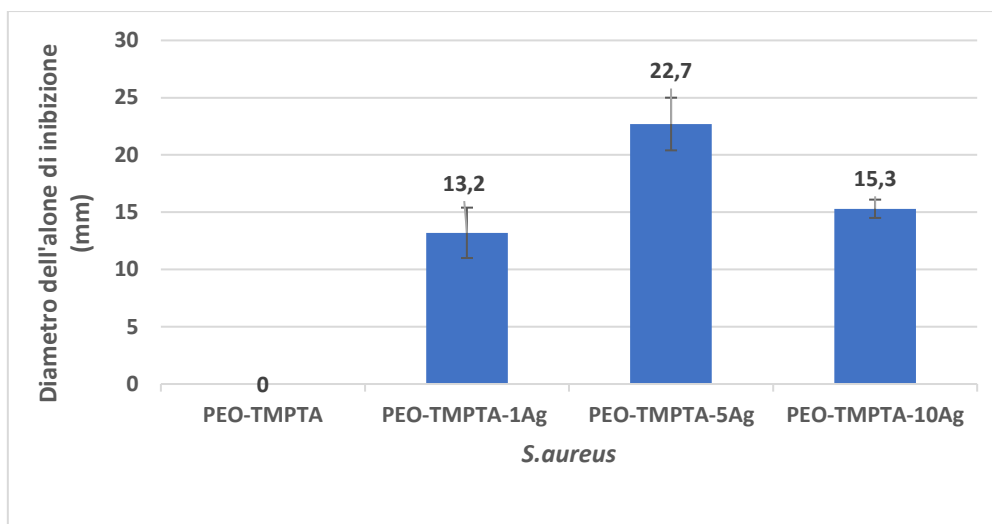


Figura 4.36: istogramma del diametro medio dell'alone di inibizione (mm) (Risultati del test di Kirby-Bauer per il batterio *S.aureus*).

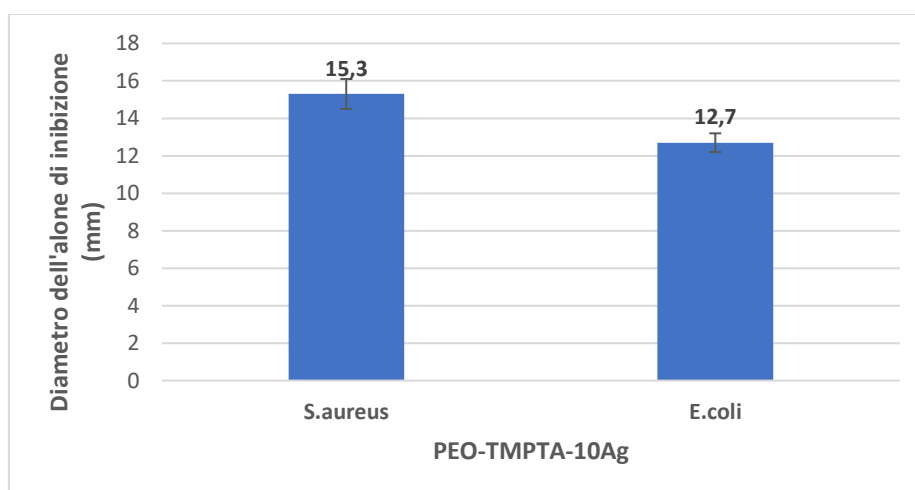


Figura 4.37: istogramma del diametro medio dell'alone di inibizione (mm), calcolati sul campione PEO-TMPTA-10Ag (Risultati del test di Kirby-Bauer per *S.aureus* e *E.coli*).

La tabella 4.8 e la Figura 4.36 mostrano che i campioni PEO-TMPTA non hanno una regione di inibizione; dunque, i batteri non sono sensibili a tale membrana. Al contrario, gli altri campioni mostrano proprietà antibatteriche, conferite dalle particelle di argento, verso il batterio *S.aureus*, che risulta maggiormente sensibile ai campioni PEO-TMPTA-5Ag.

