



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

a.a. 2023/2024

Sessione di Laurea Dicembre 2024

Sviluppo di rivestimenti con proprietà antimicrobiche mediante modifiche chimico/fisiche di precursori polimerici preceramici funzionalizzati con nanoparticelle inorganiche

Relatori

Prof.ssa Cristina BALAGNA

Dr. Francesca GATTUCCI

Candidato

Basilio RICCIARDELLO

296276

Sommario

Le contaminazioni batteriche continuano a rappresentare una sfida importante per la salute pubblica, sia per la resistenza agli antibiotici identificata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come una delle maggiori minacce globali, sia per la rapida diffusione di malattie e infezioni dovute alla presenza dei batteri.

In questo scenario i nanomateriali sono una strategia innovativa e promettente per contrastare batteri, virus e funghi. Tra questi, le nanoparticelle di argento (AgNPs) sono particolarmente interessanti per il loro elevato potenziale antibatterico. Le AgNPs agiscono interagendo con le membrane cellulari dei batteri, compromettendone l'integrità e inibendo funzioni cellulari fondamentali come la sintesi proteica e la replicazione del DNA.

L'obiettivo principale di questo studio di tesi è stato lo sviluppo e la caratterizzazione di un rivestimento composito con proprietà antibatteriche, basato su un precursore polimerico della silice, il Durazane 1800, funzionalizzato con nanoparticelle di silice ($n\text{SiO}_2$) decorate con nanoparticelle di argento (AgNPs). Il Durazane 1800 è stato scelto per le sue eccellenti caratteristiche di adesione e la capacità di formare strutture porose stabili alle alte temperature, essenziali per ottimizzare la funzionalità del rivestimento.

Il lavoro iniziale si è concentrato sulla realizzazione del rivestimento composito, disperdendo le nanopolveri di $n\text{SiO}_2$ -AgNPs, precedentemente sintetizzate presso il laboratorio GLANCE, all'interno della matrice polimerica di Durazane 1800. Dopo appropriati trattamenti termici, sono stati ottenuti rivestimenti con diverse proprietà. Successivamente, sono state testate varie condizioni di preparazione e deposizione dei coating su differenti substrati, studiandone le caratteristiche attraverso tecniche di analisi morfologica, composizionale e prove di attività antibatterica.

I risultati dei test iniziali hanno evidenziato che, nonostante la buona dispersione delle nanoparticelle all'interno della matrice, la struttura densa del rivestimento non garantiva un'esposizione efficace delle AgNPs verso l'esterno, inibendo l'effetto antibatterico dovuto sia alle nanoparticelle stesse che agli ioni argento che solitamente vengono rilasciati.

Alla luce di queste osservazioni, la seconda parte del lavoro di tesi si è orientata verso la valutazione di un nuovo approccio, combinando il Durazane 1800 con il polivinilpirrolidone (PVP), il quale è stato utilizzato come "filler sacrificale", al fine di migliorare la porosità del rivestimento e favorire una distribuzione più efficace delle $n\text{SiO}_2$ -AgNPs. I risultati preliminari hanno indicato che i rivestimenti a base di Durazane 1800 e PVP presentano una maggiore porosità e una migliore esposizione delle nanoparticelle di argento, per generare un effetto antibatterico.

Lo studio ha evidenziato che l'integrazione di nanoparticelle d'argento all'interno di matrici polimeriche, come il Durazane 1800, costituisce un approccio promettente per lo sviluppo di rivestimenti con proprietà antibatteriche. Tuttavia, sono necessari ulteriori approfondimenti per analizzare con precisione la composizione dei rivestimenti, al fine di ottimizzare l'efficacia antibatterica desiderata. Sarà inoltre fondamentale identificare le caratteristiche strutturali più idonee a facilitare la diffusione degli ioni d'argento all'interno della matrice polimerica in cui sono dispersi.

Abstract

Bacterial contamination remains a major public health challenge, due both to antibiotic resistance identified by the World Health Organization (WHO) as one of the greatest global threats and to the rapid spread of diseases and infections associated with bacterial presence. In this context, nanomaterials represent an innovative and promising strategy to counteract bacteria, viruses, and fungi. Among these, silver nanoparticles (AgNPs) are important because of their high antibacterial potential. AgNPs function by interacting with bacterial cell membranes, compromising their integrity and inhibiting essential cellular functions such as protein synthesis and DNA replication.

The main objective of this thesis is the development and characterization of an antibacterial composite coating based on a silica polymer precursor, Durazane 1800, functionalized with silica nanoparticles (nSiO₂) decorated with silver nanoparticles (AgNPs). Durazane 1800 was selected for its excellent adhesion properties and its capacity to form stable porous structures at high temperatures, essential for optimizing coating functionality.

The initial work was focused on creating the composite coating by dispersing nSiO₂-AgNP nanopowders, previously synthesized at the GLANCE laboratory, into the Durazane 1800 polymer matrix. After suitable thermal treatments, coatings with different properties were obtained. Various preparation and deposition conditions of the coatings on different substrates were subsequently tested, and their characteristics were studied through morphological and compositional analyses, as well as antibacterial activity testing.

Initial test results indicated that, despite good dispersion of the nanoparticles within the matrix, the dense structure of the coating did not ensure effective exposure of AgNPs to the surface, thus limiting the antibacterial effect typically associated with the nanoparticles and the silver ions they usually release.

As a result of these observations, the second part of the thesis focused on exploring a new approach by combining Durazane 1800 with polyvinylpyrrolidone (PVP), which was used as a “sacrificial filler” to improve coating porosity and promote a more effective distribution of nSiO₂-AgNPs. Preliminary results indicated that Durazane 1800 and PVP-based coatings exhibit increased porosity and better silver nanoparticle exposure, leading to an enhanced antibacterial effect.

The study demonstrated that integrating silver nanoparticles within polymer matrices, such as Durazane 1800, represents a promising approach for developing coatings with antibacterial properties. However, further studies are needed to precisely analyze coating composition to optimize the desired antibacterial efficacy. Additionally, it will be crucial to identify the most suitable structural characteristics to facilitate the diffusion of silver ions within the polymer matrix in which they are dispersed.

Parole chiave

NC

Non centrifugate

PVP

Polivinilpirrolidone

TT

Trattamento termico

RPM/RPS

Giri al minuto/Giri al secondo

Indice

Sommario	2
Abstract	3
1 Le contaminazioni batteriche: il problema della resistenza agli antibiotici.....	6
2 Le Nanoparticelle d'Argento	9
2.1 Proprietà antibatteriche e Meccanismi d'azione	9
2.2 Applicazioni delle AgNPs	12
3 Rivestimenti Compositi con Nanoparticelle d'Argento.....	15
3.1 Polimeri pre-ceramici.....	15
4 Materiali e Metodi	18
4.1 Nanoparticelle di SiO ₂ decorate con AgNPs.....	18
4.2 Rivestimenti di silice funzionalizzati da nSiO ₂ -AgNPs.....	20
4.2.1 Durazane 1800	20
4.2.2 Polivinilpirrolidone (PVP)	21
4.3 Realizzazione dei rivestimenti	22
4.3.1 Rivestimenti di Durazane 1800 e nSiO ₂ -AgNPs.....	22
4.3.2 Rivestimenti di Durazane 1800 e PVP.....	26
4.3.3 Rivestimenti di Durazane 1800, PVP e nSiO ₂ -AgNPs	29
4.4 Tecniche di caratterizzazione	31
4.5 Test Antibatterici	31
5 Risultati	32
5.1 Rivestimenti di Durazane 1800 e nSiO ₂ -AgNPs.....	32
5.2 Rivestimenti di Durazane 1800 e PVP.....	40
5.3 Rivestimenti di Durazane 1800, PVP e nSiO ₂ -AgNPs.....	43
6 Conclusioni e Sviluppi Futuri	46
Bibliografia	47

1 Le contaminazioni batteriche: il problema della resistenza agli antibiotici

La scoperta della penicillina nel 1928 ha segnato un importante progresso nella salute globale; tuttavia, negli ultimi decenni la resistenza antimicrobica (AMR) è diventata una preoccupazione crescente. I batteri hanno sviluppato delle resistenze agli antibiotici, rendendo le infezioni più difficili da trattare [1], [2]. Ciò comporta una maggior preoccupazione per la salute pubblica, comportando un possibile aumento in termini di malattie infettive e mortalità [2].

La resistenza agli antibiotici è un fenomeno naturale, ma il suo ritmo è accelerato dall'uso eccessivo e scorretto di questi farmaci; inoltre la globalizzazione e l'incremento dei viaggi intercontinentali hanno contribuito alla diffusione di agenti patogeni resistenti ai farmaci [3]. Le infezioni causate da questi microrganismi rendono le malattie più durature, con un aumento della mortalità, in particolare tra gli anziani, prolungando le degenze ospedaliere e comportando un significativo aumento dei costi sanitari e un impatto economico negativo dovuto alla ridotta produttività dei pazienti e degli animali [4].

Tra il 2000 e il 2010 si è registrato un incremento del consumo globale di antibiotici, pari a circa 40%; questo valore ha raggiunto il 65% nel 2015 [1]. Un altro dato preoccupante riguarda l'uso di antibiotici negli allevamenti di bestiame, si stima che sia stati impiegati circa 60 mila tonnellate di antibiotici a livello mondiale.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sostiene che la resistenza agli antibiotici da parte di batteri, virus e funghi (cosiddetti *superbugs*), sia tra le dieci principali minacce globali alla salute [5].

I batteri sono organismi complessi, con una straordinaria capacità di trasferire e acquisire DNA. Esistono due categorie principali di resistenza: naturale e acquisita [6], [7]. La resistenza naturale è tipica di ceppi batterici che sono resistenti a specifiche classi di antibiotici.

La resistenza acquisita è più complessa: si sviluppa tramite il trasferimento genico che può essere verticale o orizzontale. Nel trasferimento verticale le mutazioni nel DNA batterico vengono trasmesse alle cellule figlie durante la replicazione (come mostrato in *Fig. 1*) [7].

Il trasferimento orizzontale, invece, si compone di tre fasi: trasformazione (assorbimento del DNA dall'ambiente esterno), trasduzione (trasferimento del DNA tramite infezione virale) e coniugazione (scambio diretto di DNA tra batteri) [8]. Questo processo consente il trasferimento di geni batterici molto resistenti.

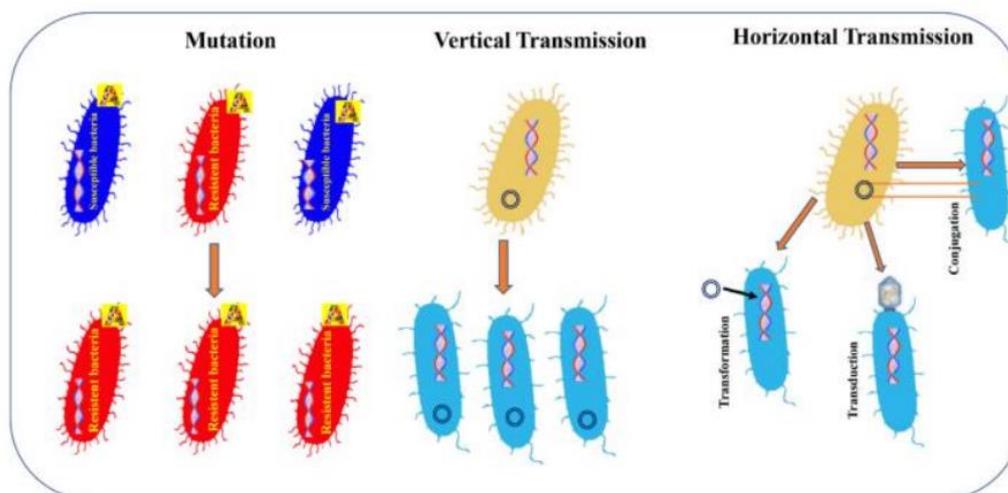


Figura 1: Meccanismi di trasferimento genico verticale e orizzontale [9].

Diversi studi clinici hanno dimostrato che le sole terapie antibiotiche e antimicrobiche non sono sempre state sufficienti a eliminare infezioni batteriche, associate alla formazione di biofilm [10]. I batteri, appunto, sono in grado di formare una matrice tridimensionale, chiamata biofilm batterico, espellendo sostanze polimeriche che si legano alla superficie. Questa matrice raggiunge nel tempo una massa critica, innescando una reazione infiammatoria [11].

La formazione del biofilm avviene in 4 fasi (Fig.2): attacco reversibile, attacco irreversibile, crescita e differenziazione, disseminazione [12]. Un punto di forza del biofilm batterico, è che i batteri sono protetti dall'attacco delle cellule del sistema immunitario dell'ospite, mantenendo attiva la reazione infiammatoria [13], [14].

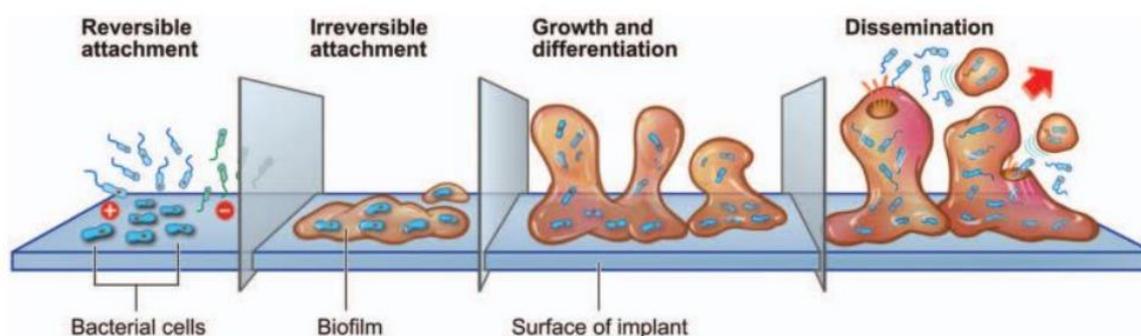


Figura 2: Fasi della formazione del biofilm batterico [15].

La composizione del biofilm e le capacità comunicative [16] di alcuni ceppi batterici rappresentano una sfida nella lotta contro le infezioni, soprattutto nei pazienti ospedalizzati [2].

Tra gli agenti patogeni più rilevanti nel gruppo delle infezioni croniche vi sono lo *Staphylococcus aureus*, la *Klebsiella pneumoniae* e l'*Escherichia coli*.

Lo *Staphylococcus aureus* è un batterio Gram-positivo che può causare infezioni lievi fino a potenzialmente letali. Le infezioni dovute a questo batterio possono interessare pelle, tessuti molli, oltre a causare endocarditi e infezioni polmonari [17]. L'OMS segnala che la resistenza agli antibiotici da parte del *S. aureus* è una minaccia per la salute globale [4], e per infezioni acquisite in ambito ospedaliero [18], le quali diventano molto difficili da trattare.

A causa di quanto detto si genera un meccanismo di reazione a catena in cui, per contrastare le infezioni, si usano diverse classi di antibiotici, favorendo la comparsa di nuove varianti resistenti [19].

Il *Klebsiella pneumoniae* è un batterio Gram-negativo ed è responsabile di infezioni nel tratto urinario, polmonite, ascessi epatici, infezioni post-operatorie e setticemia, specialmente nei pazienti con sistema immunitario compromesso [20]. A differenza di altri batteri, il *Klebsiella* non si trasmette per via aerea, ma tramite contatto diretto tra le persone [21]. Anche questo batterio è un pericolo per gli ambienti ospedalieri poiché ha sviluppato una importante resistenza agli antibiotici.

L'*Escherichia coli* è uno dei batteri più diffusi nel tratto gastrointestinale sia umano sia animale, dove vive in simbiosi con l'ospite e provoca diverse varietà di infezioni. E' responsabile, inoltre, di circa l'80% delle infezioni del tratto urinario [22]. A differenza di altri batteri patogeni, l'E. coli è ampiamente utilizzato in ricerca scientifica per via della sua facilità di manipolazione e per la sua capacità di proliferare sia in condizioni aerobiche che anaerobiche [22].

Sono stati intrapresi studi volti a sviluppare nuovi materiali e agenti antibatterici per combattere gli agenti patogeni. Tra le tecnologie più promettenti figurano i nanomateriali, agenti di dimensione nanometrica che si sono dimostrati efficaci contro batteri, virus e funghi, grazie alle loro dimensioni comparabili alle strutture intracellulari batteriche. Negli ultimi anni i nanomateriali hanno trovato ampio impiego medico: rispetto agli antibiotici tradizionali generano meno resistenza antimicrobica.

In questo scenario le *nanoparticelle d'argento (AgNPs)* sembrano essere la soluzione più innovativa per le loro spiccate proprietà antibatteriche [23]. Inoltre, le *AgNPs* possono essere combinate con nanomateriali a base polimerica, che permettono lo sviluppo di diversi prodotti terapeutici grazie alla loro eccellente biocompatibilità e biodegradabilità [24].

2 Le Nanoparticelle d'Argento

Rispetto ai materiali su scala macroscopica, i nanomateriali stanno acquisendo sempre più rilevanza grazie alle loro caratteristiche e proprietà uniche, rendendoli nuove strategie promettenti sia contro i virus che contro i batteri. In particolare, le nanoparticelle d'argento (AgNPs) hanno recentemente dimostrato di essere efficaci contro un'ampia varietà di virus, oltre ad avere un potente effetto antibatterico, già noto da tempo [25].

