



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in
Ingegneria Biomedica
A.a. 2023/2024
Sessione di Laurea dicembre 2024

**Caratterizzazione di membrane con
rivestimento antibatterico per
applicazioni nel campo della
filtrazione d'aria**

Relatore:

Prof.ssa Cristina Balagna

Correlatore:

Dott. Francesca Gattucci

Candidato:

Luca Ruggiero

300375



**Politecnico
di Torino**



Sommario

Il problema della resistenza agli antibiotici, sviluppata da numerosi ceppi di batteri e funghi, e la rapida diffusione di nuove patologie, come dimostrato dalla recente pandemia globale di COVID-19, sono state riconosciute dall'OMS come principali minacce alla sanità pubblica a livello mondiale. In questo contesto, sono state sviluppate nuove tecniche al fine di ottenere materiali con proprietà antibatteriche, le cui applicazioni stanno riscuotendo successo anche nella realizzazione di filtri d'aria, rappresentando una strategia preventiva alla formazione e proliferazione di microorganismi. In questo scenario, le nanoparticelle di argento (AgNPs) si sono rivelate estremamente promettenti grazie alle loro potenzialità antimicrobiche.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato lo sviluppo e la caratterizzazione di membrane polimeriche ottenute tramite elettrospinning (PAN, PVA, Nylon) con proprietà antibatteriche per applicazioni nel campo della filtrazione d'aria. Le membrane sono state funzionalizzate con AgNPs incorporate nella soluzione da elettrospinnare o rivestite con un rivestimento composito (matrice di silice o zirconia) contenente nanoclusters di Ag depositato attraverso la tecnica del co-sputtering.

Le membrane sono state quindi caratterizzate, dal punto di vista della morfologia, attraverso la microscopia elettronica a scansione con sorgente a emissione di campo (FESEM) e, dal punto di vista compositivo, tramite la spettroscopia per dispersione di energia (EDS).

Sono stati poi condotti test di rilascio ionico in acqua al fine di valutare il rilascio di ioni argento Ag^+ , la cui azione antibatterica è ampiamente riconosciuta, in diversi intervalli di tempo.

Per quanto riguarda i test antibatterici, le membrane sono state sottoposte a diverse analisi: (a) test dell'alone di inibizione, (b) test di contaminazione batterica attraverso un bioaerosol contenente *S.epidermidis* seguito dalla valutazione del numero di unità formanti colonie (CFU).

A livello morfologico, le membrane funzionalizzate presentano una distribuzione meno uniforme di AgNPs, mentre quelle realizzate tramite co-sputtering risultano ben ricoperte dal rivestimento composito contenente nanoclusters di Ag.



**Politecnico
di Torino**

I test di rilascio ionico hanno testimoniato l'effettivo rilascio nel tempo di ioni argento in soluzione acquosa da parte delle membrane. Inoltre, i test dell'alone di inibizione hanno confermato le proprietà antibatteriche dei campioni testati, risultati positivi sono stati ottenuti anche per quanto riguarda i test di conta delle unità formanti colonie (CFU). Un confronto tra le due tecniche (funzionalizzazione con AgNPs e rivestimento via co-sputtering) è stato effettuato.



**Politecnico
di Torino**

Abstract

The problem of antibiotic resistance, developed by several strains of bacteria and fungi, and the rapid spread of new diseases, as witnessed by the recent global pandemic of COVID-19, have been recognized by WHO as major threats to public health worldwide. In this context, new techniques have been developed in order to obtain materials with antibacterial properties, whose applications are also proving to be successful in the manufacture of air filters, representing a preventive strategy to the formation and proliferation of microorganisms. In this scenario, silver nanoparticles (AgNPs) have shown great promise due to their antimicrobial potential.

The purpose of this thesis work was the development and characterization of polymeric membranes obtained by electrospinning (PAN, PVA, Nylon) with antibacterial properties for applications in the field of air filtration. The membranes were functionalized with AgNPs embedded in the solution to be electrospun or coated with a composite coating (silica or zirconia matrix) containing Ag nanoclusters deposited through the co-sputtering technique.

The membranes were then characterized from a morphological point of view by field emission scanning electron microscopy (FESEM) and from a compositional point of view by energy dispersive spectroscopy (EDS).

Ion release tests in water were then conducted in order to evaluate the release of silver ions Ag^+ , whose antibacterial action is widely recognized, at different time intervals.

Concerning antibacterial tests, the membranes were subjected to several tests: (a) halo inhibition test, (b) bacterial contamination test through a bioaerosol containing *S.epidermidis* followed by the evaluation of the number of colony-forming units (CFUs).

In terms of morphology, the functionalized membranes show a less uniform distribution of AgNPs, while those realized through co-sputtering appear to be well covered by the composite coating containing Ag nanoclusters.

Ion release tests showed the effective release of silver ions in aqueous solution by the membranes over time. In addition, inhibition halo tests confirmed the antibacterial properties of the tested



**Politecnico
di Torino**

samples; positive results were also obtained in colony-forming units (CFUs) count tests. A comparison between the two techniques (functionalization with AgNPs and coating via co-sputtering) was carried out.