Invece considerando anche il batterio *E.coli*, è emerso per i campioni PEO-TMPTA-10Ag una maggior efficacia antibatterica contro il Gram-positivo rispetto al Gram-negativo (Figura 4.37). Come riportato in letteratura[76], sebbene i batteri Gram-positivi abbiano uno strato peptidoglicano più spesso nella loro parete cellulare, essi sono più suscettibili alle sostanze chimiche rispetto ai Gram-negativi. Questo spiegherebbe la maggior sensibilità del batterio *S.aureus* ai campioni PEO-TMPTA-10Ag.

Capitolo 5

Conclusioni

Per lo scopo di questa tesi sono state realizzate, mediante electrospinning, delle membrane nanofibrose, inglobanti particelle di argento, partendo da soluzioni a base PEO con diverse quantità di nitrato di argento (1, 5, 10 wt% rispetto al peso del PEO).

Le membrane ottenute sono state irradiate con luce UV inducendo così la reticolazione delle catene di PEO e la generazione delle particelle di argento.

Le immagini FESEM hanno rilevato la presenza di particelle ed aggregati e tramite la spettroscopia EDX e UV-Vis è stato possibile confermare che fossero d'argento.

Inoltre, le analisi al FESEM hanno evidenziato come la morfologia e il diametro delle fibre non siano dipendenti dalle diverse concentrazioni di nitrato di argento.

I test meccanici hanno dimostrato che l'aggiunta di nanoparticelle di Ag non influenzano significativamente il modulo di Young, l'allungamento a rottura e il massimo sforzo a trazione.

Infine, i test antibatterici sul batterio Gram-positivo *S. aureus* hanno rivelato che le particelle di argento conferiscono proprietà antibatteriche alle nanofibre, in particolare modo alle membrane PEO-TMPTA-5Ag.

Inoltre, sono in fase di sperimentazione test antibatterici su batteri Gram-negativi di *E. coli* e test di biocompatibilità. Sebbene questi test siano ancora in fase preliminare, è emerso che le membrane PEO-TMPTA e PEO-TMPTA-5 Ag non sono citotossiche e che quelle PEO-TMPTA-10 Ag hanno proprietà antibatteriche anche verso i batteri *Gram negativi*.

Quest'ultimi risultati rendono molto promettente l'impiego, in ambito biomedico, delle nanofibre a base PEO inglobanti particelle di argento, nella produzione di biomateriali antibatterici ad ampio spettro.

Le membrane oggetto di studio, inibendo la proliferazione batterica, potrebbero essere utilizzate come rivestimenti di tessuti e dispositivi medici, che prevedono il contatto con microorganismi patogeni, impiegati nella guarigione delle ferite.

Bibliografia

- [1] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 63, no. 15, pp. 2223–2253, 2003, doi: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.
- [2] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [3] "National Nanotechnology Initiative." <https://www.nano.gov/> (accessed Apr. 04, 2022).
- [4] M. J. Nalbandian, "Development and Optimization of Chemically-Active Electrospun Nanofibers for Treatment of Impaired Water Sources," California Baptist University, Doctoral thesis, 2014.
- [5] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, and Y. Xia, "Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications," *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 8, pp. 5298–5415, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.
- [6] F. E. Ahmed, B. S. Lalia, and R. Hashaiekeh, "A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications," *Desalination*, vol. 356, pp. 15–30, 2015, doi: 10.1016/j.desal.2014.09.033.
- [7] F. Xu, I. Gough, J. Dorogin, H. Sheardown, and T. Hoare, "Nanostructured degradable macroporous hydrogel scaffolds with controllable internal morphologies via reactive electrospinning," *Acta Biomater.*, vol. 104, pp. 135–146, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.038.
- [8] S. Rajam and C. C. Ho, "Graft coupling of PEO to mixed cellulose esters microfiltration membranes by UV irradiation," *J. Memb. Sci.*, vol. 281, no. 1–2, pp. 211–218, 2006, doi: 10.1016/j.memsci.2006.03.034.
- [9] A. Aqil *et al.*, "PEO coated magnetic nanoparticles for biomedical application," *Eur. Polym. J.*, vol. 44, no. 10, pp. 3191–3199, 2008, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2008.07.011.
- [10] S. Fusco, A. Borzacchiello, and P. A. Netti, "Perspectives on: PEO-PPO-PEO triblock copolymers and their biomedical applications," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 21, no. 2, pp. 149–164, 2006, doi: 10.1177/0883911506063207.
- [11] F. E. BAILEY and J. V. KOLESKE, "Solution Properties of Poly(Ethylene Oxide)," in *Poly(ethylene Oxide)*, 1976, pp. 29–86.