2.1 Proprietà antibatteriche e Meccanismi d'azione

L'attività antimicrobica di una sostanza si riferisce alla sua capacità di eliminare in modo permanente un agente patogeno e alterarne la sua struttura morfologica [25]. L'argento metallico reagisce facilmente con biomolecole caricate negativamente, come le proteine della membrana cellulare e le basi del DNA. Di conseguenza, le AgNPs ostacolano la crescita dei batteri attraverso diversi meccanismi (*Fig.3*), questo fenomeno è dovuto al rilascio costante di ioni argento da parte delle nanoparticelle [26]

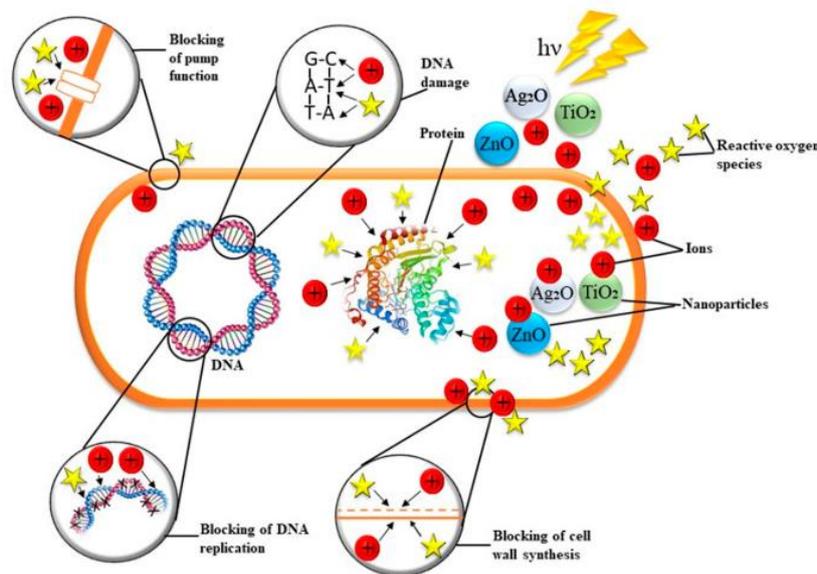


Figura 3: Meccanismi con cui agiscono le NPs sui biofilm batterici [27].

I principali effetti delle AgNPs sui batteri sono i seguenti:

- Interazione con la membrana cellulare:
Gli ioni argento si legano facilmente alla parete e alla membrana citoplasmatica tramite interazioni elettrostatiche [26], [28], [29]. Si diffondono nella parete cellulare e ne modificano la struttura a causa delle loro dimensioni ridotte, portando alla denaturazione della membrana e alla conseguente lisi cellulare [30].
- Effetti sulla duplicazione del DNA:

Gli ioni argento interagiscono con macromolecole biologiche, come enzimi e DNA, generando radicali libero o scariche di elettroni [26]. Una volta assorbiti dalle cellule batteriche, questi inducono la formazione di specie reattive dell'ossigeno, che interferiscono con gli enzimi respiratori creando uno stress ossidativo. Inoltre, interagendo con zolfo e fosfato, componenti cruciali del DNA, possono compromettere la replicazione del DNA e la riproduzione cellulare [26].

- Inibizione della sintesi proteica:

Gli ioni argento impediscono la sintesi proteica denaturando il ribosoma, causando un malfunzionamento delle proteine e delle strutture cellulari batteriche [31], [32].

- Coinvolgimento nella trasduzione del segnale batterico:

Le AgNPs possono anche interferire con la trasduzione del segnale batterico, portando all'apoptosi e all'interruzione della moltiplicazione cellulare [26], [33], [27].

Uno studio condotto da *Noronha et al.* ha evidenziato l'importanza dell'assorbimento delle nanoparticelle d'argento per sfruttarne appieno il potenziale antibatterico [34]. Risulta che l'efficacia delle AgNPs sia maggiore contro i batteri Gram-negativi rispetto ai Gram-positivi [35], [36].

Nei Gram-negativi la parete cellulare presenta uno strato sottile di peptidoglicani e un doppio strato di lipopolisaccaridi (LPS), mentre i Gram-positivi presentano uno strato spesso di peptidoglicani e uno strato sottile di LPS, il quale rende più difficile la penetrazione delle nanoparticelle [36].

L'efficacia delle AgNPs è stata confermata su batteri con resistenza a più farmaci (*multidrug resistance*, MDR), come *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* [37]. *Taraszkiewicz et al.* ha esaminato l'azione delle AgNPs contro *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* ed *E. coli*, riscontrando un'attività antibatterica significativa, con un effetto maggiore su *E. coli* [38].

La dimensione delle AgNPs, che varia da 1 a 100 nm, permette loro di penetrare facilmente all'interno dei batteri [39], [40], [41], [42]. Questa ridotta dimensione conferisce alle nanoparticelle caratteristiche uniche, come un elevato rapporto superficie-volume.

La forma delle nanoparticelle gioca un ruolo importante: variazioni nella loro morfologia possono influenzare l'efficacia antibatterica [43], [44], [45], [46].

Burda et al. hanno dimostrato che le nanoparticelle di dimensioni più piccole, in particolare quelle sferiche o a bastoncino, penetrano più facilmente nei batteri [47]. Ulteriori studi al microscopio elettronico hanno osservato che la distruzione della membrana di *E. coli* varia in base alla forma delle AgNPs utilizzate [37].

Questa differenza è dovuta alla variazione dell'area superficiale, che influenza il rilascio di ioni argento.

In conclusione, le AgNPs rappresentano una promettente soluzione contro i patogeni, ma la loro efficacia dipende dalle specifiche interazioni con le strutture cellulari dei batteri.

Indipendentemente dalla forma o dall'interazione, le nanoparticelle agiscono direttamente nella distruzione del biofilm batterico, la principale barriera difensiva dei batteri. Ricapitolando: il biofilm è un ambiente chimico-fisico complesso, caratterizzato da numerose molecole polimeriche con specifiche cariche elettriche [48]. È una matrice tridimensionale nella quale si trovano componenti

come acido uronico, piruvato legato a ioni metallici, acido carbossilico, fosfato e solfato; tutti questi componenti conferiscono al biofilm una carica prevalentemente negativa [49], [50]. I batteri presenti nel biofilm tendono a essere più resistenti ai trattamenti antibatterici e alle difese immunitarie dell'ospite [51].

Esistono due approcci per contrastare i biofilm: prevenire l'adesione del biofilm (strategia passiva); utilizzare trattamenti antimicrobici (strategia attiva). Le NPs interagiscono con il bersaglio in tre fasi (Fig.4):

1. Migrazione delle particelle vicino al biofilm;
2. Adesione alla superficie del biofilm;
3. Penetrazione all'interno del biofilm.

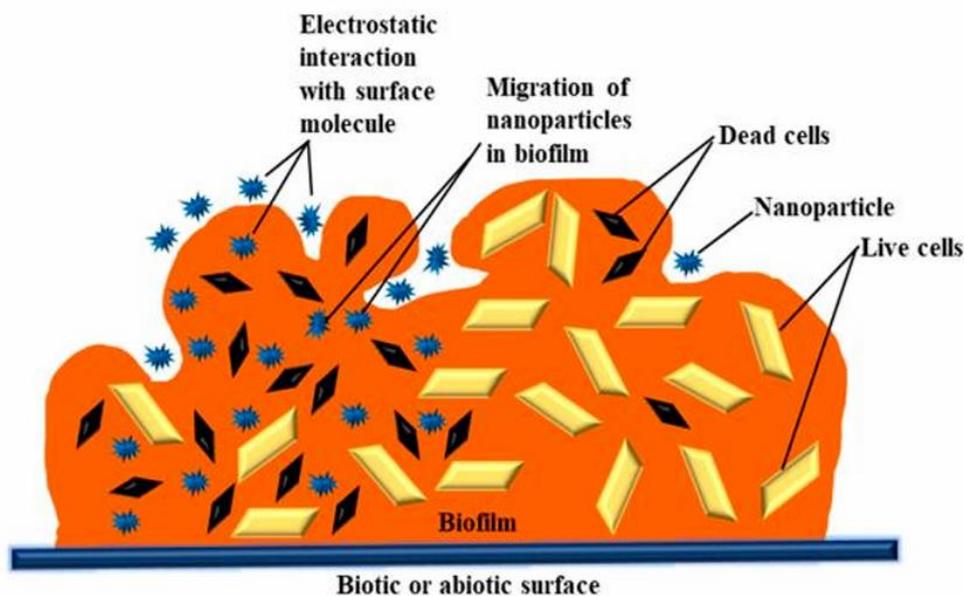


Figura 4: Interazioni fisico-chimiche tra le nanoparticelle e il biofilm [27].

Tra le interazioni che avvengono tra le Nps e il biofilm, quelle elettrostatiche sono particolarmente rilevanti: la carica negativa della matrice batterica interagisce con gli ioni metallici carichi positivamente [52], [53]. Successivamente all'adesione alla superficie, avviene la penetrazione delle NPs all'interno del biofilm tramite diffusione [54], [55].

Un'ulteriore funzione delle AgNPs è che impediscono l'interazione tra virus e cellule, interferendo temporaneamente con i recettori virali legandosi ad essi, e impedendone l'ingresso nella cellula [56]. Tuttavia, affinché questo meccanismo funzioni, vi deve essere una cospicua presenza di nanoparticelle sulla superficie cellulare, questo fenomeno potrebbe portare ad effetti tossici indesiderati [25].

2.2 Applicazioni delle AgNPs

Le nanoparticelle d'argento si sono diffuse in vari settori, grazie alle loro capacità antibatteriche e al loro potenziale nell'impedire le infezioni. Trovano spazio nell'industria alimentare, nel settore tessile, nel trattamento di acqua e aria, nella produzione di dispositivi di protezione individuale e, in particolare, nel campo biomedico.

In ambito biomedico e sanitario, i risultati ottenuti derivano prevalentemente da studi in vitro; la mancanza di test in vivo e studi clinici approfonditi limitano il loro uso terapeutico.

Di seguito sono elencate le principali applicazioni delle Nanoparticelle d'Argento (Fig.5):

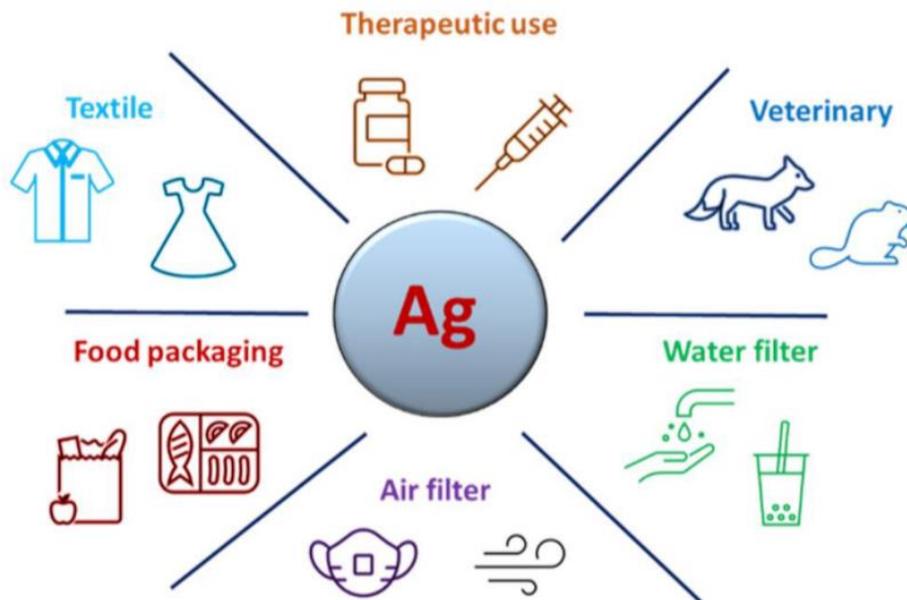


Figura 5: Potenziali applicazioni delle AgNPs [57].

- Protezione antimicrobica su superfici e materiali in ambienti sanitari

Alcuni batteri e virus possono essere trasmessi attraverso il contatto con superfici contaminate, è dunque importante lo sviluppo di superfici auto-decontaminanti, antibatteriche e antivirali. *Jan Hodek et al.* Hanno testato dei rivestimenti protettivi mediante l'utilizzo delle AgNPs contro diversi virus e ceppi di batteri [58]. I coating sono stati depositati su substrati come vetro e poli-metilmetacrilato (PMMA). È stato osservato che il rivestimento presentava una attività virucida e antibatterica.

In un'altra ricerca di *Li et al.* le AgNPs, sintetizzate da nitrato d'argento e biossido di titanio (TiO_2), sono state utilizzate per rivestire maschere facciali [59]. Quando quest'ultime sono esposte ai ceppi batterici di *E. coli* e *S. aureus*, viene inibita la crescita delle colonie.

Questi risultati dimostrano il potenziale delle AgNPs per fornire protezione antimicrobica su superfici e materiali in ambienti sanitari.

- Purificazione e filtrazione delle acque

Un'altra possibile applicazione è quella nel trattamento delle acque. Per quanto riguarda la purificazione e la filtrazione, è sempre stato essenziale garantire che l'acqua sia limpida e potabile. Durante i controlli di routine sulla qualità dell'acqua presente nei bacini o serbatoi idrici, può

succedere che vengano rilevati batteri come *enterococchi*, *Escherichia coli* e *batteri coliformi* [60]. Numerosi studi hanno utilizzato AgNPs in combinazione con altri materiali specifici per creare sistemi innovativi che possiedono un effetto antibatterico senza alterare le proprietà fisiche e chimiche dell'acqua. Queste applicazioni potrebbero avere un impatto significativo sulla salute umana, poiché, riducendo al minimo il rilascio delle nanoparticelle, permetterebbero di ottenere acqua pura e disinfettata con metodi che non contaminano né inquinano l'ambiente. Uno studio di *Lukhele et al.* ha testato la capacità delle AgNPs di eliminare i batteri presenti nell'acqua potabile contaminata[60]. I risultati hanno chiaramente dimostrato che questa modifica del polimero conferisce al sistema proprietà antibatteriche, risultando efficace contro il batterio *E. coli*.

- Filtrazione dell'aria

Virus, batteri e funghi possono rimanere nell'aria per lungo tempo ed essere trasmessi tramite inalazioni.

La qualità dell'aria interna necessita di un controllo e miglioramento più rigorosi per prevenire numerosi problemi di salute. Sebbene siano stati creati diversi dispositivi per la filtrazione dell'aria, è essenziale controllare la proliferazione dei microrganismi in certe condizioni.

A tal fine, *Luceri et al.*[61] hanno progettato un rivestimento composto di nanocluster d'argento (AgNPs) incapsulate in una matrice di silice, il quale è stato applicato mediante una tecnica di co-sputtering su substrati di fibra di vetro e polimeri. Lo scopo era valutare le proprietà antibatteriche e antivirali.

I test preliminari sulla composizione e la morfologia hanno rivelato una distribuzione uniforme del rivestimento sulle superfici dei filtri. Diversi test antibatterici hanno confermato un'efficace azione sia con metodi qualitativi che quantitativi contro *S. epidermidis* ed *E. coli*.

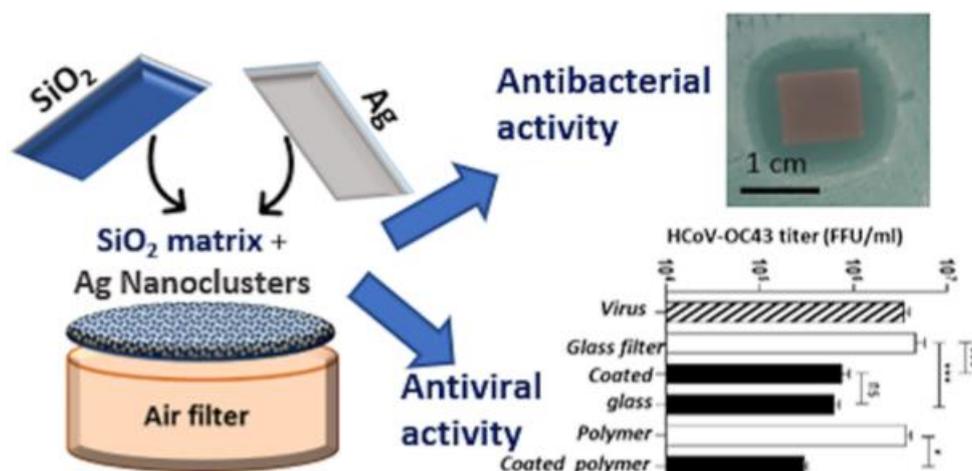


Figura 6: Valutazione antibatterica su coating di nanocluster di argento/silice su filtro per depurazione dell'aria [61].

- Industria tessile

Nel contesto dell'industria tessile, la maggiore richiesta di tessuti antivirali e antibatterici proviene principalmente dal settore sanitario, dove pazienti e operatori sono esposti a un elevato rischio di infezioni, indipendentemente dalla recente pandemia [62]. I tessuti comunemente utilizzati in ospedali e cliniche, così come quelli a diretto contatto con i pazienti (come bende e dispositivi di

protezione individuale), possono fungere da veicoli per la trasmissione di vari agenti patogeni. Generalmente, per conferire proprietà antivirali e antibatteriche ai tessuti attraverso l'uso di nanoparticelle di argento (AgNPs), si procede con l'aggiunta delle stesse direttamente nella soluzione polimerica durante la fase di filatura, oppure impregnando il tessuto in una soluzione ricca di nanoparticelle.

- Industria alimentare

Le nanoparticelle d'argento (AgNPs) vengono comunemente impiegate nell'industria alimentare integrandole in matrici polimeriche di pellicole o contenitori per alimenti, con l'obiettivo di ridurre il rischio di contaminazione da batteri e funghi [63]. Gli imballaggi che sfruttano le nanotecnologie offrono migliori proprietà fisico-chimiche, minore idrofilia e una biodegradabilità superiore [64]. Un vantaggio notevole delle AgNPs è la loro facile integrazione in vari materiali, come plastica e tessuti, oltre alla capacità di mantenere un'efficace azione antibatterica in loco, a differenza degli agenti antimicrobici tradizionali che possono risultare meno stabili nel tempo [64].