**Politecnico
di Torino**

Indice

<i>1 Introduzione e scopo del lavoro</i>	9
<i>2 La resistenza antimicrobica</i>	11
<i>3 Le Nanoparticelle di argento</i>	16
3.1 Proprietà antibatteriche dell'argento.....	16
3.2 Potere antibatterico delle Nanoparticelle di argento	18
3.3 Sintesi e applicazioni delle Nanoparticelle di argento.....	23
3.4 Membrane polimeriche elettrospinnate con potere antibatterico.....	25
3.5 Rivestimenti compositi con Nanoparticelle di argento	27
<i>4 Materiali e Metodi</i>	29
4.1 Le Membrane	29
4.2 Caratterizzazione morfologica e composizionale	33
4.3 Test Antibatterici	34
4.3.1 Test dell'alone di inibizione	34
4.3.2 Test di contaminazione batterica tramite bioaerosol e della conta delle unità formanti colonia (CFU).....	35
4.4 Prova di rilascio ionico in acqua.....	37
<i>5 Risultati</i>	39
5.1 Caratterizzazione morfologica e composizionale	39
5.2 Test Antibatterici	49
5.3 Test di rilascio ionico in acqua	57
<i>6 Conclusioni</i>	64
<i>7 Bibliografia</i>	66



**Politecnico
di Torino**



**Politecnico
di Torino**

1 Introduzione e scopo del lavoro

La presenza nell'aria di microorganismi quali batteri e virus rappresenta un problema, non solo in ambito sanitario, ma in generale per la salute umana e può portare all'insorgenza e alla diffusione di varie patologie, come ad esempio gravi infezioni respiratorie. La tecnologia di filtrazione dell'aria ha un ruolo fondamentale nel miglioramento della qualità dell'aria e nel proteggere la salute umana. In particolare, l'utilizzo di filtri con proprietà antibatteriche può rappresentare una strategia preventiva alla formazione e proliferazione di microorganismi.

Lo scopo di questo elaborato, realizzato con il gruppo di ricerca GLANCE del DISAT del Politecnico di Torino, è lo studio e sviluppo di membrane polimeriche ottenute tramite elettrospinning (PAN, PVA, Nylon) con proprietà antibatteriche per applicazioni nel campo della filtrazione d'aria. Le membrane sono state funzionalizzate con AgNPs incorporate nella soluzione da elettrospinnare o rivestite con un rivestimento composito (matrice di silice o zirconia) contenente nanoclusters di Ag depositato attraverso la tecnica del co-sputtering.

L'agente antibatterico impiegato nella realizzazione di queste membrane sono nanoparticelle di argento (AgNPs), note le sue proprietà antimicrobiche. Le AgNPs possono essere ancorate direttamente sulle superfici da trattare, inglobate nel materiale di base o utilizzate per la realizzazione di rivestimenti compositi. Le proprietà antimicrobiche risultano ancora più spiccate alla dimensione della nanoscala, sia per via del maggiore rapporto superficie/volume rispetto all'argento in bulk, sia per la capacità delle AgNPs in forma nanometrica di penetrare e interagire direttamente con i batteri.

La caratterizzazione morfologica composizionale delle membrane (PVA, PAN, Nylon) è stata ottenuta tramite microscopia elettronica a scansione con sorgente a emissione di campo (FESEM) e spettroscopia per dispersione di energia (EDS).

L'analisi relativa all'attività antibatterica dei rivestimenti è stata effettuata tramite test dell'alone di inibizione con diversi ceppi batterici e test di conta delle unità formanti colonie (CFU), in



**Politecnico
di Torino**

seguito alla contaminazione batterica delle superfici tramite bioaerosol con ceppo batterico *S.epidermidis*.

Inoltre, sono stati condotti test di rilascio ionico in acqua, attraverso i quali è stata determinata la concentrazione di ioni Ag^+ che dalle membrane diffondono in soluzione in diversi istanti di tempo.



**Politecnico
di Torino**

2 La resistenza antimicrobica

Con resistenza antimicrobica (AMR) si intende la capacità di batteri, funghi e parassiti di resistere agli agenti antimicrobici. Come risultato, farmaci quali gli antibiotici si dimostrano inefficaci e, di conseguenza, le infezioni difficili o impossibili da debellare, portando a un maggior rischio di diffusione della malattia. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha posto l'AMR tra le prime dieci minacce sanitarie globali, qualificandola come uno dei principali pericoli a livello globale per la salute pubblica e lo sviluppo; si stima, infatti, che l'AMR batterica abbia causato direttamente 1,27 milioni di morti nel 2019 e abbia contribuito a 4,95 milioni di decessi nello stesso anno [54].

L'insorgenza del problema è direttamente collegato alla scoperta della penicillina da parte di Alexander Fleming e alla successiva produzione e utilizzo di massa degli antibiotici negli anni '40; i primi microorganismi resistenti vennero rilevati poco tempo dopo: il primo caso documentato di penicillina-resistenza fu lo *Staphylococcus aureus* nel 1942 e successivamente vennero individuati altri ceppi batterici resistenti agli antibiotici, tra i quali lo *Staphylococcus aureus* metilino-resistente (MRSA) e, in epoca più recente, l'*Escherichia coli* e la *Klebsiella pneumoniae*, in grado di produrre enzimi, detti ESLB, che conferiscono resistenza a una vasta gamma di antibiotici [1].