- [12] P. Kianfar, A. Vitale, S. Dalle Vacche, and R. Bongiovanni, “Enhancing properties and water resistance of PEO-based electrospun nanofibrous membranes by photo-crosslinking,” *J. Mater. Sci.*, vol. 56, no. 2, pp. 1879–1896, 2021, doi: 10.1007/s10853-020-05346-3.
- [13] G. Fredi, P. Kianfar, S. Dalle Vacche, A. Pegoretti, and A. Vitale, “Electrospun shape-stabilized phase change materials based on photo-crosslinked polyethylene oxide,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 17, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3390/polym13172979.
- [14] R. Sahay, V. Thavasi, and S. Ramakrishna, “Design modifications in electrospinning setup for advanced applications,” *J. Nanomater.*, vol. 2011, pp. 1–17, 2011, doi: 10.1155/2011/317673.
- [15] W. E. Teo and S. Ramakrishna, “A review on electrospinning design and nanofibre assemblies,” *Nanotechnology*, vol. 17, no. 14, 2006, doi: 10.1088/0957-4484/17/14/R01.
- [16] C. Zhou, Q. Wang, and Q. Wu, “UV-initiated crosslinking of electrospun poly(ethylene oxide) nanofibers with pentaerythritol triacrylate: Effect of irradiation time and incorporated cellulose nanocrystals,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 2, pp. 1779–1786, 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.095.
- [17] S. E. Sloop, M. M. Lerner, T. S. Stephens, A. L. Tipton, D. G. Paull, and J. D. Stenger-Smith, “Cross-Linking Poly (ethylene oxide) and Poly [oxymethylene-oligo (oxyethylene)] with Ultraviolet Radiation,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 53, pp. 1563–1572, 1994.
- [18] M. Şimşek, S. Çakmak, and M. Gümüşderelioğlu, “Insoluble poly(ethylene oxide) nanofibrous coating materials: effects of crosslinking conditions on the matrix stability,” *J. Polym. Res.*, vol. 23, no. 11, 2016, doi: 10.1007/s10965-016-1127-x.
- [19] Odian, *Principles of Polymerization*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2004.
- [20] M. Doytcheva, R. Stamenova, V. Zvetkov, and C. B. Tsvetanov, “U.V. irradiation-induced crosslinking of solid poly(ethylene oxide) modified with tetraalkyl ammonium salt,” *Polymer (Guildf)*, vol. 39, no. 26, pp. 6715–6721, 1998, doi: 10.1016/S0032-3861(98)00133-5.
- [21] A. Reiser, *Photoreactive Polymers*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, 1989.
- [22] H. F. Gruber, *Photoinitiators for free radical polymerization*, vol. 17, no. 6. 1992.
- [23] P. F. Jacobs, *Rapid Prototyping & Manufacturing*. New York, NY, USA, 1992.
- [24] S. H. Emami and R. Salovey, “Crosslinked Poly (ethylene oxide) Hydrogels,” no. May, 2002.
- [25] T. J. Sill and H. A. von Recum, “Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.