Nello studio di *Lu et al.* [65] un pigmento composito di ceramica e argento (Ag@ceramic) è stato preparato rivestendo le polveri di ceramica con argento mediante placcatura elettrolitica. Questi pigmenti sono stati incorporati in fogli di carta tramite *coating*, *filling* e *filling-coating*.

Sono stati usati degli spinaci per condurre i test ed è stata valutata la capacità di conservazione dei fogli di carta. Sono stati utilizzati quattro indicatori per la valutazione: inibizione della crescita di *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*, perdita di peso degli spinaci e ritenzione di vitamina C e clorofilla negli spinaci. Nonostante la carta conservante a base di ceramica non abbia proprietà antibatteriche, è riuscita a ridurre la perdita di peso negli spinaci e a migliorare la ritenzione di vitamina C e clorofilla. D'altra parte, la carta conservante antibatterica ha mostrato un'inibizione della crescita di *E. coli* e *S. aureus* superiore al 99%, e grazie alla sua attività antibatterica aggiuntiva, ha conservato gli spinaci in modo ancora più efficace.

Tuttavia, nonostante i benefici offerti dall'uso delle AgNPs, un possibile limite al loro impiego nell'industria alimentare è rappresentato dalla loro migrazione negli alimenti confezionati, che comporterebbe potenziali rischi di tossicità [66].

3 Rivestimenti Compositi con Nanoparticelle d'Argento

Un materiale composito è un materiale eterogeneo, cioè costituito da due o più fasi con proprietà fisiche differenti, le cui proprietà sono molto migliori di quelle delle fasi che lo costituiscono [67], [68].

Alcuni studi hanno evidenziato che, quando i nanomateriali sono incapsulati in composti organici come collagene, gelatina o chitosano, l'attività antivirale è prolungata nel tempo grazie al rilascio lento di ioni [69].

I rivestimenti compositi contenenti le AgNPs hanno il vantaggio di isolare le nanoparticelle dall'ambiente circostante, riducendo i rischi associati alla citotossicità nelle cellule umane. Inoltre, incapsulare le nanoparticelle in materiali secondari, garantisce un effetto antimicrobico prolungato.

In questo scenario i materiali nanocompositi polimerici sono molto adatti, poiché noti per la loro resistenza meccanica e fisica, la loro biocompatibilità e le proprietà anticorrosive; tutto ciò li rende adatti alla creazione di superfici antibatteriche.

Atay et al. hanno realizzato un rivestimento antibatterico a base polimerica combinando le proprietà chimico-fisiche e meccaniche dei poliuretani con le capacità antimicrobiche delle nanoparticelle d'argento (AgNPs) [70]. I rivestimenti sono stati ottenuti partendo da una soluzione di poliuretano a cui sono state aggiunte AgNPs, sintetizzate precedentemente tramite una reazione di riduzione. È stato studiato come l'attività antibatterica dei rivestimenti variava in funzione della concentrazione di AgNPs nei campioni. Le analisi spettroscopiche hanno evidenziato una significativa presenza di agglomerati di AgNPs all'interno della matrice dei rivestimenti, con una maggiore aggregazione correlata a un aumento della concentrazione di nanoparticelle. Nonostante ciò, tutti i campioni testati hanno dimostrato un'efficace attività antimicrobica contro *S. aureus* ed *E. coli*, anche con le concentrazioni più basse di AgNPs. La presenza delle nanoparticelle non ha influenzato la fase o la struttura del polimero. Tuttavia, i test di rilascio ionico hanno mostrato una limitata diffusione delle AgNPs attraverso la matrice polimerica, suggerendo che l'attività antibatterica derivi principalmente dalle nanoparticelle incapsulate vicino alla superficie del rivestimento.

3.1 Polimeri pre-ceramici

I polimeri pre-ceramici sono materiali organici che, se sottoposti a trattamenti termici come la pirolisi, si trasformano in ceramici. La pirolisi permette di eliminare le componenti volatili, mantenendo una struttura ceramica stabile e resistente. All'interno di questi polimeri troviamo componenti come silicio, carbonio, azoto e ossigeno.

In questo lavoro di tesi è stata approfondita una particolare categoria di polimeri pre-ceramici: i polisilazani. Sono strutturati in catene in cui si alternano unità di silicio e azoto (legame Si-N molto reattivo) (*Fig. 7*) e fungono da precursori della silice.

Negli ultimi anni sono stati impiegati per la produzione di rivestimenti protettivi a base di silice amorfa [71] e per la realizzazione di materiali ceramici composti.

Possiedono proprietà di adesione ai substrati (legno, metallo, plastica, vetro e ceramica), resistenza chimica e termica, durezza.

Si suddividono in due principali classi: polisilazani inorganici (peridropolisilazani) e polisilazani organici (organipolisilazani), i quali sono oggetto del presente studio.

I polisilazani organici presentano atomi di silicio legati a gruppi idrocarburici, come nel caso del Durazane (le cui proprietà verranno approfondite nel *Capitolo 4*), anch'essi fungono da precursori della silice.

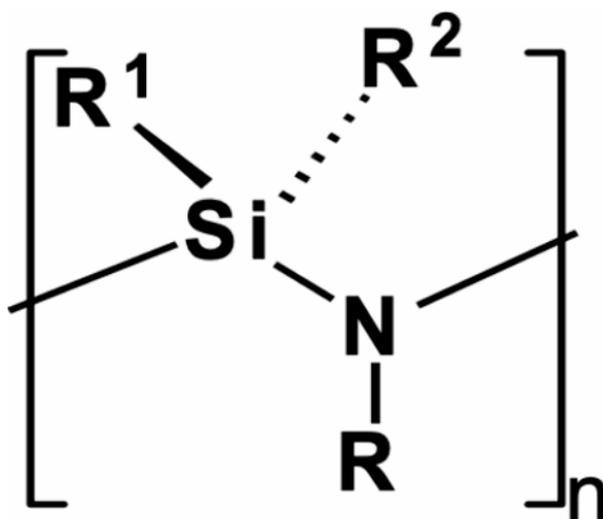


Figura 7: Struttura chimica dei polisilazani [70].

Balagna et al. hanno sviluppato un rivestimento composito antibatterico composto da nanocluster di argento e silice, applicato con successo sul tessuto Vectran™ tramite la tecnica del co-sputtering a radiofrequenza [72]. Il Vectran™ è una fibra polimerica a cristalli liquidi, utilizzata nei guanti degli astronauti.

Le nanoparticelle d'argento (AgNPs) sono state inglobate nella matrice di silice e distribuite sulla superficie delle fibre. Sono stati testati dei cicli di lavaggio ed il rivestimento ha mantenuto le sue proprietà antibatteriche, prevenendo la proliferazione di batteri come *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*, senza alterare le proprietà meccaniche del tessuto. Un test di permeazione cutanea ha confermato che la quantità di argento che attraversa la pelle è trascurabile per la sicurezza umana, sia con guanti integri che deteriorati.

Nello studio condotto da *Luceri et al.* (citato nel *Capitolo 2*) [61], è stato utilizzato un rivestimento composto da nanoparticelle d'argento (AgNPs) incapsulate in una matrice polimerica di silice.

Per creare il rivestimento è stata utilizzata la tecnica del co-sputtering: sono stati impiegati due catodi, uno d'argento e uno di silice, e il coating è stato testato su batteri come *Escherichia coli* (Gram-negativo), *Staphylococcus epidermidis* (Gram-positivo) e sul ceppo umano del *Coronavirus* OC43 (HCoV-OC43).

Le analisi morfologiche hanno confermato la deposizione uniforme del rivestimento, mentre i test di rilascio ionico, eseguiti su un periodo di 14 giorni, hanno mostrato un rilascio graduale degli ioni argento. I test dell'alone di inibizione hanno dimostrato l'efficacia antibatterica del rivestimento. Inoltre, il meccanismo d'azione delle AgNPs variava in base al substrato: nei filtri in fibra di vetro,

l'effetto antibatterico e antivirale era dovuto al rilascio di ioni argento, mentre nei filtri polimerici sembrava agire direttamente contro le cellule virali .

Un altro studio di *Balagna et al.* ha sperimentato dei rivestimenti compositi antibatterici da applicare su tessuti di cotone [73]. L'obiettivo di questo studio era mantenere un'attività antimicrobica dei tessuti, nonostante i numerosi cicli di lavaggio.

I tessuti sono stati ricoperti da rivestimenti diversi composti da: silice, allumina e matrice di zirconio. Per incorporare la AgNPs è stata utilizzata la tecnica del co-sputtering.

Dopo 14 giorni, è stato valutato il rilascio di ioni argento ed è risultato minimo; ciò nonostante i rivestimenti hanno continuato a mantenere il loro effetto antibatterico. Questi sono stati testati su piastre di batteri *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. I risultati hanno mostrato che i rivestimenti erano efficaci nel prevenire l'adesione e la proliferazione dell'*E. coli*. Tuttavia, solo i rivestimenti a base di silice sono stati in grado di inibire la crescita di *P. aeruginosa*; per ottenere lo stesso risultato con i coating in zirconia e allumina era necessaria una maggiore quantità di argento. Inoltre, i tessuti rivestiti si sono dimostrati citocompatibili e ben tollerati dalle cellule del derma e dell'epidermide, come fibroblasti e cheratinociti umani. Questo è stato confermato sia simulando il rilascio di composti tossici, sia coltivando direttamente le cellule sulla superficie dei materiali.

Questi studi portati avanti dal gruppo di ricerca GLANCE del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT), sono la base da cui parte questo progetto di tesi. Lo scopo è sviluppare un rivestimento composito in termini di sintesi, adattabilità e antimicrobicità, sfruttando una tecnica alternativa al co-sputtering e che si possa potenzialmente utilizzare per rivestire qualsiasi substrato. Per ottenere il rivestimento si partirà da un precursore polimerico della silice in cui sono state inglobate delle nanoparticelle di silice ($n\text{SiO}_2$) decorate con nanoparticelle d'argento (AgNPs).

4 Materiali e Metodi

4.1 Nanoparticelle di SiO₂ decorate con AgNPs

La sintesi delle nanoparticelle di silice funzionalizzate con AgNPs è stata svolta in una precedente tesi, condotta presso il GLANCE del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT). Questo lavoro è stato di fondamentale perché, grazie alla sintesi delle nanopolveri, è stato possibile sviluppare i vari rivestimenti compositi e testarne caratteristiche strutturali e antimicrobicità [74].

Il primo step consiste nella sintesi delle nanoparticelle di biossido di silicio (nSiO₂) utilizza il tetraetil ortosilicato (TEOS) come precursore della silice, insieme a una soluzione composta da NH₄OH (che funge da catalizzatore e agente gelificante basico), etanolo e acqua bidistillata.

Al termine del processo di sintesi, le nanoparticelle di silice si presentano sotto forma di nanopolveri e sono caratterizzate da una colorazione bianca (tipica dei ceramici) (Fig.8).

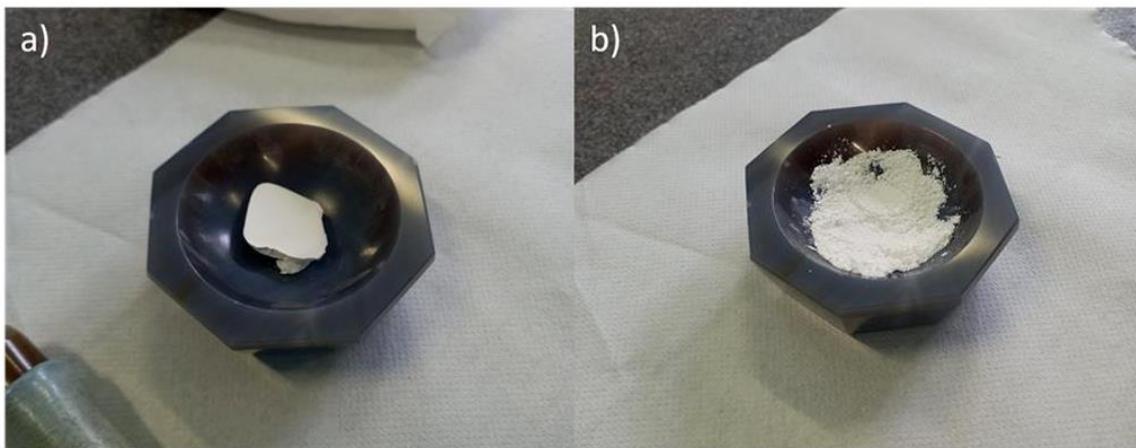


Figura 8: (a) blocco di nSiO₂ dopo l'essiccazione in stufa, (b) nanopolveri di SiO₂ separate con pestello e mortaio [78].

Il secondo step consiste nel sintetizzare nanoparticelle a base di silice decorate con AgNPs, incapsulando l'argento a partire dal Nitrato di Argento (AgNO₃). Sono stati seguiti due protocolli distinti: una parte delle polveri è stata sottoposta a centrifugazione in modo da valutare se si potessero ridurre i fenomeni di aggregazione durante la sintesi e favorire una maggiore quantità di argento sulla superficie della silice; un'altra parte non è stata sottoposta a centrifugazione per valutarne eventuali vantaggi o svantaggi.

Il trattamento termico delle polveri è stato il medesimo sia per la parte centrifugata che per quella non centrifugata. Le polveri sono state poste in stufa a 60°C per 48 ore, questo trattamento serve per far evaporare completamente il solvente che non è stato rimosso dalla soluzione. Successivamente, le polveri essiccate, sono state poste all'interno di un contenitore in allumina e lasciate in forno a 700°C per 200 minuti, con rampa di temperatura di 5°C/min (fase di calcinazione in cui l'AgNO₃ si decompone sulla superficie della nanosilice).

Un indicatore qualitativo dell'avenuta nucleazione delle AgNPs sulla superficie della silice è la colorazione marrone delle nanopolveri. Ciò è causato dal nitrato d'argento che, ad alte temperature, subisce una decomposizione termica che porta alla formazione di biossido di argento metallico, che dona questa particolare colorazione (Fig.9).

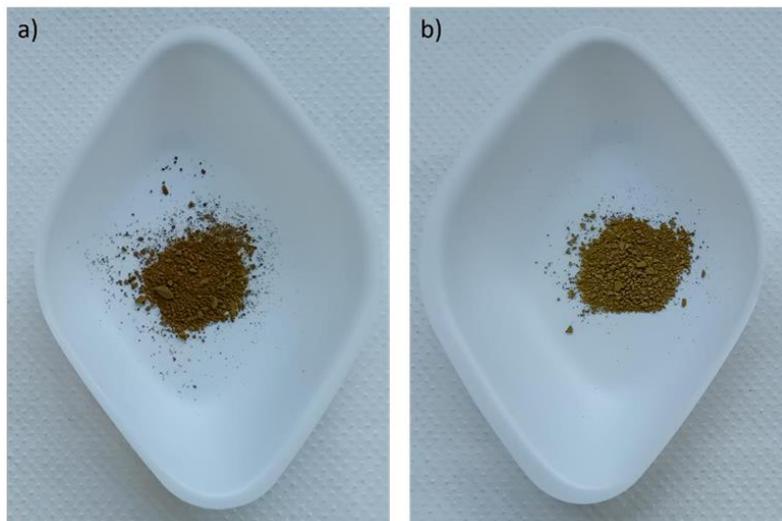


Figura 9: Come si presentano alla vista le $nSiO_2$ -AgNPs [78].

In questo progetto di tesi sono state nuovamente sintetizzate le nanopolveri a scopo di utilizzo, mediante il processo di sintesi illustrato nel lavoro svolto in precedenza dal GLANCE; quanto detto è mostrato in Fig.10b:



Figura 10: (a) come si presentano le $nSiO_2$ -AgNPs NC, (b) processo di sintesi delle $nSiO_2$ -AgNPs NC.

I risultati dei test portati avanti dal GLANCE mostrano che si ottengono delle $nSiO_2$ sferiche e monodisperse, di diametro compreso tra i 200 e i 300 nm; mentre le AgNPs presentano un diametro compreso tra i 20 nm e i 50 nm.

I risultati dei test dell'alone di inibizione indicano che le nanopolveri possiedono un'attività antibatterica sufficiente a impedire la crescita dei batteri nelle aree circostanti ai campioni[74].

4.2 Rivestimenti di silice funzionalizzati da nSiO₂-AgNPs

Per ottenere il rivestimento composito si parte da una matrice composta da un polimero preceramico disponibile in commercio (Durazane 1800), nella quale vengono disperse le nanopolveri di nSiO₂-AgNPs, ottenute in precedenza.

Nel lavoro svolto in precedenza dal GLANCE su tre tipologie di nanopolveri (nSiO₂ pura, nSiO₂-AgNPs centrifugate, nSiO₂-AgNPs non centrifugate), i test antibatterici hanno dimostrato l'antimicrobicidà di quest'ultime.

Tuttavia la sfida principale è realizzare un coating eterogeneo di nanopolveri e del polimero preceramico: il Durazane 1800 è stato miscelato alle tre tipologie di nanopolveri, riscontrando un rivestimento molto spesso e poco poroso, che non fa sì che l'argento si distribuisca omogeneamente sulla superficie del coating, perdendo le proprietà antibatteriche.

A partire da questi risultati, lo scopo di questa tesi è la ricerca e lo sviluppo di un rivestimento altamente poroso e dotato di proprietà antibatteriche [74].

4.2.1 Durazane 1800

Il Durazane 1800 (Merck KGaA) è un organopolisilazano (OPSZ), una resina di polisilazani organici. È liquida, caratterizzata da bassa viscosità e priva di solventi [75].

È adatto per rivestire diversi tipi di substrati quali metalli, vetri e ceramici; possiede ottime proprietà di adesione, durezza, idrorepellenza e capacità di formare una barriera.