L'ambito sanitario rappresenta uno dei luoghi principali per lo sviluppo di microorganismi resistenti, data l'elevata presenza e utilizzo di antibiotici; in particolare, è favorita la presenza di ceppi multiresistenti in grado di sopravvivere più facilmente all'esposizione a diverse classi di antibiotici, lo *Staphylococcus aureus* resistente alla metilino (MRSA) e gli enterococchi sono tra i batteri multiresistenti più frequentemente isolati negli ospedali e sono responsabili delle infezioni più difficili da trattare in ambito ospedaliero [3].



**Politecnico
di Torino**

Tra i fattori chiave che determinano il tasso di infezioni contratte in ospedale, i microrganismi frequentemente presenti e altri inquinanti dell'aria interna giocano un ruolo fondamentale. Sebbene i pazienti trattati nelle unità di terapia intensiva, nei reparti chirurgici e i pazienti immunodepressi, in generale, siano i più suscettibili a tali infezioni, anche il personale ospedaliero e le persone che visitano frequentemente le strutture sanitarie sono a rischio [5]. Le infezioni contratte in ospedale più comuni comprendono polmonite, infezioni del flusso sanguigno e infezioni del tratto urinario. Quando i pazienti in terapia intensiva vengono infettati da microrganismi resistenti agli antimicrobici, la loro degenza ospedaliera può essere prolungata e i costi di trattamento possono aumentare, causando infine tassi di morbilità e mortalità più elevati. Misure preventive immediate per ridurre al minimo l'ingresso e la diffusione di microrganismi nelle strutture ospedaliere dovrebbero essere il primo passo nella lotta contro queste infezioni [4].

Il funzionamento appropriato ed efficace dei sistemi di riscaldamento, ventilazione e condizionamento dell'aria (HVAC) è una priorità per migliorare i fattori ambientali che influenzano la qualità dell'aria interna degli ospedali. I filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air) sono raccomandati per il controllo delle infezioni in ambienti ad alta efficienza. La letteratura riporta, inoltre, che i sistemi di filtrazione dell'aria integrati HVAC (purificatori dell'aria interna) possono ridurre le cariche virali aerosolizzate; pertanto, proteggendo e rafforzando i sistemi di ventilazione esistenti è possibile ridurre al minimo i tassi di infezioni contratte in ospedale associate ad agenti patogeni infettivi presenti nell'aria.[4]

Esistono due tipologie principali di resistenza agli antibiotici nei batteri: la resistenza naturale e la resistenza acquisita. La resistenza naturale, a sua volta, si divide in intrinseca o indotta. La resistenza naturale intrinseca rappresenta un tratto condiviso universalmente all'interno della specie batterica e non è correlata all'esposizione agli antibiotici e al trasferimento genico orizzontale (HGT), è una proprietà naturale di alcuni batteri che li rende resistenti a determinati



**Politecnico
di Torino**

antibiotici. I meccanismi batterici alla base di questa resistenza sono la ridotta permeabilità della membrana/parete cellulare (in particolare i lipopolisaccaridi LPS, nei batteri Gram Negativi), che impedisce alla molecola antibiotica di penetrarla e raggiungere il bersaglio e l'azione delle pompe di efflusso. La resistenza naturale indotta è rappresentata, invece, dall'alterazione dell'espressione genica dovuta all'azione degli agenti antimicrobici; ciò nonostante, questa resistenza è transitoria ed è reversibile semplicemente rimuovendo l'induttore. La seconda tipologia è definita resistenza acquisita e può verificarsi a seguito di mutazioni spontanee nei geni cromosomici o, più comunemente, attraverso l'acquisizione di geni resistenti tramite trasferimento genico orizzontale (HGT); essa rappresenta il problema più allarmante, in quanto conferisce capacità ai batteri di sviluppare resistenza nei confronti di antibiotici a cui erano precedentemente sensibili [6-7].

I meccanismi alla base dell'AMR sfruttati dai batteri sono: la limitazione dell'assorbimento del farmaco, l'inattivazione del farmaco, l'efflusso attivo del farmaco e la modifica del target del farmaco (*figura 1*). I primi tre sono alla base della resistenza intrinseca, mentre la resistenza acquisita si avvale della modifica del target del farmaco, l'efflusso attivo del farmaco e l'inattivazione del farmaco. Tuttavia, i batteri possono essere divisi in due categorie principali: batteri Gram Positivi e batteri Gram Negativi; questa differenza è da ricercare nella diversa struttura della parete cellulare che essi presentano. Nei primi la parete cellulare è costituita in grande percentuale (circa il 90%) da peptidoglicano, mentre nei secondi la percentuale di peptidoglicano è circa il 15%, e la porzione quantitativamente maggiore è rappresentata dalla membrana esterna, a sua volta costituita sulla superficie esterna da lipopolisaccaride (LPS). A causa di questa differenza, i batteri Gram Negativi sono in grado di sfruttare tutti i meccanismi di resistenza precedentemente citati, mentre i Gram Positivi sfruttano meno la limitazione dell'assorbimento del farmaco [8-9].