- [26] S. Kalakkunnath, D. S. Kalika, H. Lin, R. D. Raharjo, and B. D. Freeman, “Molecular relaxation in cross-linked poly(ethylene glycol) and poly(propylene glycol) diacrylate networks by dielectric spectroscopy,” *Polymer (Guildf)*, vol. 48, no. 2, pp. 579–589, 2007, doi: 10.1016/j.polymer.2006.11.046.
- [27] E. Karadağ and D. Saraydin, “Swelling studies of super water retainer acrylamide/crotonic acid hydrogels crosslinked by trimethylolpropane triacrylate and 1,4-butanediol dimethacrylate,” *Polym. Bull.*, vol. 48, no. 3, pp. 299–307, 2002, doi: 10.1007/s00289-002-0029-8.
- [28] Ö. B. Üzümlü and E. Karadağ, “Swelling characterization of poly (acrylamide-co-N-vinylimidazole) hydrogels crosslinked by TMPTA and semi-IPN’s with PEG,” *J. Polym. Res.*, vol. 14, no. 6, pp. 483–488, 2007, doi: 10.1007/s10965-007-9132-8.
- [29] M. Gandolfo, F. Bella, and J. G. N. Amici, “Elettroliti gel polimerici per batterie al potassio : sviluppo e caratterizzazione,” Politecnico di Torino, Tesi di laurea magistrale, 2021.
- [30] F. Paquin, J. Rivnay, A. Salleo, N. Stingelin, and C. Silva, “Designing Electrospun Nanofiber Mats to Promote Wound Healing – A Review,” *J. Mater. Chem. C*, vol. 3, no. 207890, pp. 10715–10722, 2015, doi: 10.1039/b000000x.
- [31] M. B. Kimberly Artounian, Nour Bundogji, Erika Hoss, “Applications of Gold and Silver Nanoparticles in the Treatment of Acne Vulgaris: A Systematic Review,” *J. drugs dermatology*, 2021, Accessed: Jul. 31, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34076399/>.
- [32] J. B. Krajewska, O. Długosz, M. Sałaga, M. Banach, and J. Fichna, “Silver nanoparticles based on blackcurrant extract show potent anti-inflammatory effect in vitro and in DSS-induced colitis in mice,” *Int. J. Pharm.*, vol. 585, no. June, 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119549.
- [33] F. Asgharzadeh *et al.*, “Therapeutic effects of silver nanoparticle containing sulfasalazine on DSS-induced colitis model,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 61, no. August 2020, p. 102133, 2021, doi: 10.1016/j.jddst.2020.102133.
- [34] P. L. Nadworny, J. F. Wang, E. E. Tredget, and R. E. Burrell, “Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 241–251, 2008, doi: 10.1016/j.nano.2008.04.006.
- [35] H. H. Lara, N. V. Ayala-Nuñez, L. Ixtepan-Turrent, and C. Rodriguez-Padilla, “Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 8, pp. 1–10, 2010, doi: 10.1186/1477-3155-8-1.