Il polisilazano, come mostrato in *Fig. 11*, possiede una catena principale composta da silicio e azoto che si alternano nella catena polimerica, con gruppi laterali di idrogeno, metile (CH₃) e vinile (CH=CH₂).

Il Durazane può essere miscelato a freddo, con altre resine o composti, senza che si verifichino reazioni chimiche tra i componenti. La reticolazione del polimero avviene principalmente tramite reazioni di idrolisi e policondensazione, formando gruppi silanolo. Questa reazione può avvenire sia in atmosfera inerte che in presenza di aria.

La pirolisi, che porta alla trasformazione del polimero in un materiale ceramico, avviene a temperature superiori ai 500°C e il materiale mostra eccellente stabilità ad alte temperature, può resistere a picchi di 1000°C. Durante la pirolisi, le componenti organiche vengono rimosse (carbonio, azoto e idrogeno), lasciando un residuo ceramico.

La reattività del polisilazano è ridotta dalla presenza di sostituenti organici.

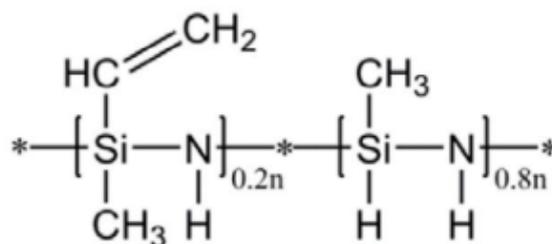


Figura 11: Struttura molecolare del Durazane 1800 [86].



Figura 12: Durazane commerciale a disposizione in laboratorio [75].

4.2.2 Polivinilpirrolidone (PVP)

Il polivinilpirrolidone (PVP) è un polimero sintetico derivato dalla polimerizzazione della N-vinilpirrolidone. La sua struttura chimica è costituita da una catena di unità ripetitive di vinilpirrolidone, caratterizzate da un anello pirrolidone legato a un gruppo vinilico ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), conferendo al PVP una notevole versatilità e non tossicità, rendendolo solubile in acqua e in numerosi solventi organici.

Il PVP si presenta come una polvere bianca o giallastra, inodore e insapore. Ha eccellenti proprietà filmogene, adesive, emulsionanti e stabilizzanti. Ha diversi impieghi in ambito di laboratorio: è spesso usato per stabilizzare soluzioni colloidali, come nanoparticelle metalliche (ad esempio oro e argento), prevenendo l'aggregazione grazie alla sua capacità di formare strati protettivi attorno alle particelle.

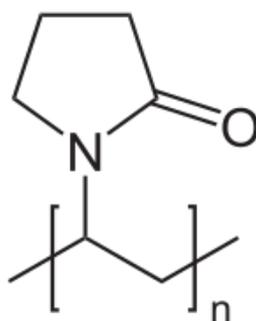


Figura 13: Struttura chimica del Polivinilpirrolidone (PVP).

4.3 Realizzazione dei rivestimenti

La realizzazione dei rivestimenti consiste in un processo di miscelazione. Sono stati eseguiti vari test per comprendere quale fosse il rivestimento migliore in termini di porosità ed effetto antibatterico, ottimizzando sia la concentrazione delle nanoparticelle che i parametri di deposizione. A tal fine, sono stati eseguiti vari test, utilizzando tre reagenti: il Durazane 1800, le nSiO₂-AgNPs NC e il PVP (Polivinilpirrolidone).

Il protocollo di sintesi dei rivestimenti è riportato di seguito in *Tab.I*, per ciascun test si segue la seguente procedura:

Tabella I: Protocollo di sintesi dei rivestimenti.

1. Pesatura del Durazane: si prende una eppendorf e si pesa 1g di durazane 1800;
2. Aggiunta delle nanopolveri: si aggiunge una certa percentuale in peso (%wt) di nanopolveri al Durazane 1800;
3. Miscelazione: si mescola la soluzione manualmente oppure tramite mixing automatico fino a raggiungere un certo livello di omogeneità;
4. Deposizione del coating: si deposita la soluzione su un substrato scelto in base all'esigenze del test;
5. Trattamento termico: si effettua un trattamento termico sul campione mediante asciugatura a temperatura ambiente, forno da laboratorio oppure stufa da laboratorio;

4.3.1 Rivestimenti di Durazane 1800 e nSiO₂-AgNPs

Il protocollo di sintesi è uguale per tutti i test eseguiti e corrisponde a quello descritto in *Tab.I*.

Rivestimento n°1 Durazane 1800 - nSiO₂-AgNPs

E' stato realizzato un primo rivestimento di Durazane 1800 nel quale vengono disperse le nanoparticelle di silice decorate con nanoparticelle d'argento NC.

Nella *Tab.II* è possibile osservare la quantità dei reagenti utilizzati durante il processo:

Tabella II: Reagenti utilizzati nella sintesi del rivestimento.

Nome Composto	Quantità Utilizzata
Durazane 1800	1 g
nSiO ₂ -AgNPs NC	0,4 g

Utilizzando una micropipetta Eppendorf, è stato pesato 1 g di Durazane 1800, a cui sono stati aggiunti 0,4 g di nSiO₂-AgNPs NC, corrispondenti al 40% in peso. La miscela è stata agitata manualmente per circa 15 minuti, fino al raggiungimento di un certo grado di omogeneità. Al termine della miscelazione, la soluzione ha assunto una colorazione tendente al marrone scuro/nero.

Il composto così ottenuto è stato applicato, mediante pipetta Pasteur e barretta stendifilm, su tre substrati differenti: un substrato in allumina (Al_2O_3); un substrato in cotone con un rivestimento più spesso; e un substrato in cotone "upside-down" (UD), in cui il composto è colato fino alla faccia opposta del tessuto, formando un rivestimento più sottile.

I campioni in cotone sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente per circa 48 ore, mentre il campione in allumina è stato sottoposto a un trattamento termico (TT) in forno a $500^\circ C$ per 5 minuti, al fine di stabilizzare il rivestimento e favorire la formazione della struttura porosa.

Rivestimento n°2 Durazane 1800 - $nSiO_2$ -AgNPs

Considerando i risultati del primo rivestimento (*Capitolo 5*), si è progettato un secondo rivestimento per ottimizzare la distribuzione delle nanoparticelle nella matrice di Durazane 1800: aumentandone la concentrazione fino al 60%wt e 80%wt, impiegando un mixer automatico per la fase di miscelazione e introducendo uno spin coating per la fase di deposizione.

Sono state preparate due miscele distinte: una contenente 0,6 g e l'altra 0,8 g di nanoparticelle per ogni grammo di Durazane 1800.

Nella *Tab.III* è possibile osservare la quantità dei reagenti utilizzati durante il processo:

Tabella III: Reagenti utilizzati nella sintesi del rivestimento.

Nome Composto	Quantità Utilizzata
Durazane 1800	1 g
$nSiO_2$ -AgNPs NC	0,6 g
$nSiO_2$ -AgNPs NC	0,8 g

Le due soluzioni sono state successivamente miscelate tramite un mixer automatico, seguendo il seguente protocollo:

1. Prima fase di miscelazione: 2 minuti a 1000 rpm.
2. Prima fase di defoaming: 2 minuti a 1000 rpm.
3. Seconda fase di miscelazione: 2 minuti a 1000 rpm.
4. Seconda fase di defoaming: 30 secondi a 1400 rpm.



Figura 14: Mixer automatico a disposizione in laboratorio.

L'impiego di un mixer automatico, rispetto alla miscelazione manuale, garantisce una migliore dispersione delle nanoparticelle all'interno della matrice, favorendo così una più efficace omogeneizzazione della soluzione. Al termine della miscelazione, entrambe le soluzioni hanno assunto una colorazione marrone scuro/nero.

Le miscele sono state successivamente depositate sui substrati mediante spin coating.



Figura 15: Spin coating a disposizione in laboratorio.

La possibilità di utilizzare la tecnica dello spin coating permette di generare dei coating più omogenei, con spessore uniforme e una maggiore distribuzione delle nanopolveri nella matrice.

Zhan *et al.* hanno testato cinque polisilazani commercialmente disponibili, applicati mediante spin coating su substrati in policarbonato e polimerizzati in condizioni ambientali, ottenendo film trasparenti, privi di crepe e densi. Tra questi è stato testato proprio il Durazane 1800 tra i 500 e i 1500 rpm. A valle degli esperimenti, si sono resi conto che lo spessore dei film polimerici può essere controllato attraverso la velocità di spinning [76].

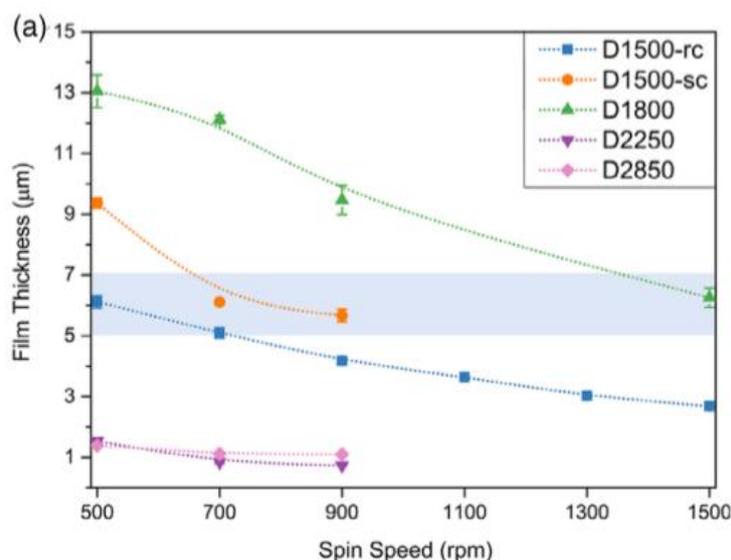


Figura 16: Spessore del film dei rivestimenti dei polisilazani in funzione della velocità di spinning.

I substrati impiegati sono dei vetrini da laboratorio che vengono in precedenza puliti tramite bagno ad ultrasuoni e successivamente posizionati sullo spin coater, dove è stato creato un vuoto al di sotto del vetrino per garantirne la stabilità. Una goccia della soluzione viene poi depositata sulla superficie del vetrino tramite pipetta Pasteur.

Per questo test sono state selezionate due diverse velocità di spinning al fine di valutare l'effetto della velocità sullo spessore del rivestimento. La soluzione al 60%wt è stata depositata su due vetrini differenti, sottoposti alle seguenti condizioni di spinning:

- uno a 50 rps per 60 secondi.
- uno a 85 rps per 60 secondi.

Lo stesso procedimento è stato replicato utilizzando la soluzione all'80%wt. Infine i campioni vengono lasciati ad asciugare a temperatura ambiente per circa 72 ore.

Ad una prima analisi visiva i campioni a 50 rps risultano più concentrati, ovvero le particelle di argento/silice risultano maggiormente agglomerate nella zona centrale del vetrino. Mentre i campioni a 85 rps risultano più distribuiti e omogenei rispetto i precedenti.

Rivestimento n°3 Durazane 1800 - nSiO₂-AgNPs

Il terzo test si è concentrato ulteriormente sull'ottimizzazione dei parametri dello spin coating per ottenere rivestimenti ancora più sottili e uniformi.

Le nanopolveri sono state aggiunte in percentuali del 50%wt e 60%wt rispetto a 1g di Durazane, corrispondenti rispettivamente a 0,5 g e 0,6g di nanopolveri.

Nella *Tab.IV* è possibile osservare la quantità dei reagenti utilizzati durante il processo:

Tabella IV: Reagenti utilizzati nella sintesi del rivestimento.

Nome Composto	Quantità Utilizzata
Durazane 1800	1 g
nSiO ₂ -AgNPs NC	0,5 g
nSiO ₂ -AgNPs NC	0,6 g

L'obiettivo di questo test è ottenere un rivestimento ancora più sottile, intervenendo sulla modifica dei parametri dello spin coating. I reagenti sono stati pesati seguendo la medesima procedura utilizzata nei test precedenti e successivamente miscelati con un mixer automatico, mantenendo gli stessi parametri operativi impiegati fino a questo momento. Le soluzioni sono state applicate sui vetrini utilizzando una pipetta Pasteur.

Per questo test sono state selezionate tre diverse velocità di spinning al fine di valutare l'effetto della velocità sullo spessore del rivestimento. La soluzione al 50%wt è stata depositata su tre vetrini differenti, sottoposti alle seguenti condizioni di spinning:

- uno a 120 rps per 5 secondi di rampa e 10 secondi di spinning.
- uno a 180 rps per 5 secondi di rampa e 10 secondi di spinning.
- uno a 200 rps per 5 secondi di rampa e 10 secondi di spinning.

Lo stesso procedimento è stato replicato utilizzando la soluzione all'60%wt. Infine i campioni vengono lasciati ad asciugare a temperatura ambiente per circa 72 ore.

4.3.2 Rivestimenti di Durazane 1800 e PVP

Dopo aver realizzato i diversi rivestimenti compositi a base di Durazane 1800 e nSiO₂-AgNPs, si è deciso di testare l'utilizzo di un polimero sintetico: il polivinilpirrolidone (PVP).

La decisione di sviluppare un nuovo rivestimento è stata motivata dai risultati ottenuti dai test sulle nanoparticelle di silice/argento descritti nel *Capitolo 5*: il coating non presentava un livello di porosità sufficiente a garantire un'esposizione efficace delle nanoparticelle di argento in superficie. Pertanto, l'obiettivo principale dei successivi esperimenti è quello di progettare un rivestimento poroso che possa fungere da matrice adeguata per l'inserimento e la corretta distribuzione delle nanoparticelle di silice/argento.

In un lavoro di *Konegger et al.*, è stato sviluppato un rivestimento ceramico combinando una matrice a base di precursore ceramico di polisilazane (PSZ) con microgranuli di un riempitivo sacrificale (UHMWPE) [77].

La tecnica del riempitivo sacrificale prevede la miscelazione del polimero preceramico con microparticelle che vengono successivamente rimosse durante il trattamento termico ad alta temperatura, generando un rivestimento ceramico poroso.

Questa tecnica risulta particolarmente rilevante per il presente studio, poiché la creazione di un rivestimento ceramico poroso facilita l'incorporazione delle nanoparticelle di silice/argento, aumentando le probabilità che il rivestimento finale possieda proprietà antibatteriche.

Come si vede in figura di seguito, i risultati ottenuti da *Konegger et al.* dimostrano come, a seguito dell'utilizzo del filler sacrificale, si sia generato un network di pori interconnessi:

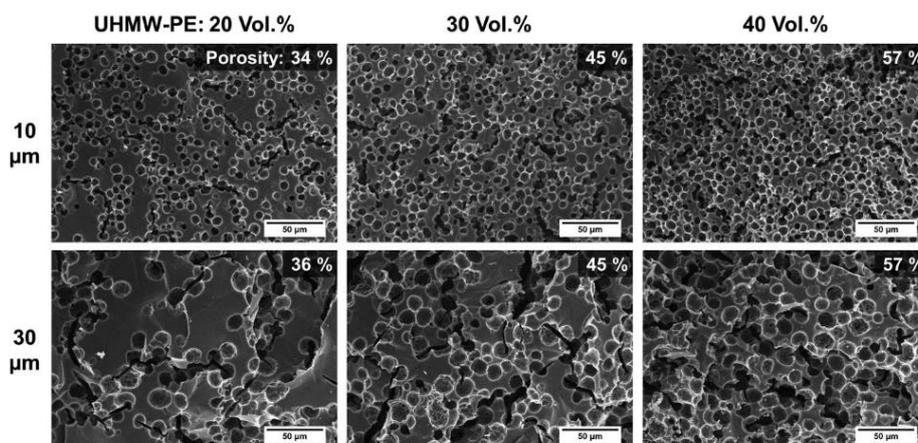


Figura 17: Morfologia della superficie di rivestimento derivato da PSZ/UHMWPE, in funzione della quantità di riempitivo sacrificale.

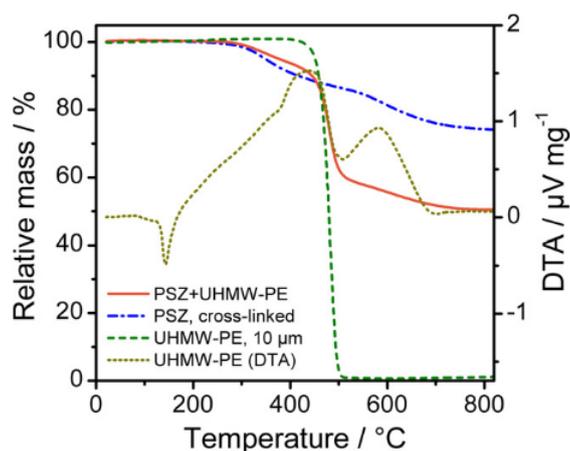


Figura 18: Analisi termica (TG/DTA) di campioni: PSZ/UHMWPE, PSZ reticolato puro, UHMWPE puro.

Kockzur *et al.* hanno condotto una simulazione di dinamica molecolare atomistica (MD) su nanoparticelle di Ag ricoperte con oligomeri di PVP di lunghezze di catena differenti, dimostrando che il PVP agisce come agente stabilizzante nella sintesi di nanoparticelle metalliche, come agente di controllo della forma, favorendo la crescita di alcune facce cristalline mentre ne impedisce lo sviluppo di altre. Lo studio ha inoltre evidenziato che il PVP, quando è da solo, si decompone in aria intorno ai 400 °C, mentre quando è legato a nanoparticelle di Ag, le temperature di decomposizione variano tra 200 °C e 400 °C [78].

Partendo dallo studio di Konegger *et al.*, si è deciso di utilizzare il Durazane 1800 come precursore ceramico e il PVP come filler sacrificale. La scelta si è basata in parte sul confronto delle densità: la densità del PSZ (1,02 g/cm³) e del Durazane 1800 (0,95-1,05 g/cm³) sono abbastanza simili; così come lo sono le densità dell'UHMWPE (0,94 g/cm³) e del PVP (1,04 g/cm³).