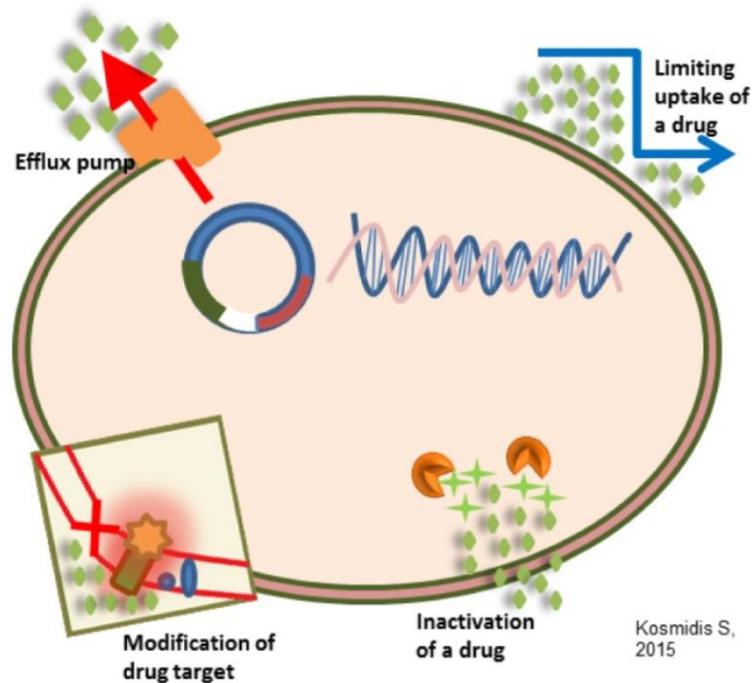


Figura 1 Meccanismi generali della resistenza antimicrobica [7]

A contribuire alla progressiva espansione del fenomeno dell'AMR vi sono anche fattori ambientali, quali, ad esempio, il problema del cambiamento climatico e il costante aumento delle temperature. Uno studio svolto da *MacFadden et al.* ha rivelato che l'aumento della temperatura locale negli Stati Uniti è collegato a una crescita della popolazione resistente agli antibiotici contro *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* [11]. Studi simili in Europa, condotti su 28 paesi tra il 2000 e il 2016, indicano che la temperatura può essere un modulatore chiave dei cambiamenti nel tasso di resistenza agli antibiotici [12]. Recentemente anche in Asia, in particolare in Cina, è stata effettuata una ricerca che ha messo in luce come la prevalenza di popolazione resistente agli antibiotici aumenta con l'aumento della temperatura media regionale. I cambiamenti anno dopo anno della temperatura ambiente hanno un effetto cumulativo sulla resistenza agli antibiotici, con la somma quadriennale che mostra l'effetto maggiore. Esistono variazioni tra i batteri nello sviluppo della resistenza agli antibiotici con l'aumento della temperatura ambiente. [10]



**Politecnico
di Torino**

Rimangono molte lacune negli sforzi volti a contenere la resistenza antimicrobica, tuttavia, sono in atto misure che affrontano questo problema. Tra le preoccupazioni più urgenti vi è sicuramente quella relativa alla presenza di batteri che causano molte delle infezioni comuni acquisite negli ospedali e nelle comunità, per le quale la cura sta diventando difficile, o in alcuni casi impossibile. All'urgenza si aggiunge, in particolare, la mancanza di nuove opzioni terapeutiche in fase di sviluppo per sostituire i farmaci che perdono la loro efficacia [2]. In questo contesto, le nanotecnologie e l'impiego di nuovi materiali possono giocare un ruolo chiave nella lotta all'antimicrobico resistenza, soprattutto a scopo preventivo, mirando a ridurre la possibile insorgenza del fenomeno dell'AMR e ad eludere i meccanismi di difesa batterica. La soluzione che si è mostrata più promettente in questo ambito sono certamente le Nanoparticelle di argento (AgNPs), le cui dimensioni alla scala nanometrica migliorano l'attività antibatterica dell'argento, già ampiamente riconosciuta in campo scientifico; inoltre, la loro capacità di essere incorporate in svariati prodotti, quali, ad esempio, strumenti chirurgici, cateteri, medicazioni, le rendono un prezioso alleato in campo medico e sanitario. Tuttavia, il vero potenziale delle AgNPs nel contesto antimicrobico è legato ai diversi meccanismi d'azione nei confronti dei microorganismi, che conferiscono loro la capacità di uccidere diverse tipologie di batteri [56].