- [36] Z. Zhang, D. Li, X. Wang, Y. Wang, J. Lin, and S. Jiang, “Rapid detection of viruses: Based on silver nanoparticles modified with bromine ions and acetonitrile,” *Chem. Eng. J.*, no. January, 2020.
- [37] W. Lesniak *et al.*, “Labeling cells with silver/dendrimer nanocomposites,” *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, vol. 845, no. January, pp. 327–332, 2005, doi: 10.1557/proc-845-aa5.37.
- [38] S. P. Tai *et al.*, “Molecular imaging of cancer cells using plasmon-resonant-enhanced third-harmonic-generation in silver nanoparticles,” *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 24, pp. 4520–4523, 2007, doi: 10.1002/adma.200602213.
- [39] M. Radetić, “Functionalization of textile materials with silver nanoparticles,” *J. Mater. Sci.*, vol. 48, no. 1, pp. 95–107, 2013, doi: 10.1007/s10853-012-6677-7.
- [40] P. Lackner *et al.*, “Efficacy of silver nanoparticles-impregnated external ventricular drain catheters in patients with acute occlusive hydrocephalus,” *Neurocrit. Care*, vol. 8, no. 3, pp. 360–365, 2008, doi: 10.1007/s12028-008-9071-1.
- [41] K. Chaloupka, Y. Malam, and A. M. Seifalian, “Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 11, pp. 580–588, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.07.006.
- [42] R. Bayston, W. Ashraf, and L. Fisher, “Prevention of infection in neurosurgery: role of ‘antimicrobial’ catheters,” *J. Hosp. Infect.*, vol. 65, no. SUPPL. 2, pp. 39–42, 2007, doi: 10.1016/S0195-6701(07)60013-9.
- [43] R. Sakthi Devi, A. Girigoswami, M. Siddharth, and K. Girigoswami, “Applications of Gold and Silver Nanoparticles in Theranostics,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, no. 0123456789, 2022, doi: 10.1007/s12010-022-03963-z.
- [44] I. Rodrigo *et al.*, “Effectiveness of Silver Nanoparticles Deposited in Facemask Material for Neutralising Viruses,” *Nanomaterials*, pp. 1–12, 2022.
- [45] X. Chen, X. Ling, G. Liu, and J. Xiao, “Antimicrobial Coating: Tracheal Tube Application,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 17, no. March, pp. 1483–1494, 2022, doi: 10.2147/IJN.S353071.
- [46] “coating of driveline for ventricular assist devices.”
<https://www.sbir.gov/sbirsearch/detail/373798> (accessed Aug. 05, 2022).
- [47] K. Wu, Y. Yang, Y. Zhang, J. Deng, and C. Lin, “Antimicrobial activity and cytocompatibility of silver nanoparticles coated catheters via a biomimetic surface functionalization strategy,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 7241–7252, 2015, doi: 10.2147/IJN.S92307.
- [48] D. Roe, B. Karandikar, N. Bonn-Savage, B. Gibbins, and J. baptiste Roullet, “Antimicrobial

- surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 61, no. 4, pp. 869–876, 2008, doi: 10.1093/jac/dkn034.
- [49] I-F. Corporation, “FDA premarket notifications K051401.” 2005.
- [50] V. Alt, “Treatment of an infected nonunion with additional fresh fracture of the femur with a silver-coated intramedullary nail: A case report,” *Trauma Case Reports*, vol. 39, no. March, p. 100641, 2022, doi: 10.1016/j.tcr.2022.100641.
- [51] B. Li and T. Webster, “Orthopedic Applications of Silver and Silver Nanoparticles,” *Orthop. Biomater. Adv. Appl.*, pp. 1–621, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-73664-8.
- [52] S. A. Brennan, C. N. Fhoghlú, B. M. DeVitt, F. J. O’Mahony, D. Brabazon, and A. Walsh, “Instructional review: General orthopaedics silver nanoparticles and their orthopaedic applications,” *Bone Jt. J.*, vol. 97-B, no. 5, pp. 582–589, 2015, doi: 10.1302/0301-620X.97B5.33336.
- [53] M. Andara *et al.*, “Hemocompatibility of diamondlike carbon-metal composite thin films,” *Diam. Relat. Mater.*, vol. 15, no. 11-12 SPEC. ISS., pp. 1941–1948, 2006, doi: 10.1016/j.diamond.2006.05.013.
- [54] E. Vlachou, E. Chipp, E. Shale, Y. T. Wilson, R. Papini, and N. S. Moiemmen, “The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption,” *Burns*, vol. 33, no. 8, pp. 979–985, 2007, doi: 10.1016/j.burns.2007.07.014.
- [55] “ACTICOAT Smith & Nephew.” <https://www.smith-nephew.com/italia/prodotti/prodotti-per-ulcere-cutanee/per-tipologia/medicazioni-con-argento/acticoat/> (accessed Aug. 17, 2022).
- [56] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- [57] J. Jain, S. Arora, J. M. Rajwade, P. Omray, S. Khandelwal, and K. M. Paknikar, “Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial,” *Mol. Pharm.*, vol. 6, no. 5, pp. 1388–1401, 2009.
- [58] A. Kumar, P. K. Vemula, P. M. Ajayan, and G. John, “Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil,” *Nat. Mater.*, vol. 7, no. 3, pp. 236–241, 2008, doi: 10.1038/nmat2099.
- [59] “Gambaletti Relaxsan.” <https://www.relaxsan.it/calze-terapeutiche-a-compressione-graduata-relaxsan-medicale/gambaletti-terapeutici-relaxsan-medicale-silver/> (accessed Aug. 05, 2022).
- [60] V. Alt *et al.*, “An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4383–4391, 2004, doi:

- 10.1016/j.biomaterials.2003.10.078.
- [61] M. J. Zohuriaan-Mehr, H. Omidian, S. Doroudiani, and K. Kabiri, “Advances in non-hygienic applications of superabsorbent hydrogel materials,” *J. Mater. Sci.*, vol. 45, no. 21, pp. 5711–5735, 2010, doi: 10.1007/s10853-010-4780-1.
- [62] O. Nadtoka, N. Kutsevol, O. Linnik, and M. Nikiforov, “Nanocomposite Hydrogels Containing Silver Nanoparticles as Materials for Wound Dressings,” in *Springer Proceedings in Physics*, 2019, vol. 222, pp. 375–387, doi: 10.1007/978-3-030-17755-3_24.
- [63] K. Ruppert, A. Grundler, and A. Erdrich, “CA2541963A1 Patent,” 2006.
- [64] R. A. Bapat *et al.*, “An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 91, no. 2017, pp. 881–898, 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.05.069.
- [65] S. Iravani, H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi, and B. Zolfaghari, “Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods,” *Res. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 6, pp. 385–406, 2014.
- [66] T. Klaus-Joerger, R. Joerger, E. Olsson, and C. G. Granqvist, “Bacteria as workers in the living factory: Metal-accumulating bacteria and their potential for materials science,” *Trends Biotechnol.*, vol. 19, no. 1, pp. 15–20, 2001, doi: 10.1016/S0167-7799(00)01514-6.
- [67] E. Fantino *et al.*, “3D Printing of Conductive Complex Structures with in Situ Generation of Silver Nanoparticles,” *Adv. Mater.*, vol. 28, no. 19, pp. 3712–3717, 2016, doi: 10.1002/adma.201505109.
- [68] L. Lavoisier, “Le reazioni di ossido riduzione_ treccani.” pp. 1–6, [Online]. Available: https://www.treccani.it/export/sites/default/Portale/resources/multimedia/Lezioni_di_Scienze/ossidoriduzioni/Lezione_Reazioni_di_Ossidoriduzione.pdf.
- [69] H. Huang and Y. Yang, “Preparation of silver nanoparticles in inorganic clay suspensions,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 68, no. 14, pp. 2948–2953, 2008, doi: 10.1016/j.compscitech.2007.10.003.
- [70] R. Sato-Berú, R. Redón, A. Vázquez-Olmos, and J. M. Saniger, “Silver nanoparticles synthesized by direct photoreduction of metal salts. Application in surface-enhanced Raman spectroscopy,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 40, no. 4, pp. 376–380, 2009, doi: 10.1002/jrs.2135.
- [71] S. K. Ghosh, S. Kundu, M. Mandal, S. Nath, and T. Pal, “Studies on the evolution of silver nanoparticles in micelle by UV-photoactivation,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 5, no. 5–6, pp. 577–587, 2003, doi: 10.1023/B:NANO.0000006100.25744.fa.