Rivestimento n°1 Durazane 1800 - PVP

Il primo test ha visto la preparazione di un rivestimento impiegando Durazane 1800 come matrice di base. Per la sintesi, sono stati utilizzati 1g di Durazane 1800 e 0,3g di PVP, corrispondente a una concentrazione del 30% in peso rispetto al Durazane 1800.

Il protocollo di sintesi è uguale per tutti i test eseguiti e corrisponde a quello descritto in *Tab.I*.

Nella *Tab.V* è possibile osservare la quantità dei reagenti utilizzati durante il processo:

Tabella V: Reagenti utilizzati nella sintesi del rivestimento.

Nome Composto	Quantità Utilizzata
Durazane 1800	1 g
PVP	0,3 g

La miscelazione è stata effettuata tramite mixing automatico, seguendo il seguente protocollo:

1. Prima fase di miscelazione: 2 minuti a 1000 rpm.

2. Prima fase di defoaming: 2 minuti a 1000 rpm.
3. Seconda fase di miscelazione: 2 minuti a 1000 rpm.
4. Seconda fase di defoaming: 30 secondi a 1400 rpm.

La soluzione preparata è stata depositata mediante pipetta su substrati di allumina, i quali sono stati successivamente sottoposti a un trattamento termico in forno a 500°C per una durata di 60 minuti. Questo è un passaggio cruciale per conferire porosità alla matrice, poiché la decomposizione termica del polivinilpirrolidone (PVP) genera dei vuoti nella struttura. Al termine del trattamento, è stato osservato un cambiamento di colore dei campioni, che da bianco è passato a nero carbone. Questo fenomeno potrebbe essere attribuito alla formazione di residui di decomposizione del PVP durante la combustione.

Rivestimento n°2 Durazane 1800 - PVP

Dopo i risultati ottenuti con il precedente rivestimento, è emersa la necessità di ridurre la temperatura del trattamento termico, poiché una temperatura di 500°C sembrava favorire la formazione di cricche nel materiale.

Per valutare l'effetto di diverse concentrazioni di PVP, è stato sviluppato un secondo test.

In questo caso, sono state preparate quattro soluzioni contenenti rispettivamente il 30%wt, 40%wt, 50%wt e 60%wt di PVP per ogni grammo di Durazane 1800, seguendo lo stesso protocollo di miscelazione utilizzato per il rivestimento precedente. Le fasi di mixing e defoaming sono state eseguite secondo la stessa sequenza temporale e di velocità, garantendo l'omogeneità delle soluzioni preparate.

Successivamente, le quattro soluzioni sono state depositate su substrati di allumina e sottoposte a un trattamento termico ridotto a 350°C per 60 minuti, allo scopo di minimizzare la formazione di cricche e di migliorare la stabilità strutturale dei rivestimenti. Questa riduzione della temperatura è stata progettata per preservare l'integrità del materiale, mantenendo al contempo la capacità del PVP di creare vuoti all'interno della matrice ceramica.

Rivestimento n°3 Durazane 1800 – PVP

Dai test precedenti è stato possibile sviluppare un rivestimento a base di Durazane 1800 e nSiO₂-AgNPs con uno spessore estremamente sottile, grazie all'impiego della tecnica dello spin coating. Tuttavia, è stato osservato che, nonostante lo spessore ridotto, il rivestimento ingloba in modo eccessivo le nanopolveri, impedendo all'argento di esporre ioni sulla superficie.

L'analisi ha indicato che la causa di questo problema non risiede nello spessore del rivestimento, che si è dimostrato adeguato, ma piuttosto nella sua struttura non porosa. L'obiettivo del presente test è, quindi, ottenere un rivestimento che sia sia sottile sia poroso.

Per raggiungere tale obiettivo, si prevede di utilizzare il PVP (polivinilpirrolidone) disperso in una matrice di Durazane 1800, in combinazione con lo spin coating, tecnica che fino a questo momento non era stata ancora testata con il PVP.

Sono stati preparati quattro rivestimenti contenenti concentrazioni di PVP pari al 30%wt, 40%wt, 50%wt e 60%wt per ogni grammo di Durazane 1800. La procedura di preparazione ha seguito i medesimi parametri di miscelazione automatica e preparazione delle polveri utilizzati nelle prove precedenti.

I campioni sono stati successivamente depositati su carta alluminio, anziché su vetrini da laboratorio, in quanto questi ultimi non sono idonei al trattamento termico. Una volta depositati, i campioni sono stati sottoposti a spin coating con una velocità di 180 rps, utilizzando una rampa di accelerazione di 5 secondi e una fase di spinning di 10 secondi.

Infine, è stato eseguito un trattamento termico sui campioni a una temperatura di 350°C per una durata di 60 minuti.

4.3.3 Rivestimenti di Durazane 1800, PVP e nSiO₂-AgNPs

E' stato realizzato un ultimo rivestimento contenente tutti e tre i reagenti utilizzati, con lo scopo di racchiudere tutte le proprietà raccolte fino ad'ora: la porosità del coating (grazie all'aggiunta del PVP) e il suo effetto antibatterico (grazie all'aggiunta delle nSiO₂-AgNPs).

Nella *Tab.VI* è possibile osservare la quantità dei reagenti utilizzati durante il processo:

Tabella VI: Reagenti utilizzati nella sintesi del rivestimento.

Nome Composto	Quantità Utilizzata
Durazane 1800	1 g
PVP	0,3 g
nSiO ₂ -AgNPs NC	0,3 g
nSiO ₂ -AgNPs NC	0,4 g

E' stato pesato: 1g di Durazane 1800; il 30%wt di PVP, poiché da precedenti analisi questa percentuale permetteva di ottenere un adeguato livello di porosità della matrice; il 30%wt e 40%wt di nSiO₂-AgNPs NC (precedentemente sintetizzate) per valutare quale sia la percentuale migliore. Dunque sono stati realizzati due tipi di substrati, uno contenente il 30%wt e uno contenente il 40%wt di polveri.

Sono stati usati i medesimi metodi, utilizzati nei test precedenti, per pesare e miscelare i reagenti.

Questi nuovi rivestimenti mostrano una densità superiore ai precedenti, dovuta alla maggiore quantità di polveri disperse nella matrice; un importante fenomeno di aggregazione delle polveri, che genera delle difficoltà durante la deposizione sul substrato.

Come substrato è stato utilizzato il silicio, il quale resiste ad alte temperature.

Sono stati realizzati diversi campioni, caratterizzati dalle seguenti condizioni di spinning:

- 40rps, 25s di rampa e 10s di spinning, per il campione contenente 0,3g di PVP e 0,3g di nSiO₂-AgNPs
- 60rps, 5s di rampa e 10s di spinning, per il campione contenente 0,3g di PVP e 0,3g di nSiO₂-AgNPs

- 60rps, 5s di rampa e 10s di spinning, per il campione contenente 0,3g di PVP e 0,4g di nSiO₂-AgNPs
- 80rps, 25s di rampa e 10s di spinning, per il campione contenente 0,3g di PVP e 0,3g di nSiO₂-AgNPs
- 80rps, 25s di rampa e 10s di spinning, per il campione contenente 0,3g di PVP e 0,4g di nSiO₂-AgNPs
- 180rps, 5s di rampa e 10s di spinning, per il campione contenente 0,3g di PVP e 0,3g di nSiO₂-AgNPs
- 180rps, 5s di rampa e 10s di spinning, per il campione contenente 0,3g di PVP e 0,4g di nSiO₂-AgNPs

Infine, è stato eseguito un trattamento termico sui campioni ad una temperatura di 350°C per una durata di 60 minuti.

4.4 Tecniche di caratterizzazione

Uno degli obiettivi principali di questo studio è valutare se i campioni ottenuti, sia sotto forma di nanopolveri che di rivestimenti, presentino specifiche caratteristiche e proprietà. In particolare, si intende determinare se le nanoparticelle di silice nanometrica rivestite con nanoparticelle d'argento ($n\text{SiO}_2/\text{AgNPs}$) siano presenti e intatte all'interno della matrice polimerica, se il coating mostri segni di porosità e/o cricche, e se sia possibile osservare la presenza di argento sulla superficie del rivestimento.

Per raggiungere questi obiettivi, sono state utilizzate diverse tecniche di analisi e caratterizzazione su tutti i campioni, tra cui:

1. **Microscopia Elettronica a Scansione con Sorgente a Emissione di Campo (FESEM):** utilizzata per studiare in dettaglio la morfologia superficiale delle nanoparticelle e dei rivestimenti;
2. **Spettrometria per Dispersione di Energia (EDS):** impiegata come tecnica di analisi composizionale per confermare la presenza di argento nei campioni.

4.5 Test Antibatterici

Per valutare l'attività antibatterica, sia delle nanoparticelle di silice decorate con nanoparticelle d'argento ($n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$) sia dei rivestimenti, è stato eseguito un test di inibizione batterica basato sulla formazione di aloni (NCCLS M2-A9)[79]. Questo metodo consente una valutazione qualitativa della capacità del campione di inibire la crescita batterica, osservando la formazione di un'area priva di colonie batteriche attorno al campione, a contatto con un determinato ceppo batterico. Nel presente lavoro di tesi, il ceppo batterico utilizzato è lo *Staphylococcus epidermidis*.

Per eseguire i vari test antibatterici, è stato preparato un brodo batterico con un indice di torbidità pari a 0.5 su scala McFarland, equivalente a una concentrazione di circa (10^8) unità formanti colonie (CFU) per millilitro. Questa sospensione batterica è stata distribuita uniformemente su una piastra di Agar Mueller-Hinton. Una volta che le colonie batteriche si sono sviluppate sulla piastra, i campioni sono stati posizionati sopra di essa.

I rivestimenti sono stati posti in contatto con la piastra tramite la porzione dei substrati ricoperti di coating. La piastra è stata poi incubata a 37°C e l'attività antimicrobica dei campioni è stata valutata a 24 e 48 ore, osservando la presenza di un'area priva di batteri attorno ai campioni.

5 Risultati

I risultati che seguiranno fanno riferimento ad analisi morfologiche e composizionali effettuate al FESEM. La preparazione dei campioni per il FESEM è stata uguale per tutti i rivestimenti:

1. Su uno stub è stato posto il carbon tape e su quest'ultimo viene attaccato il campione;
2. Si pone una piccola quantità di colla d'argento tra una porzione del rivestimento e una porzione dello stub, generando un ponte di collegamento;
3. Viene depositato il platino sulla superficie del rivestimento, tramite sputtering.

La colla d'argento serve a creare un ponte tra il rivestimento e il carbon tape. Il carbon tape insieme al platino fanno sì che ci sia un flusso di elettroni omogeneo su tutta la superficie del rivestimento, in modo tale che le immagini al FESEM siano chiare e visibili.

5.1 Rivestimenti di Durazane 1800 e $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$

La sfida principale di questo studio risiede nello sviluppo di un rivestimento finale altamente omogeneo, in cui le nanopolveri siano disperse in modo efficace all'interno della matrice del polimero preceramico Durazane 1800. L'ottenimento di una struttura porosa rappresenta un obiettivo cruciale, poiché un rivestimento con una porosità adeguata favorirebbe sia una migliore dispersione delle nanoparticelle che un'esposizione ottimale degli ioni argento sulla superficie.

Rivestimento n°1 Durazane 1800 - $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$

Il primo test ha svolto un ruolo cruciale come punto di partenza per i successivi esperimenti, poiché ha consentito di identificare i punti di forza dei reagenti, nonché di ottimizzare le concentrazioni e i parametri di preparazione.

In *Fig.19* si osserva come appaiono i rivestimenti dopo aver atteso il tempo di trasformazione del Durazane 1800 in una matrice di polisilazano-silice (circa 72 ore).

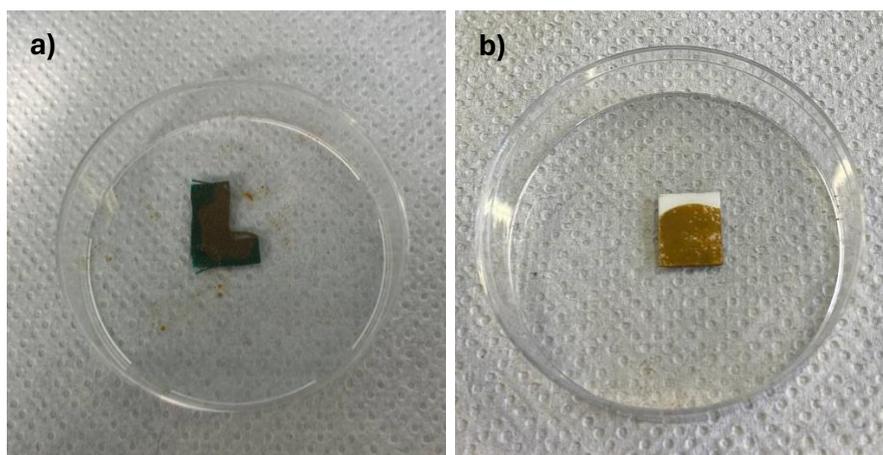


Figura 19: Substrato di (a) cotone e (b) allumina rivestiti da silice a partire dal precursore pre-ceramico Durazane 1800 funzionalizzato con $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$.

Analisi morfologica e composizionale

Le micrografie ottenute tramite FESEM sono state analizzate a distanza di 7 giorni dalla preparazione dei campioni. Il rivestimento in allumina ha presentato difficoltà di visualizzazione a causa della sua bassa conduttività; tuttavia, si è potuto notare che il coating risulta essere molto denso e caratterizzato da una significativa presenza di cricche. Le nanoparticelle di silice appaiono distribuite in modo non uniforme, sebbene sia stata confermata la presenza di nanoparticelle d'argento.

Per quanto riguarda il rivestimento su tessuto di cotone, si riscontra uno strato talmente spesso da coprire completamente le fibre del materiale. Una situazione diversa è stata riscontrata nel caso del rivestimento sottile applicato su cotone (cotone UD), dove le fibre sono quasi interamente riconoscibili e le nanoparticelle di silice ben visibili. Questo fenomeno è presumibilmente dovuto al fatto che lo spessore ridotto del coating consente una distribuzione più evidente delle nanoparticelle sulla superficie.

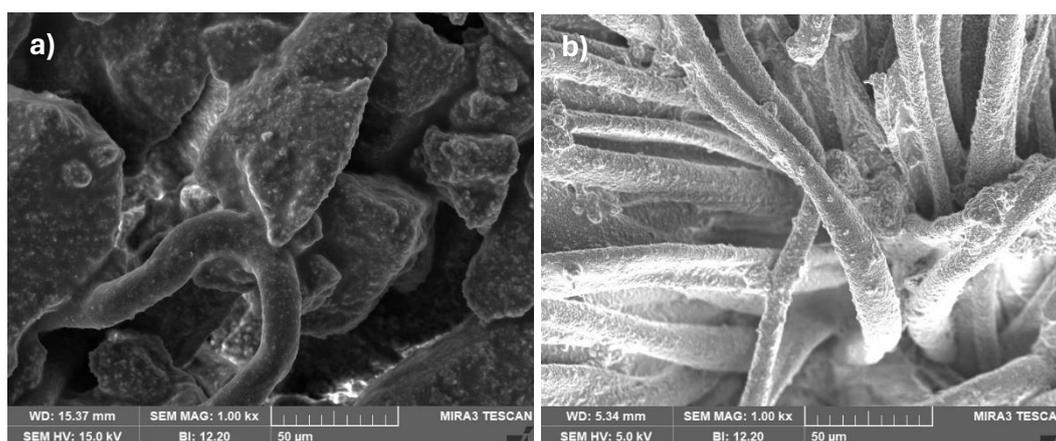


Figura 20: Micrografia FESEM a 1.00 kx dei rivestimenti di silice ottenuti miscelando il Durazane 1800 con le $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs NC}$ su (a) substrato di cotone, (b) substrato di cotone UD.

Per confermare la presenza delle nanoparticelle di argento (AgNPs) sulla superficie del rivestimento di cotone UD, è stata eseguita un'analisi composizionale sia di area che puntuale mediante spettroscopia a dispersione di energia (EDS). In Fig.21 vengono mostrati i punti da cui sono stati ottenuti gli spettri EDS, che risultano essere più brillanti e, nella Tab.VII, si riportano i relativi risultati. E' importante notare che nell'analisi è stato rilevato argento.

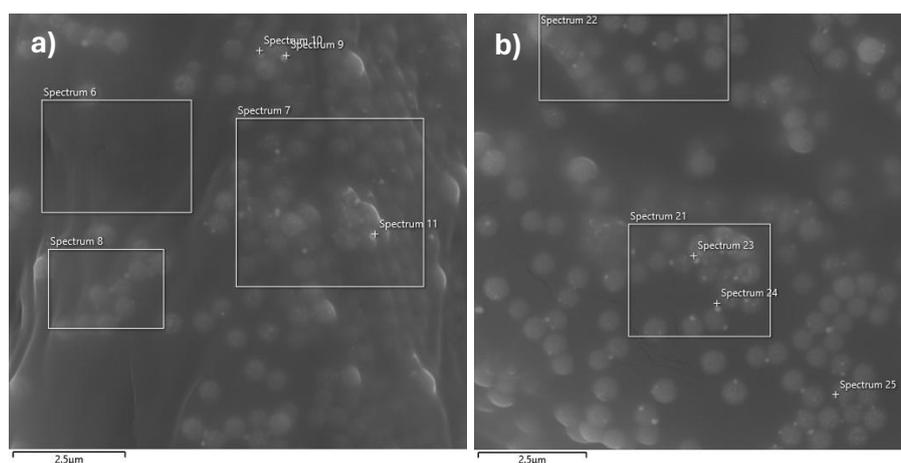


Figura 21: Analisi puntuale EDS. Immagine FESEM associata all'analisi EDS dei substrati di (a) cotone con rivestimento più spesso, (b) cotone UD con rivestimento più sottile. Gli spettri di area sono stati ottenuti dai riquadri, quelli puntuali dalle croci.