**Politecnico
di Torino**

3 Le Nanoparticelle di argento

3.1 Proprietà antibatteriche dell'argento

L'utilizzo dell'argento come agente antimicrobico ha radici antichissime: i Romani lo inserivano nel loro libro ufficiale di medicine e ci sono testimonianze del suo impiego per la conservazione e purificazione delle scorte d'acqua e di cibo risalenti sia ai Romani stessi che agli antichi greci; i Macedoni impiegavano fogli d'argento sulle ferite per favorirne la guarigione e cercare di prevenire e trattare le infezioni chirurgiche, pratica diffusa anche in tempi moderni, in particolar modo durante la Prima Guerra Mondiale. Successivamente, a partire dagli anni '20, la ricerca e l'utilizzo dell'argento in campo medico è stata accantonata per via della scoperta degli antibiotici; tuttavia, l'elevato e indiscriminato impiego di questi ultimi nel trattamento delle infezioni batteriche ha portato all'insorgenza di un fenomeno di adattamento da parte di alcuni microorganismi, che acquisiscono la capacità di sopravvivere e proliferare nonostante l'attività del farmaco antimicrobico. In questo scenario, l'argento, in particolare nella sua forma nano particellare, si è rivelato estremamente promettente grazie alle sue proprietà antimicrobiche ad ampio spettro. Alla base dell'attività antibatterica dell'argento vi è l'effetto di esposizione dei batteri agli ioni argento liberati dal metallo, che mostrano un'attività battericida che si manifesta attraverso diversi meccanismi.

Gli ioni di argento mostrano un'azione antibatterica, in primo luogo, interagendo con gli enzimi respiratori, distruggendo la deidrogenasi della catena respiratoria, inibendo la respirazione e interferendo con la normale crescita e metabolismo delle cellule batteriche, il che porta alla formazione di specie ROS e a uno stress ossidativo dannoso per i batteri. Sono poi in grado di bloccare l'espressione delle proteine necessarie a produrre ATP, fonte principale di energia delle cellule. Un altro meccanismo d'azione riguarda la capacità di ostacolare la replicazione del DNA: gli ioni di argento rilasciati dal metallo sono, infatti, in grado di penetrare la parete batterica e



modificare il DNA in forma condensata, bloccandone così la sua replicazione all'interno dei batteri. Hanno effetti anche sui ribosomi, portando a una destabilizzazione e denaturazione di questi ultimi, che inibisce la sintesi proteica e la degradazione della membrana plasmatica. In ultimo, gli ioni di argento hanno anche un effetto diretto nei confronti dei batteri: le proteine di membrana fungono, infatti, da sito di legame causando l'inattivazione e la graduale degradazione delle proteine di membrana e ciò porta a una riduzione della permeabilità della membrana (figura 2). [13-14].

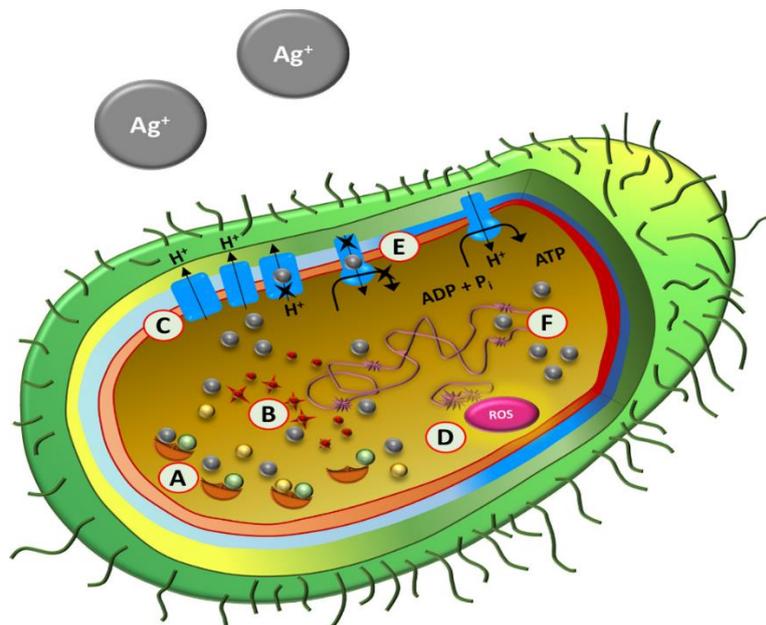


Figura 2 Effetti degli ioni argento su una cellula batterica ; (A) interazione e disattivazione enzimatica , (B) destabilizzazione e denaturazione dei ribosomi, (C) interruzione della catena di trasporto degli elettroni. (D) generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (E) riduzione della formazione di adenina trifosfato (ATP) e (F) danno al DNA che ne impedisce la replicazione e la moltiplicazione causando l'apoptosi cellulare [13]