- [72] L. Huang *et al.*, “UV-induced synthesis, characterization and formation mechanism of silver nanoparticles in alkalic carboxymethylated chitosan solution,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 10, no. 7, pp. 1193–1202, 2008, doi: 10.1007/s11051-007-9353-0.
- [73] H. Penchev, D. Paneva, N. Manolova, and I. Rashkov, “Hybrid nanofibrous yarns based on N-carboxyethylchitosan and silver nanoparticles with antibacterial activity prepared by self-bundling electrospinning,” *Carbohydr. Res.*, vol. 345, no. 16, pp. 2374–2380, 2010, doi: 10.1016/j.carres.2010.08.014.
- [74] J. D. Schiffman, Y. Wang, E. P. Giannelis, and M. Elimelech, “Biocidal activity of plasma modified electrospun polysulfone mats functionalized with polyethyleneimine-capped silver nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 27, no. 21, pp. 13159–13164, 2011, doi: 10.1021/la202605z.
- [75] X. Wang, F. Cheng, J. Gao, and L. Wang, “Antibacterial wound dressing from chitosan/polyethylene oxide nanofibers mats embedded with silver nanoparticles,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 29, no. 8, pp. 1086–1095, 2014, doi: 10.1177/0885328214554665.
- [76] I. Kohsari, Z. Shariatnia, and S. M. Pourmortazavi, “Antibacterial electrospun chitosan-polyethylene oxide nanocomposite mats containing bioactive silver nanoparticles,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 140, pp. 287–298, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.12.075.
- [77] M. He *et al.*, “Electrospun silver nanoparticles-embedded feather keratin/poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene oxide) antibacterial composite nanofibers,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 2, 2020, doi: 10.3390/polym12020305.
- [78] O. Bozkaya, E. Arat, Z. Gün Gök, M. Yiğitoğlu, and İ. Vargel, “Production and characterization of hybrid nanofiber wound dressing containing *Centella asiatica* coated silver nanoparticles by mutual electrospinning method,” *Eur. Polym. J.*, vol. 166, no. January, 2022, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111023.
- [79] R. S. Gupta, “Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 4, pp. 1435–1491, 1998, doi: 10.1128/mubr.62.4.1435-1491.1998.
- [80] P. Kianfar, R. Bongiovanni, and A. Vitale, “Nanofibrous polymeric membranes by coupling electrospinning and photo-induced crosslinking,” Turin Polytechnic, Doctoral thesis, 2022.
- [81] F. Brako, B. Raimi-Abraham, S. Mahalingam, D. Q. M. Craig, and M. Edirisinghe, “Making nanofibres of mucoadhesive polymer blends for vaginal therapies,” *Eur. Polym. J.*, vol. 70, no. July, pp. 186–196, 2015, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.07.006.
- [82] T. Wen-Dong, H. Guang-Jian, H. Wei-Tao, Z. Xin-Liang, C. Xian-Wu, and Y. Xiao-Chun,

- “The reactive compatibilization of PLA/PP blends and improvement of PLA crystallization properties induced by in situ UV irradiation,” *CrystEngComm*, vol. 23, no. 4, pp. 864–875, 2021, doi: 10.1039/d0ce01445a.
- [83] D. Ghosh, D. G. Dastidar, D. Banerjee, and S. Chatterjee, “PH-Triggered in-situ release of silver nanoparticle in hydrogel for topical applications,” *Biomed. Phys. Eng. Express*, vol. 5, no. 6, 2019, doi: 10.1088/2057-1976/ab4382.
- [84] D. Preetha, R. Arun, P. Kumari, and C. Aarti, “Synthesis and characterization of silver nanoparticles using cannonball leaves and their cytotoxic activity against MCF-7 cell line,” *J. Nanotechnol.*, vol. 2013, pp. 1–5, 2013.