Tabella VII: Analisi puntuale EDS. Percentuale atomica dell'argento presente nei rivestimenti Dur-nSiO₂-AgNPs.

	Ag (% Atomica)	
	Cotone	Cotone UD
Spettro 9	0,93	/
Spettro 10	0,76	/
Spettro 11	1,21	/
Spettro 23	/	3,73
Spettro 24	/	7,3

Dall'analisi della tabella emerge che in entrambi i rivestimenti è stata rilevata la presenza di argento. In particolare il campione in cotone mostra una bassa percentuale di argento, confermando l'ipotesi che lo strato di coating era troppo spesso, impedendo la visibilità delle fibre di cotone sottostanti. Al contrario, il campione in cotone UD, presenta una percentuale atomica di argento significativamente più elevata, pari a circa il 7%, evidenziando come il rivestimento più sottile favorisca una migliore esposizione delle AgNPs.

Test Antibatterici

E' stato condotto un test dell'alone di inibizione per verificare che le AgNPs identificate possano aver reso il coating antibatterico. I campioni sono stati collocati su una piastra di Agar Mueller-Hinton, posizionando il lato rivestito a diretto contatto con il batterio *Staphylococcus epidermidis*.

Dopo un periodo di incubazione di 48 ore a 37°C, non è stato osservato alcun effetto antibatterico sia nei rivestimenti in cotone, sia nei rivestimenti in cotone UD (Fig. 22). La spiegazione potrebbe essere che, nonostante sia stata rilevata presenza di argento, questo sia in maggior quantità all'interno del coating piuttosto che in superficie, di conseguenza non ci sono i presupposti per una antimicrobicITÀ.

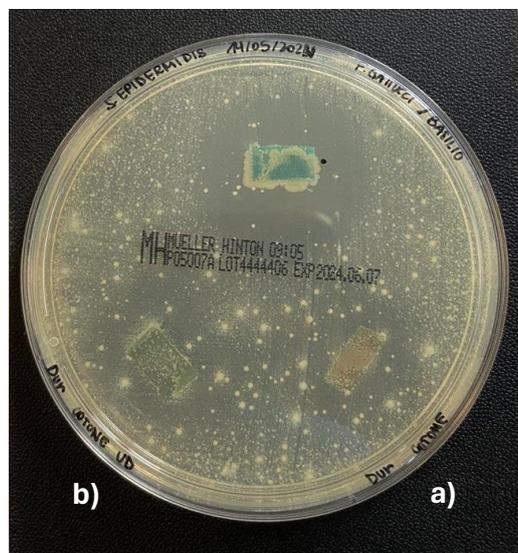


Figura 22: Risultati del Test dell'alone Antibatterico dopo 48 ore di incubazione a 37 °C per i rivestimenti (a) cotone, (b) cotone UD.

Rivestimento n°2 Durazane 1800 - nSiO₂-AgNPs

La transizione dalla miscelazione manuale a quella automatica, insieme all'adozione della tecnica dello spin coating a velocità variabili, ha evidenziato un miglioramento significativo nella distribuzione delle nanoparticelle all'interno della matrice.

In *Fig.23* si osserva come appare il rivestimento dopo aver atteso il tempo di trasformazione del Durazane 1800 in una matrice di polisilazano-silice (circa 72 ore).

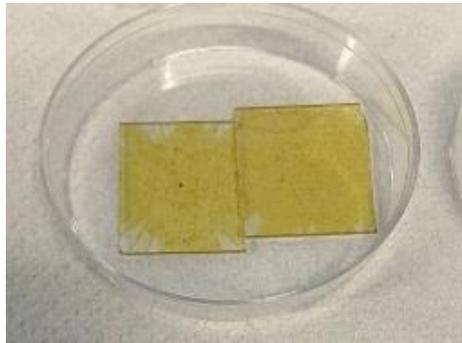


Figura 23: Substrati in vetro rivestiti da silice a partire dal precursore pre-ceramico Durazane 1800 funzionalizzato con nSiO₂-AgNPs.

Analisi morfologica e composizionale

Di seguito vengono riportate le micrografie FESEM:

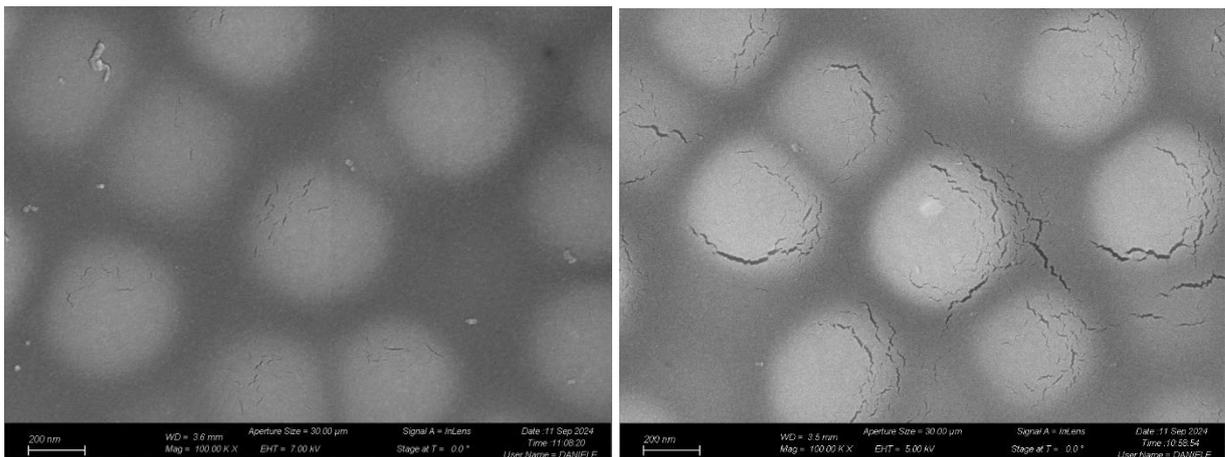


Figura 24: micrografia FESEM dei rivestimenti di silice funzionalizzati con nSiO₂-AgNPs NC al 60% in peso, (a) 50rps - 100.00kX, (b) 85rps - 100.00kX

È stato possibile esaminare al FESEM esclusivamente i campioni con una concentrazione di nSiO₂-AgNPs pari al 60% in peso, poiché gli altri campioni risultavano scarsamente visibili. L'analisi effettuata al FESEM ha evidenziato una caratteristica comune nei rivestimenti depositati sia alla velocità di 50 rps sia a quella di 85 rps: le nanoparticelle di silice (con dimensioni comprese tra 200 e 300 nm) risultano essere eccessivamente ricoperte dal coating applicato, limitandone l'esposizione in superficie.

Questo fenomeno potrebbe essere attribuito a uno spessore del coating relativamente elevato rispetto alla dimensione delle nanoparticelle, rendendo difficile l'osservazione delle nanoparticelle d'argento (di dimensioni comprese tra 40 e 50 nm) che dovrebbero essere legate alla nanosilice.

Per migliorare l'esposizione delle nSiO₂-AgNPs sulla superficie, si propone di ridurre lo spessore del coating incrementando la velocità di spinning, una modifica che potrebbe facilitare la visualizzazione delle nanoparticelle sulla superficie del rivestimento.

Rivestimento n°3 Durazane 1800 - $nSiO_2$ -AgNPs

Al termine del processo di asciugatura, il rivestimento si presenta come un sottile strato semitrasparente di colore ocra, come mostrato in Fig.25. L'impiego dello spin coating a velocità superiori ha prodotto, sulla base di un'analisi visiva, un rivestimento significativamente più sottile rispetto a quello ottenuto precedentemente. Inoltre, l'assenza di agglomerati di polveri sul substrato suggerisce una maggiore omogeneità del coating.

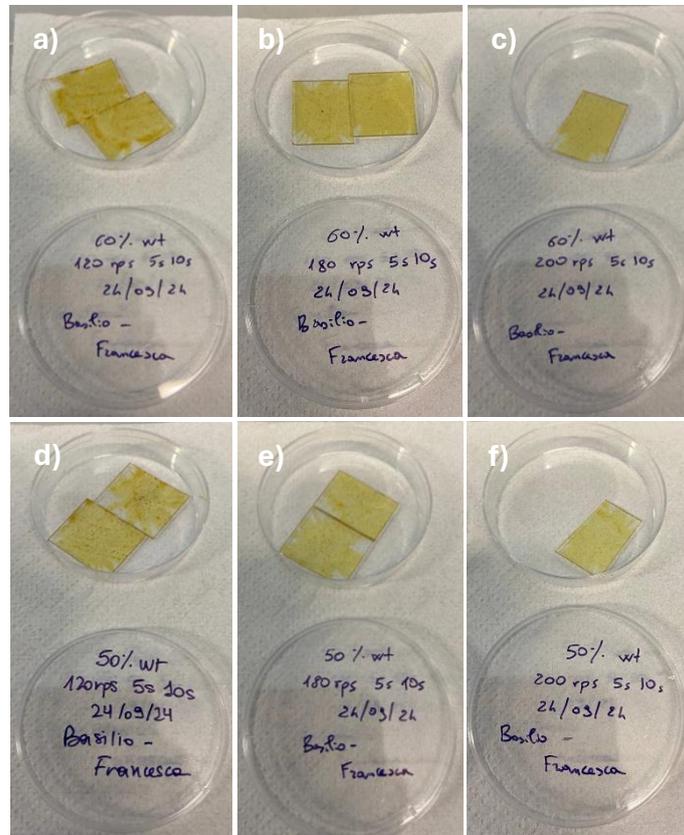


Figura 25: Rivestimento di AgNPs/ $nSiO_2$ su vetrini: a) 60%wt a 120rps; b) 60%wt a 180rps; c) 60%wt a 200rps; d) 50%wt a 120rps; e) 50%wt a 180rps; f) 50%wt a 200rps.

E' stato fatto un trattamento al plasma sul campione al 60%wt a 200rps, la durata del trattamento è stata di circa 5 minuti. Lo scopo era rimuovere un sottile strato di coating in superficie senza intaccare la nanosilice e funzionalizzandola, così facendo le nanoparticelle dovrebbero esporre più facilmente in superficie.

Successivamente il campione verrà sottoposto al test dell'alone di inibizione per valutare l'efficacia del trattamento.

Test Antibatterici

È stato condotto un test antibatterico sui coating costituiti da Durazane combinato con nanopolveri di silice e argento, al fine di valutare le proprietà antibatteriche del materiale.

Il test è stato effettuato anche sul coating precedentemente trattato al plasma.

I campioni sono stati collocati su una piastra di Agar Mueller-Hinton, posizionando il lato rivestito a diretto contatto con il batterio *Staphylococcus epidermidis*.

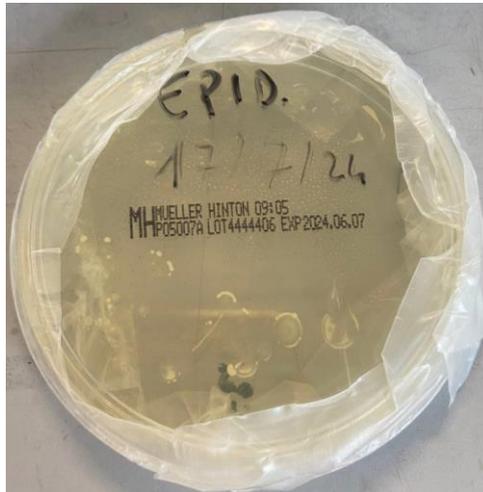


Figura 26: Piastra Agar Muller-Hilton con colonia batterica appartenente a *Staphylococcus epidermis*.

Dopo un periodo di incubazione di 48 ore a 37°C, non è stato osservato alcun effetto antibatterico nei rivestimenti testati (Fig.27). La crescita delle colonie batteriche si è verificata in maniera uniforme sulla superficie di tutti i campioni analizzati.

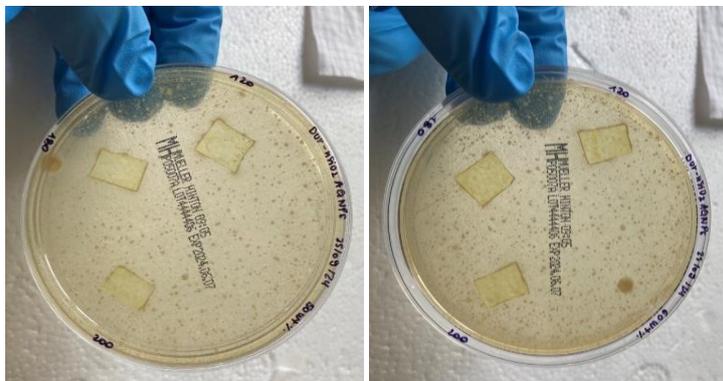


Figura 27: Risultati del test dell'alone antibatterico dopo 48 ore di incubazione a 37 °C per i rivestimenti (a) 50%wt a 120rps/180rps/200rps, (b) 60%wt a 120rps/180rps/200rps.



Figura 28: Risultati del test dell'alone antibatterico dopo 48 ore di incubazione a 37 °C per il rivestimento al 60%wt a 200rps (cerchiato in rosso) che ha subito un trattamento al plasma.

Considerando che, in questo esperimento, sono state utilizzate velocità di spinning superiori rispetto a quelle adottate nei test precedenti, si può dedurre che l'assenza di attività antibatterica non è imputabile allo spessore del coating, che risulta essere estremamente sottile, ma piuttosto alla scarsa capacità delle nanoparticelle di argento di raggiungere la superficie del rivestimento.

Non si riscontra alcun effetto anche nel campione trattato al plasma, probabilmente il getto del plasma non era adeguato a rimuovere un significativo strato di coating in superficie.

La ridotta porosità del coating rappresenta quindi una delle cause principali della mancata attività antimicrobica dei campioni testati.

5.2 Rivestimenti di Durazane 1800 e PVP

I tre test eseguiti hanno mostrato una chiara dipendenza della struttura del rivestimento dalla temperatura di trattamento termico e dalla concentrazione di PVP utilizzata.

L'introduzione del polivinilpirrolidone (PVP) come agente sacrificale si è dimostrata efficace in alcuni dei rivestimenti realizzati, rappresentando una strategia valida per la generazione di rivestimenti porosi. Questo approccio può facilitare l'esposizione delle nanoparticelle di nanosilice e argento (nSiO₂-AgNPs), sia all'interno della matrice del rivestimento che sulla sua superficie.

Rivestimento n°1 Durazane 1800 - PVP

Anche in questo caso la transizione dalla miscelazione manuale a quella automatica ha evidenziato un miglioramento significativo nella distribuzione delle nanoparticelle all'interno della matrice. Tuttavia i risultati di questo primo test non sono molto promettenti.

Analisi morfologica e composizionale

Di seguito le micrografie FESEM dei campioni realizzati miscelando 1g di Durazane 1800 con 0,3g di PVP:

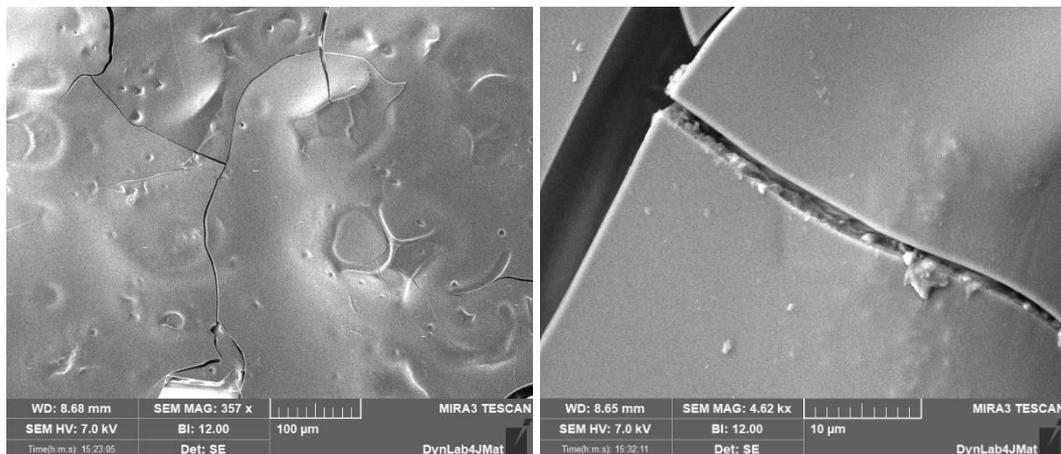


Figura 29: micrografia FESEM dei rivestimenti di Durazane 1800 funzionalizzati con PVP al 30%wt, 500°C di TT.

Dalla *Fig.29* si osserva che il rivestimento presenta una significativa quantità di cricche e una scarsa porosità, sia all'interno della matrice sia sulla superficie. Questo comportamento può essere attribuito alle elevate temperature di trattamento (500°C), che tendono a compromettere la struttura del materiale ceramico, e alla bassa concentrazione di PVP nella matrice, insufficiente a promuovere la formazione di una rete porosa adeguata.

Rivestimento n°2 Durazane 1800 - PVP

Visti i risultati del precedente test, si è deciso di ottimizzare i parametri di sintesi dei rivestimenti, in particolare la concentrazione del PVP all'interno della matrice di Durazane 1800 e la temperatura di curing.

Si è evidenziato che una temperatura di 500°C è eccessiva, generando numerose cricche, dunque si è passati ad una temperatura di 350°C.

Inoltre sono stati testati 4 coating a concentrazioni di PVP diverse per ogni grammo di Durazane 1800.