**Politecnico
di Torino**

3.2 Potere antibatterico delle Nanoparticelle di argento

Le Nanoparticelle di argento si sono rivelate estremamente promettenti nel campo biomedico, grazie alle loro potenti proprietà antimicrobiche ad ampio spettro. Il loro impiego in campo antibatterico è relativamente recente e strettamente collegato alla nascita delle nanotecnologie. Diversi studi hanno confermato come l'argento utilizzato in forma nanometrica abbia diversi vantaggi rispetto alla sua forma in bulk: le nanoparticelle presentano, infatti, un'efficacia molto elevata contro un'ampia gamma di microbi e parassiti anche quando vengono utilizzate in basse dosi e, a queste dosi, l'argento presenta una tossicità molto ridotta nei confronti degli esseri umani ed è relativamente poco costoso e disponibile [15]. Inoltre, contrariamente agli effetti battericidi degli ioni di argento, l'attività antimicrobica delle nanoparticelle d'argento è influenzata dalla dimensione di queste ultime: più piccole sono le particelle e maggiore è l'effetto antimicrobico [16]. In uno studio condotto da *Chun-Nam Lok et al.* [17] è stato analizzato l'effetto antibatterico delle AgNPs in parallelo a quello degli ioni argento in soluzione, rivelando come la modalità di azione sia simile; tuttavia, hanno riferito che le concentrazioni antibatteriche efficaci delle AgNPs e degli ioni argento erano rispettivamente nell'intervallo nano e micro-molare. La forma nanometrica si è dimostrata, dunque, un efficiente sistema fisico-chimico che conferisce attività antimicrobiche all'argento. Il potere antibatterico delle AgNPs è legato alla loro capacità di rilasciare ioni e agli effetti precedentemente descritti che questi hanno nei confronti dei microorganismi; in aggiunta, vi sono altri fattori, quali ad esempio forma, dimensione e capacità di impedire la formazione di biofilm che le rendono dei preziosi alleati nella lotta antimicrobica. Ci sono chiare correlazioni tra il potere antibatterico delle nanoparticelle di argento e la loro forma, in particolare a livello delle interazioni che esse hanno con batteri virus e funghi: quando la forma delle AgNPs cambia, cambia anche il potenziale effetto antimicrobico [26-27-28]. Ad esempio, *Ali Bakhtiari-standard et al.* hanno sintetizzato delle nanoparticelle di argento in forma sferica che dimostravano avere un'eccellente attività antimicrobica: le hanno testate contro *E.coli* e *S.aureus* osservando che l'*E.coli* risultava più suscettibile al loro effetto[29]. *Ja Young Cheon*



**Politecnico
di Torino**

et al. hanno testato l'importanza della forma delle nanoparticelle, sintetizzandole in tre differenti forme: sferica, a disco e triangolare. Le prime si sono rivelate più efficaci delle altre, concludendo che il differente potere antimicrobico dev'essere ricondotto al diverso rilascio di ioni argento, correlato alla morfologia nelle nanoparticelle [30].

Anche la dimensione gioca un ruolo chiave. Studi condotti da *Morose et al.* [18] hanno evidenziato che grandezze dell'ordine delle decine di nm permettono di esibire poteri unici, tra i quali un eccellente rapporto volume-superficie; ciò si traduce in un forte effetto antimicrobico nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, dal momento che queste piccole dimensioni consentono alle AgNPs di aderire e penetrare all'interno della cellula batterica. Gli effetti antimicrobici contro batteri multi farmaco resistenti sono stato a lungo oggetto di studio e le AgNPs si sono rivelate efficaci contro *E.coli* multi farmaco resistente [19-20], il ceppo multi farmaco resistente di *Pseudomonas aeruginosa* [21], lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) [19-22] e i batteri produttori di enzimi ESLB [23-24-25]. Tuttavia, è stato anche dimostrato come l'efficienza antimicrobica delle AgNPs sia effettivamente maggiore nei confronti dei batteri Gram-negativi rispetto ai Gram-positivi, poiché questi ultimi presentano uno spesso strato di peptidoglicano che costituisce la parete cellulare e ciò riduce la possibilità di penetrazione delle nanoparticelle all'interno della cellula batterica [31]. L'assorbimento delle AgNPs gioca un ruolo importante nell'effetto antibatterico che esse hanno, come dimostrato su vari batteri Gram-negativi e Gram-positivi [32]; in (*figura 3*) viene mostrata la differente azione delle nanoparticelle sulle due tipologie Gram di microorganismi.

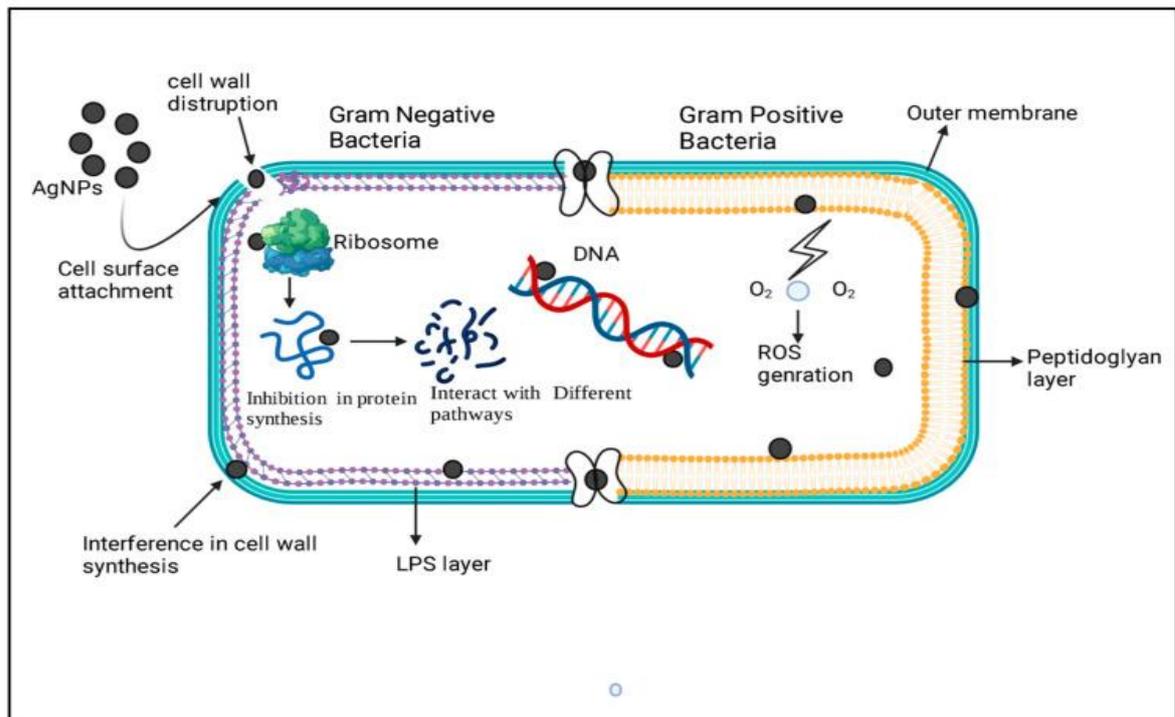


Figura 3 Meccanismi di azione delle AgNPs sui batteri Gram-negativi e Gram-positivi Le NP si attaccheranno alla superficie della parete cellulare batterica e, a seconda della composizione della parete cellulare, le NP entreranno all'interno della cellula batterica. Inoltre, ciò porta ad alterare gli altri approcci meccanicistici dell'organismo, la sintesi proteica, il percorso ROS e la replicazione del DNA [26].

Un'altra importante caratteristica che mostrano le AgNPs riguarda il loro effetto anti-biofilm. Con biofilm si intende un aggregato di cellule microbiche associate ad una superficie e incluse in una matrice extracellulare da esse prodotta; il biofilm agisce come una barriera per la penetrazione di un antibiotico e, quindi, promuove la resistenza multi-farmaco nei batteri. È riconosciuto che i batteri racchiusi nei biofilm sono più resistenti agli antibiotici, il che causa limitazioni nelle terapie antibiotiche convenzionali [33]. La presenza del biofilm consente ai batteri di sopravvivere a condizioni ambientali ostili e li rende la causa principale nello sviluppo delle infezioni ospedaliere, grazie alla presenza di corpi estranei, quali, ad esempio, cateteri, protesi, pacemaker, che rappresentano una superficie ideale per l'adesione delle cellule batteriche. Inoltre, il biofilm protegge i batteri dal sistema immunitario dell'ospite e li rende notevolmente più resistenti agli



**Politecnico
di Torino**

antibiotici. Alla base di questa resistenza vi è la struttura del biofilm, la disponibilità di nutrienti e ossigeno per le cellule batteriche e la resistenza batterica intrinseca e acquisita. Anche lo stato metabolico all'interno del biofilm gioca un ruolo chiave nella resistenza antimicrobica: le cellule batteriche presenti nelle zone povere di nutrienti del biofilm possono andare in contro a uno stato di dormienza che le porta a dividersi molto raramente e le cellule in divisione sono sensibili ad alcuni antibiotici, tra i quali i Beta-lattamici, che diventano in questo caso inefficaci [34]. Durante il processo di formazione del biofilm, i microorganismi sono in grado di comunicare tra loro attraverso il Quorum Sensing (QS), che regola l'attività delle cellule planctoniche e può indurre la formazione di biofilm microbici e una maggiore virulenza. Questa comunicazione è basata sul segnale chimico e il suo ruolo è quello di modulare le funzioni cellulari: la patogenesi, l'acquisizione di nutrienti, il trasferimento di materiale genetico tra le cellule, la motilità e la sintesi di metaboliti secondari [35]. Il meccanismo del Quorum Sensing si basa sull'auto-induttore, o molecola segnale, e l'attivatore trascrizionale; la molecola segnale viene captata da specifici ligandi presenti nel citoplasma o sulla membrana cellulare e, se presente in quantità superiore a un certo valore, si lega all'attivatore trascrizionale che attiva o reprime una serie di geni, regolando processi cellulari specifici [36].

In questo contesto, recentemente, diversi studi condotti hanno dimostrato l'efficacia delle AgNPs nel contrastare la formazione del biofilm e hanno rivelato importanti proprietà anti-QS. Lo studio condotto da *Hamed Barabadi et al.* [37] ha dimostrato come le AgNPs hanno ostacolato con successo la formazione di biofilm dei ceppi di riferimento e patogeni di *E.coli*. La (figura 4) rappresenta un'illustrazione schematica delle diverse fasi della formazione di biofilm batterico e dell'attività inibitoria del biofilm da parte delle AgNPs [37].