Analisi morfologica e composizionale

L'analisi delle micrografie FESEM presentate in *Fig.30* evidenzia che i rivestimenti sono caratterizzati da una ridotta quantità di crepe e dalla presenza di crateri sulla superficie, suggerendo una possibile porosità interna del coating.

In particolare, i rivestimenti che contengono una percentuale di PVP pari al 30%wt e al 50%wt si sono dimostrati i più promettenti. Quest'ultimi, se analizzati nelle fessure delle crepe, mostrano un ambiente molto poroso e costituito da cavità di diverse dimensioni.

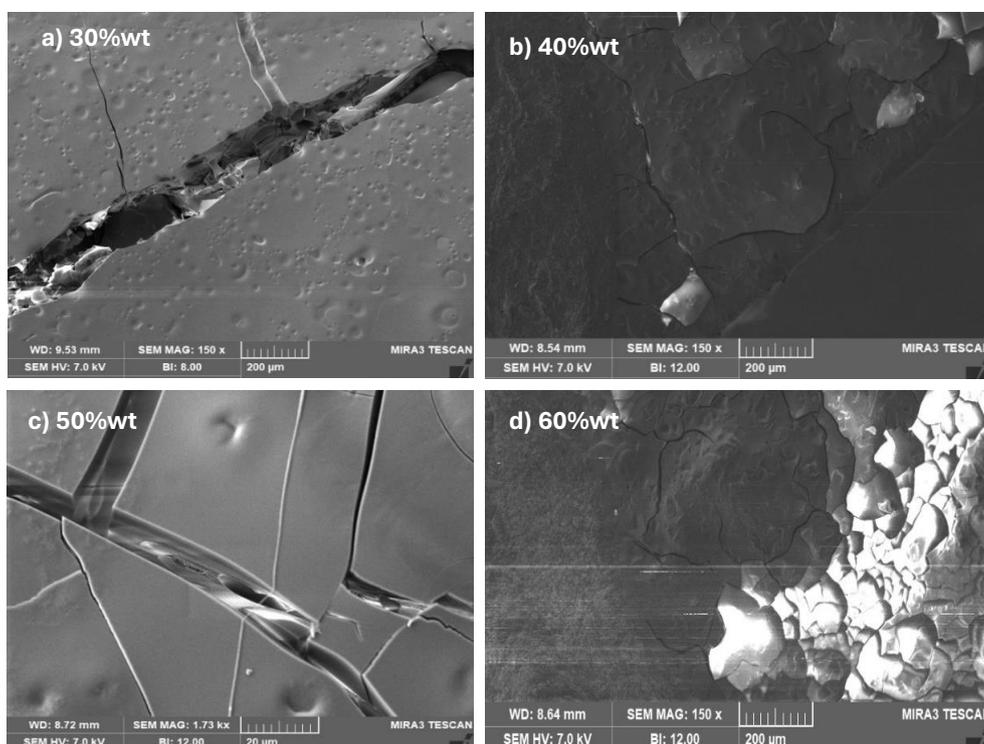


Figura 30: micrografia FESEM dei rivestimenti di Durazane 1800 funzionalizzati con PVP a diverse concentrazioni: (a) 30%wt / 150.00kX, (b) 40%wt / 150.00kX, (c) 50%wt / 1.73kX, (d) 60%wt / 150.00kX.

Confrontando le micrografie FESEM di questi campioni trattati a 350°C con quelli trattati a 500°C, si può dedurre che una minore temperatura di TT è più adeguata, poiché genera un numero minore di cricche nel rivestimento e una migliore struttura ceramica interna.

Rivestimento n°3 Durazane 1800 - PVP

All'uscita da forno i campioni si presentano di colore nero, probabilmente a causa di residui di decomposizione, sono mostrati in Fig.31:

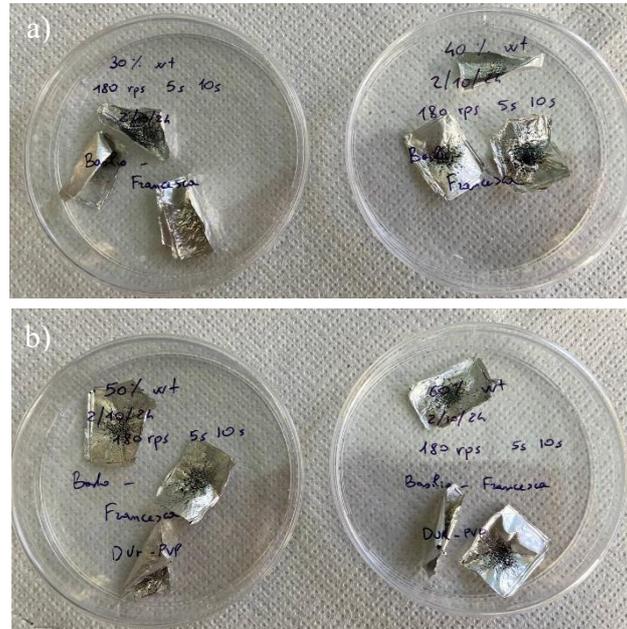


Figura 31: rivestimenti ottenuti a partire dal precursore pre-ceramico Durazane 1800 funzionalizzato con PVP, (a) 30%wt e 40%wt a 180rps, (b) 50%wt e 60%wt a 180rps.

I rivestimenti non risultano omogenei, vi sono agglomerati di polveri, pertanto il materiale non si è depositato correttamente.

5.3 Rivestimenti di Durazane 1800, PVP e nSiO₂-AgNPs

Alla luce dei precedenti risultati, ci si aspetta che questo rivestimento abbia una maggiore porosità e, di conseguenza, un effetto antibatterico.

In Fig.32 vengono mostrati come appaiono i campioni all'uscita dal forno:

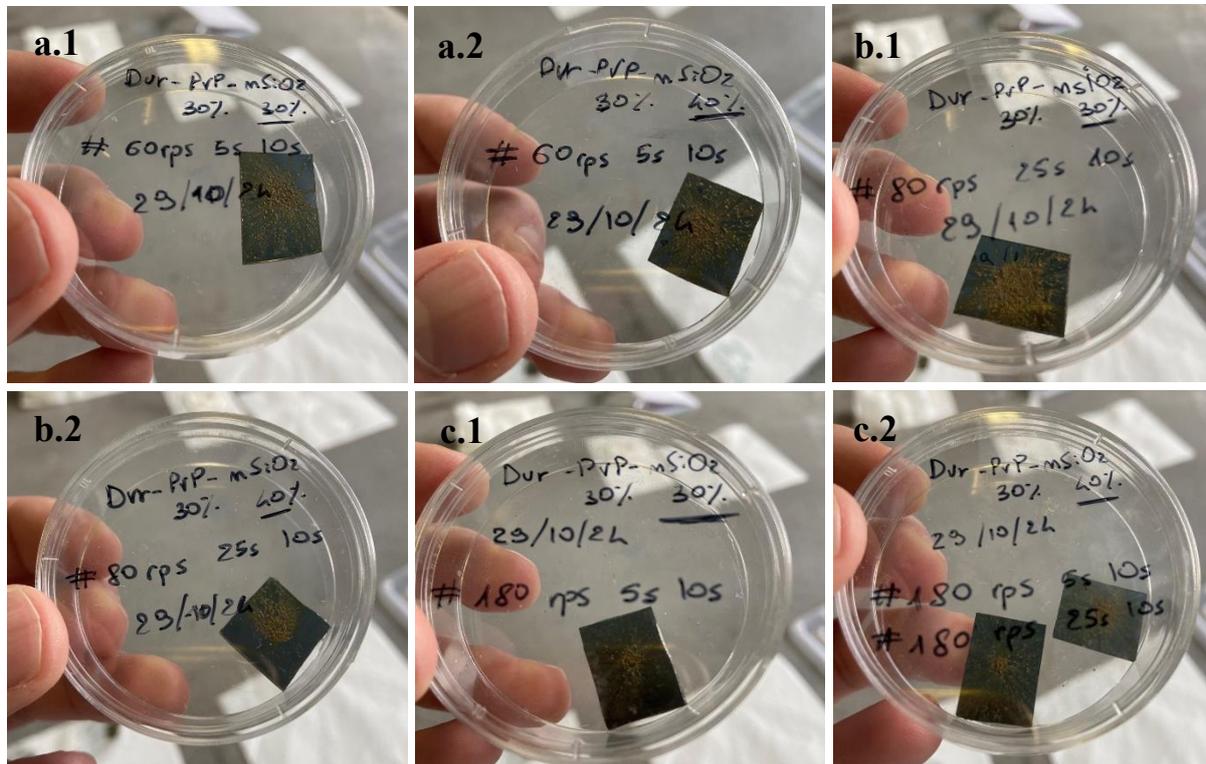


Figura 32: rivestimenti ottenuti a partire dal precursore pre-ceramico Durazane 1800 funzionalizzato con PVP e nSiO₂-AgNPs a diverse percentuali in peso. Velocità di deposizione: (a.1,a.2) 60rps, (b.1,b.2) 80rps, (c.1,c.2) 180rps.

Alla vista i rivestimenti risultano poco omogenei, nella fase di deposizione si sono formati degli agglomerati di polveri.

Analisi morfologica e composizionale

A seguito dell'analisi delle micrografie FESEM presentate in Fig.33, i rivestimenti risultano ancora incompatibili con l'obiettivo prefissato.

I campioni in superficie risultano disomogenei: vi sono zone con agglomerati di nanoparticelle e zone in cui queste non si vedono.

Questo fenomeno è sicuramente dovuto ad una deposizione non adeguata sui substrati ed ad una presenza massiva di polveri in una matrice che le ricopre eccessivamente.

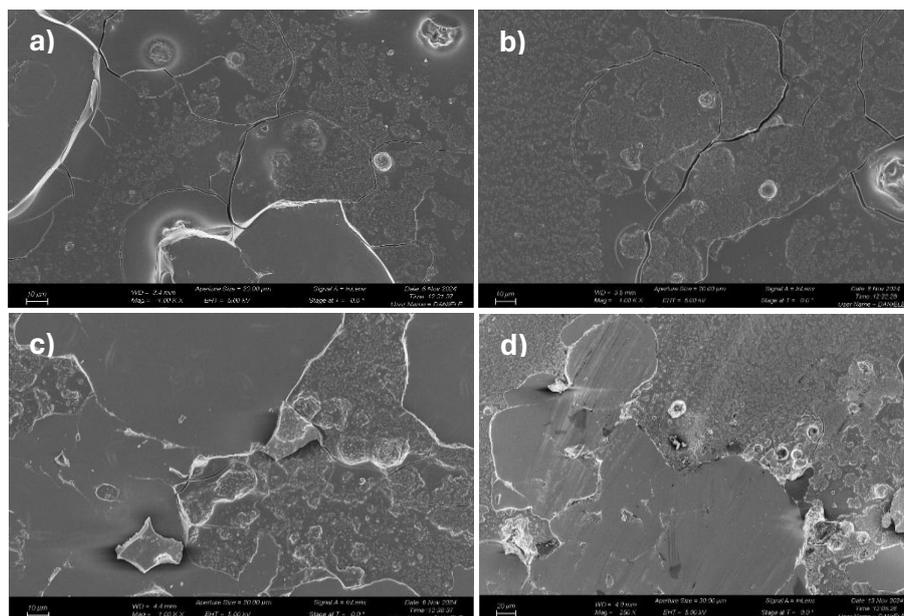


Figura 33: micrografia FESEM dei rivestimenti di Durazane 1800 funzionalizzati con PVP e $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$. Campioni: (a) 30%wt di PVP, 30%wt di $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, 180rps; (b) 30%wt di PVP, 40%wt di $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, 180rps; (c) 30%wt di PVP, 30%wt di $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, 60rps; (d) 30%wt di PVP, 30%wt di $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, 80rps.

Le micrografie in Fig.34, invece, permettono di analizzare l'interno della matrice.

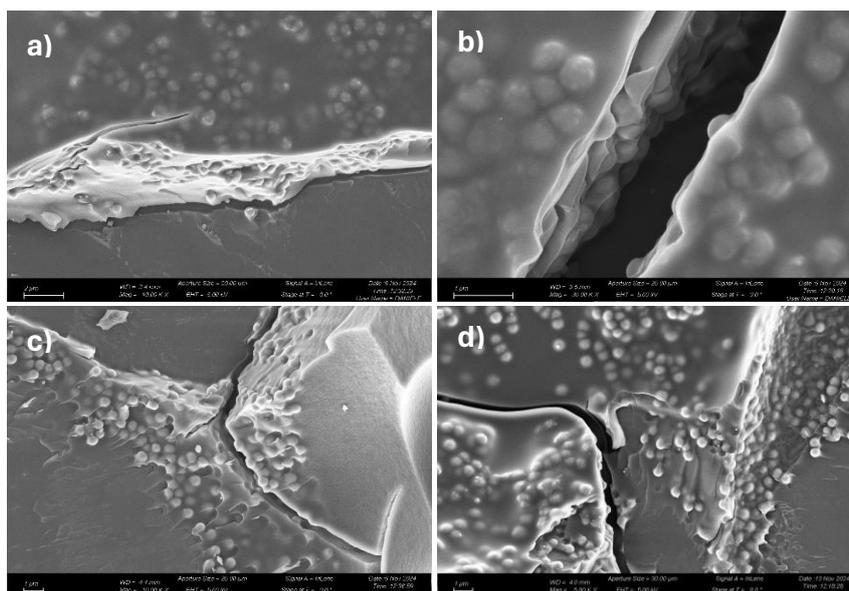


Figura 34: micrografia FESEM dei rivestimenti di Durazane 1800 funzionalizzati con PVP e $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$. Campioni: (a) 30%wt di PVP, 30%wt di $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, 180rps; (b) 30%wt di PVP, 40%wt di $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, 180rps; (c) 30%wt di PVP, 30%wt di $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, 60rps; (d) 30%wt di PVP, 30%wt di $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, 40rps.

Non si evince porosità all'interno dei coating, le nanoparticelle risultano ammassate fra di loro e poco disperse. In particolare, in Fig.34d, si nota come le nanoparticelle siano ricoperte da uno strato di rivestimento troppo invadente per permettere a quest'ultime di esporre le loro proprietà antibatteriche.

Vi è presenza di argento sulla nanosilice, il quale, tuttavia, non può rilasciare ioni argento a causa dei motivi precedentemente descritti.

Per quanto riguarda il PVP, non si è diffuso omogeneamente nella matrice, se fosse stato il contrario si noterebbe la presenza di pori sia in superficie sia al suo interno.

Test Antibatterici

E' stato condotto un test dell'alone di inibizione per verificare che le AgNPs identificate possano aver reso il coating antibatterico. I campioni sono stati collocati su una piastra di Agar Mueller-Hinton, posizionando il lato rivestito a diretto contatto con il batterio *Staphylococcus epidermidis*.

Dopo un periodo di incubazione di 48 ore a 37°C non si riscontra nessun effetto antibatterico, le colonie sono cresciute uniformemente su tutti i campioni analizzati.

In Fig.35 si mostra quanto detto:



Figura 35: Risultati del test dell'alone antibatterico dopo 48 ore di incubazione a 37 °C per i rivestimenti composti da una matrice di Durazane in cui sono dispersi PVP e nSiO₂-AgNPs (30%wt e 40%wt).

La mancanza di antimicrobicITÀ da parte dei campioni lascia intendere che le AgNPs, come nei casi precedenti anche in questo, non hanno spazio nella matrice per esporre ioni argento, soprattutto in superficie.

6 Conclusioni e Sviluppi Futuri

Questo lavoro di tesi si è focalizzato sullo sviluppo e la caratterizzazione di rivestimenti compositi, realizzati combinando un precursore polimerico pre-ceramico, il Durazane 1800, con nanoparticelle di silice decorate con nanoparticelle d'argento ($n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$), sintetizzate dal GLANCE in un precedente lavoro di tesi. L'obiettivo principale era ottenere un rivestimento poroso, stabile e con proprietà antibatteriche. La ricerca si è articolata in diverse fasi sperimentali, ciascuna delle quali è servita per comprendere quali siano i parametri che influenzano l'efficacia del coating.

La prima parte del lavoro è stata dedicata alla sintesi dei rivestimenti costituiti da una matrice di Durazane 1800, funzionalizzata con $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$. Il processo di sintesi è stato uguale per tutti i rivestimenti testati, variando le percentuali in peso dei reagenti utilizzati e valutandone le caratteristiche. Sono stati introdotti un mixer automatico ed uno spin coater, allo scopo di automatizzare i passaggi e garantire una qualità maggiore del prodotto.

L'analisi microscopica dei rivestimenti ha mostrato che le $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$ sono state incapsulate correttamente, tuttavia la matrice polimerica era compatta e scarsamente porosa. Questa configurazione limitava l'esposizione delle nanoparticelle d'argento e il rilascio di ioni argento, compromettendo l'efficacia antibatterica.

La presenza di argento è stata confermata dalle analisi composizionali dei rivestimenti.

La seconda parte del lavoro, si è focalizzata sullo studio del polivinilpirrolidone (PVP), un polimero utilizzato come filler sacrificale ad alte temperature. La strategia si è rivelata efficace, poiché si è notato un aumento della porosità della matrice. I risultati preliminari hanno mostrato che i rivestimenti costituiti da Durazane 1800 e PVP possedevano una distribuzione più omogenea delle nanoparticelle. Alla luce di questi risultati, si è creato un rivestimento che racchiudesse tutte le proprietà citate fino ad ora, ovvero costituito da una matrice di Durazane, in cui sono disperse le nanopolveri di PVP, tali da generare porosità, e le $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, tali da generare un effetto antibatterico.

Tuttavia, nessuno di questi test sperimentali ha avuto successo dal punto di vista antibatterico. Sono stati condotti test dell'alone di inibizione, tramite piastre contenenti il ceppo batterico dello *S. epidermidis*. I risultati dei test antibatterici hanno evidenziato che l'effetto battericida dei rivestimenti, non è ancora presente.

I rivestimenti sono molto densi, poco porosi e le nanoparticelle non riescono a diffondere fino alla superficie; inoltre il composto di Durazane 1800 e nanopolveri genera un coating che avvolge eccessivamente le $n\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$, non permettendo a quest'ultime di esporre ioni argento.

Per il futuro, bisogna fare ulteriori test di caratterizzazione delle nanopolveri, trovando la combinazione più adeguata che permetta di avere un coating stabile e al contempo poroso e antibatterico.

Per quanto riguarda la porosità dei rivestimenti, sarebbe utile investigare nuovi metodi di sintesi, per migliorare la dispersione delle nanoparticelle e ridurre il fenomeno dell'aggregazione, gli strumenti utilizzati fin'ora sono adatti ma andrebbe migliorato il processo.

Per chiarire l'assenza dell'effetto antibatterico, il test di rilascio ionico potrebbe essere utile per valutare quanto argento riesce a diffondere attraverso la matrice. Un altro approccio interessante è il trattamento al plasma, che necessita di ulteriori studi per comprendere bene come funzionalizzare e attivare la superficie del rivestimento.

Bibliografia

- [1] A. N. Poudel *et al.*, “The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis,” *PLoS One*, vol. 18, no. 5 May, May 2023, doi: 10.1371/journal.pone.0285170.
- [2] G. Mancuso, A. Midiri, E. Gerace, and C. Biondo, “Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens,” Oct. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/pathogens10101310.
- [3] “TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE CHAIRED BY JIM O’NEILL,” 2016.
- [4] “WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015. [Online]. Available: www.paprika-annecy.com.”
- [5] T. R. Walsh, A. C. Gales, R. Laxminarayan, and P. C. Dodd, “Antimicrobial Resistance: Addressing a Global Threat to Humanity,” Jul. 01, 2023, *Public Library of Science*. doi: 10.1371/journal.pmed.1004264.
- [6] A. Orlek, M. F. Anjum, A. E. Mather, N. Stoesser, and A. S. Walker, “Factors associated with plasmid antibiotic resistance gene carriage revealed using large-scale multivariable analysis,” *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-29530-y.
- [7] W. C. Reygaert, “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria,” *AIMS Microbiol*, vol. 4, no. 3, pp. 482–501, 2018, doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
- [8] D. Sun, K. Jeannot, Y. Xiao, and C. W. Knapp, “Editorial: Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance,” 2019, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmicb.2019.01933.
- [9] G. Mancuso, A. Midiri, E. Gerace, and C. Biondo, “Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens,” Oct. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/pathogens10101310.
- [10] “Deva, Anand K. M.B.B.S.(Hons.), M.S.; Adams, William P. Jr. M.D.; Vickery, Karen B.V.Sc.(Hons.), Ph.D.. The Role of Bacterial Biofilms in Device-Associated Infection. *Plastic and Reconstructive Surgery* 132(5):p 1319-1328, November 2013. | DOI: 10.1097/PRS.0b013e3182a3c105 ”.
- [11] “Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 Aug;(437):7-11. doi: 10.1097/00003086-200508000-00003. PMID: 16056019.”.
- [12] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, “Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases,” Feb. 2004. doi: 10.1038/nrmicro821.
- [13] J. G. Leid, M. E. Shirtliff, J. W. Costerton, and P. Stoodley, “Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms,” *Infect Immun*, vol. 70, no. 11, pp. 6339–6345, Nov. 2002, doi: 10.1128/IAI.70.11.6339-6345.2002.
- [14] A. J. Jesaitis *et al.*, “ Compromised Host Defense on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Characterization of Neutrophil and Biofilm Interactions ,” *The Journal of Immunology*, vol. 171, no. 8, pp. 4329–4339, Oct. 2003, doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4329.
- [15] “Deva, Anand K. M.B.B.S.(Hons.), M.S.; Adams, William P. Jr. M.D.; Vickery, Karen B.V.Sc.(Hons.), Ph.D.. The Role of Bacterial Biofilms in Device-Associated Infection. *Plastic and Reconstructive Surgery* 132(5):p 1319-1328, November 2013. | DOI: 10.1097/PRS.0b013e3182a3c105 ”.
- [16] “M. B. Miller and B. L. Bassler, ‘QUORUM SENSING IN BACTERIA,’ 2001. [Online]. Available: www.annualreviews.org.”

- [17] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler, “Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 28, no. 3, pp. 603–661, 2015, doi: 10.1128/CMR.00134-14.
- [18] A. Shariati, M. Dadashi, M. T. Moghadam, A. van Belkum, S. Yaslianifard, and D. Darban-Sarokhalil, “Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate Staphylococcus aureus clinical isolates: a systematic review and meta-analysis,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-69058-z.
- [19] Y. Guo, G. Song, M. Sun, J. Wang, and Y. Wang, “Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus,” Mar. 17, 2020, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fcimb.2020.00107.
- [20] C. Caneiras, L. Lito, J. Melo-Cristino, and A. Duarte, “Community-and hospital-acquired Klebsiella Pneumoniae urinary tract infections in Portugal: Virulence and antibiotic resistance,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 5, May 2019, doi: 10.3390/microorganisms7050138.
- [21] T. M. Young, A. S. Bray, R. K. Nagpal, D. L. Caudell, H. Yadav, and M. A. Zafar, “Animal model to study klebsiella pneumoniae gastrointestinal colonization and host-to-host transmission,” *Infect Immun*, vol. 88, no. 11, Nov. 2020, doi: 10.1128/IAI.00071-20.
- [22] N. Allocati, M. Masulli, M. F. Alexeyev, and C. Di Ilio, “Escherichia coli in Europe: An overview,” Nov. 25, 2013, *MDPI*. doi: 10.3390/ijerph10126235.
- [23] Q. Quach and T. M. Abdel-Fattah, “Silver Nanoparticles Functionalized Nanosilica Grown over Graphene Oxide for Enhancing Antibacterial Effect,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 19, Oct. 2022, doi: 10.3390/nano12193341.
- [24] S. Mishra, A. Gupta, V. Upadhye, S. C. Singh, R. P. Sinha, and D. P. Häder, “Therapeutic Strategies against Biofilm Infections,” Jan. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/life13010172.
- [25] A. Luceri, R. Francese, D. Lembo, M. Ferraris, and C. Balagna, “Silver Nanoparticles: Review of Antiviral Properties, Mechanism of Action and Applications,” Mar. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/microorganisms11030629.
- [26] P. R. More, S. Pandit, A. De Filippis, G. Franci, I. Mijakovic, and M. Galdiero, “Silver Nanoparticles: Bactericidal and Mechanistic Approach against Drug Resistant Pathogens,” Feb. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/microorganisms11020369.
- [27] Y. Qing *et al.*, “Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies,” Jun. 05, 2018, *Dove Medical Press Ltd.* doi: 10.2147/IJN.S165125.
- [28] S. Shaikh *et al.*, “Mechanistic insights into the antimicrobial actions of metallic nanoparticles and their implications for multidrug resistance,” May 02, 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms20102468.
- [29] J. Jin, Y. Wu, L. Liang, Y. Wei, X. Zheng, and Y. Chen, “Altering silver nanoparticles-induced inhibition to bacterial denitrification via visible light by regulating silver transformation and adaptive mechanism under anaerobic conditions,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 452, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.cej.2022.139268.
- [30] C. Liao, Y. Li, and S. C. Tjong, “Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles,” Jan. 02, 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms20020449.
- [31] T. C. Dakal, A. Kumar, R. S. Majumdar, and V. Yadav, “Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles,” *Front Microbiol*, vol. 7, no. NOV, Nov. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01831.
- [32] R. Arif and R. Uddin, “A review on recent developments in the biosynthesis of silver nanoparticles and its biomedical applications,” *Med Devices Sens*, vol. 4, no. 1, Feb. 2021, doi: 10.1002/mds3.10158.

- [33] X. Liu *et al.*, “Biosynthesis of silver nanoparticles with antimicrobial and anticancer properties using two novel yeasts,” *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-95262-6.
- [34] V. T. Noronha *et al.*, “Silver nanoparticles in dentistry,” Oct. 01, 2017, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.dental.2017.07.002.
- [35] D. Mukundan, R. Mohankumar, and R. Vasanthakumari, “Comparative study of synthesized silver and gold nanoparticles using leaves extract of *Bauhinia tomentosa* Linn and their anticancer efficacy,” *Bulletin of Materials Science*, vol. 40, no. 2, pp. 335–344, Apr. 2017, doi: 10.1007/s12034-017-1376-2.
- [36] T. G. Meikle, B. P. Dyett, J. B. Strachan, J. White, C. J. Drummond, and C. E. Conn, “Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity of Cubosome Encapsulated Metal Nanocrystals,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 12, no. 6, pp. 6944–6954, Feb. 2020, doi: 10.1021/acsami.9b21783.
- [37] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, “Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, no. 6, pp. 1712–1720, Mar. 2007, doi: 10.1128/AEM.02218-06.
- [38] A. Taraszkievicz, G. Fila, M. Grinholc, and J. Nakonieczna, “Innovative strategies to overcome biofilm resistance,” 2013, *Hindawi Limited*. doi: 10.1155/2013/150653.
- [39] Y. Y. Loo *et al.*, “In Vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens,” *Front Microbiol*, vol. 9, no. JUL, Jul. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01555.
- [40] T. Bruna, F. Maldonado-Bravo, P. Jara, and N. Caro, “Silver nanoparticles and their antibacterial applications,” Jul. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms22137202.
- [41] I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, M. L. Mei, Q. Li, and C. H. Chu, “The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry,” 2020, *Dove Medical Press Ltd.* doi: 10.2147/IJN.S246764.
- [42] K. Kalwar and D. Shan, “Antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) and their mechanism – A mini review,” Mar. 01, 2018, *Institution of Engineering and Technology*. doi: 10.1049/mnl.2017.0648.
- [43] M. A. Raza, Z. Kanwal, A. Rauf, A. N. Sabri, S. Riaz, and S. Naseem, “Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes,” *Nanomaterials*, vol. 6, no. 4, Apr. 2016, doi: 10.3390/nano6040074.
- [44] A. Panáček *et al.*, “Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 33, pp. 16248–16253, Aug. 2006, doi: 10.1021/jp063826h.
- [45] L. A. Tamayo *et al.*, “Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 40, pp. 24–31, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.03.037.
- [46] D. Wu, W. Fan, A. Kishen, J. L. Gutmann, and B. Fan, “Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm,” *J Endod*, vol. 40, no. 2, pp. 285–290, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.joen.2013.08.022.
- [47] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, and M. A. El-Sayed, “Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes,” Apr. 2005. doi: 10.1021/cr030063a.

- [48] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, and J. J. Collins, “A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics,” *Cell*, vol. 130, no. 5, pp. 797–810, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.049.
- [49] M. J. Hajipour *et al.*, “Antibacterial properties of nanoparticles,” Oct. 2012. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
- [50] I. W. Sutherland, “‘MINI-REVIEW Biofilm exopolysaccharides : a strong and sticky framework,’ 2001. ”.
- [51] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, “Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases,” Feb. 2004. doi: 10.1038/nrmicro821.
- [52] M. Esparza-Soto and P. Westerhoff, “Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass,” *Water Res*, vol. 37, no. 10, pp. 2301–2310, 2003, doi: 10.1016/S0043-1354(02)00630-9.
- [53] R. Selvakumar, S. Aravindh, A. M. Ashok, and Y. L. Balachandran, “A facile synthesis of silver nanoparticle with SERS and antimicrobial activity using *Bacillus subtilis* exopolysaccharides,” *J Exp Nanosci*, vol. 9, no. 10, pp. 1075–1087, 2014, doi: 10.1080/17458080.2013.778425.
- [54] T. O. Peulen and K. J. Wilkinson, “Diffusion of nanoparticles in a biofilm,” *Environ Sci Technol*, vol. 45, no. 8, pp. 3367–3373, Apr. 2011, doi: 10.1021/es103450g.
- [55] P. S. Stewart, “Diffusion in biofilms,” Mar. 2003. doi: 10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003.
- [56] E. Szymańska *et al.*, “Multifunctional tannic acid/silver nanoparticle-based mucoadhesive hydrogel for improved local treatment of HSV infection: In vitro and in vivo studies,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.3390/ijms19020387.
- [57] A. Luceri, R. Francese, D. Lembo, M. Ferraris, and C. Balagna, “Silver Nanoparticles: Review of Antiviral Properties, Mechanism of Action and Applications,” Mar. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/microorganisms11030629.
- [58] J. Hodek, V. Zajícová, I. Lovetinská-Šlamborová, I. Stibor, J. Müllerová, and J. Weber, “Protective hybrid coating containing silver, copper and zinc cations effective against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses,” *BMC Microbiol*, vol. 16, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s12866-016-0675-x.
- [59] Y. Li, P. Leung, L. Yao, Q. W. Song, and E. Newton, “Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles,” *Journal of Hospital Infection*, vol. 62, no. 1, pp. 58–63, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.jhin.2005.04.015.
- [60] L.P Lukhele, “Synthesis of silver impregnated carbon nanotubes and cyclodextrin polyurethanes for the disinfection of water,” vol. 36, no. 4, 2010, [Online]. Available: <http://www.wrc.org.za>
- [61] A. Luceri, R. Francese, S. Perero, D. Lembo, M. Ferraris, and C. Balagna, “Antibacterial and Antiviral Activities of Silver Nanocluster/Silica Composite Coatings Deposited onto Air Filters,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 16, no. 3, pp. 3955–3965, Jan. 2024, doi: 10.1021/acsami.3c13843.
- [62] Y. Zhang, W. Fan, Y. Sun, W. Chen, and Y. Zhang, “Application of antiviral materials in textiles: A review,” Jan. 01, 2021, *De Gruyter Open Ltd*. doi: 10.1515/ntrev-2021-0072.
- [63] M. Carbone, D. T. Donia, G. Sabbatella, and R. Antiochia, “Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging,” Oct. 01, 2016, *Elsevier B.V*. doi: 10.1016/j.jksus.2016.05.004.
- [64] A. C. S. Almeida, E. A. N. Franco, F. M. Peixoto, K. L. F. Pessanha, and N. R. Melo, “Aplicação de nanotecnologia em embalagens de alimentos,” *Polimeros*, vol. 25, pp. 89–97, Dec. 2015, doi: 10.1590/0104-1428.2069.

- [65] D. Lu *et al.*, “Preparation and properties of antibacterial food-preservative paper incorporating ceramic pigments,” *Packaging Technology and Science*, vol. 37, no. 4, pp. 273–282, Apr. 2024, doi: 10.1002/pts.2797.
- [66] E. O. Simbine, L. da C. Rodrigues, J. Lapa-Guimarães, E. S. Kamimura, C. H. Corassin, and C. A. F. de OLIVEIRA, “Application of silver nanoparticles in food packages: A review,” Oct. 01, 2019, *Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, SBCTA*. doi: 10.1590/fst.36318.
- [67] N. Chen, Y. Zheng, J. Yin, X. Li, and C. Zheng, “Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 in vitro,” *J Virol Methods*, vol. 193, no. 2, pp. 470–477, 2013, doi: 10.1016/j.jviromet.2013.07.020.
- [68] “https://it.wikipedia.org/wiki/Materiale_composito.”
- [69] R. Ciriminna, Y. Albo, and M. Pagliaro, “New Antivirals and Antibacterials Based on Silver Nanoparticles,” Sep. 03, 2020, *John Wiley and Sons Ltd*. doi: 10.1002/cmdc.202000390.
- [70] H. Y. Atay, I. Yaşa, and E. Çelik, “‘Antibacterial polymeric coatings with synthesized silver nanoparticles,’ Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano Metal Chemistry, vol. 45, no. 6, pp. 784–798, 2015, doi: 10.1080/15533174.2013.843561. ”.
- [71] E. Kroke, Y.-L. Li, C. Konetschny, E. Lecomte, C. Fasel, and R. Riedel, “Silazane derived ceramics and related materials.”
- [72] C. Balagna *et al.*, “Antibacterial nanostructured composite coating on high performance Vectran™ fabric for aerospace structures,” *Surf Coat Technol*, vol. 373, pp. 47–55, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.surfcoat.2019.05.076.
- [73] A. Luceri *et al.*, “Washing resistant antibacterial composite coatings on cotton textiles,” *Cellulose*, vol. 30, no. 15, pp. 9877–9897, Oct. 2023, doi: 10.1007/s10570-023-05471-7.
- [74] M. Tetti, “Sviluppo di rivestimenti compositi a partire da polimeri pre-ceramici funzionalizzati con nanoparticelle inorganiche per potenziali applicazioni antibatteriche,” Politecnico di Torino, 2023.
- [75] “Merck KGaA, ‘Durazane - Innovative Polysilazane Materials.’ [Online]. Available: www.polysilazanes.com.”
- [76] Y. Zhan, R. Grottenmüller, W. Li, F. Javaid, and R. Riedel, “Evaluation of mechanical properties and hydrophobicity of room-temperature, moisture-curable polysilazane coatings,” *J Appl Polym Sci*, vol. 138, no. 21, Jun. 2021, doi: 10.1002/app.50469.
- [77] T. Konegger, L. F. Williams, and R. K. Bordia, “Planar, Polysilazane-Derived Porous Ceramic Supports for Membrane and Catalysis Applications,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 98, no. 10, pp. 3047–3053, Oct. 2015, doi: 10.1111/jace.13758.
- [78] K. M. Koczur, S. Mourdikoudis, L. Polavarapu, and S. E. Skrabalak, “Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis,” *Dalton Transactions*, vol. 44, no. 41, pp. 17883–17905, 2015, doi: 10.1039/c5dt02964c.
- [79] “‘NCCLS M2-A9. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 9th Edn, NCCLS, Villanova, PA, USA 2003.’”.