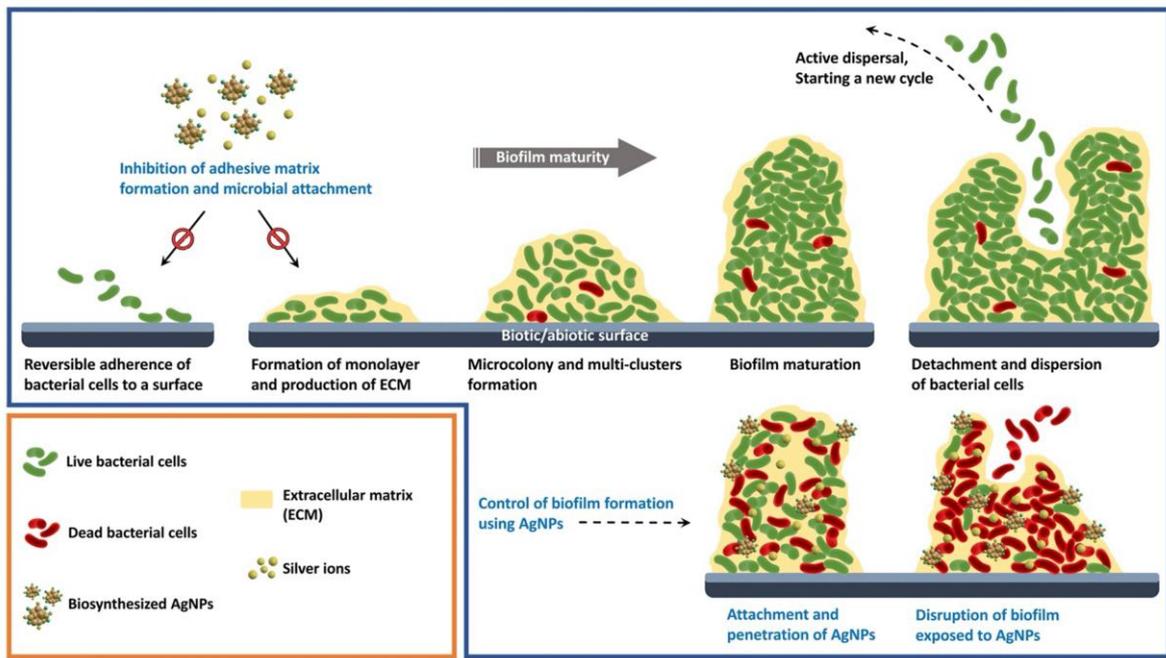


Figura 4 illustrazione schematica delle diverse fasi della formazione del biofilm batterico e dell'attività inibitoria del biofilm delle AgNPs [37]

Un altro studio condotto nel 2017 da *Sheikh & Tale* [38] su una serie di batteri, tra i quali *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Staphylococcus spp.*, and *Klebsiella spp.*, isolati da campioni di urina di pazienti che presentavano infezioni del tratto urinario (UTI), ha dimostrato le spiccate capacità antibatteriche e anti-quorum sensing delle nanoparticelle di argento.



**Politecnico
di Torino**

3.3 Sintesi e applicazioni delle Nanoparticelle di argento

La sintesi delle AgNPs comprende principalmente due approcci: quello top-down e quello bottom-up, che prevedono principalmente l'applicazione di metodi fisici e chimici. Nell'approccio bottom-up, le nanoparticelle possono essere sintetizzate utilizzando metodi chimici e biologici, che comportano l'autoassemblaggio di atomi in nuovi nuclei, che formano particelle su scala nanometrica; in questo approccio la tecnica più utilizzata è la riduzione chimica, in cui vengono impiegati diversi agenti riducenti organici e inorganici per la riduzione degli ioni argento (Ag^+) in soluzioni acquose e non acquose. Al contrario, nell'approccio top-down, il materiale in bulk viene ridotto in particelle fini mediante varie tecniche litografiche o applicazione di forze meccaniche [39]; si producono così le nanoparticelle, che si presentano più uniformi e possiedono un'elevata purezza. Un problema di questo approccio è che, non utilizzando sostanze chimiche dannose, non presenta stabilizzanti o agenti di capping per evitare l'agglomerazione; inoltre, queste procedure richiedono attrezzature sofisticate e impiego di grandi energie esterne. Per queste ragioni, ad oggi i metodi più usati per la produzione di AgNPs si basano sulla sintesi chimica, attraverso cui, sotto determinate condizioni, Ag^+ da un precursore di sale d'argento, tramite trasferimento di elettroni, viene ridotto ad argento elementare. Questa sintesi permette di produrre nanoparticelle senza aggregazione e con un'elevata resa. Nelle procedure di sintesi chimica, generalmente, si utilizzano tre componenti reagenti: un precursore di sale d'argento, agenti riducenti e una sostanza chimica stabilizzante; la funzione di quest'ultima è di evitare l'agglomerazione dopo la sintesi. Tra i materiali più impiegati negli ultimi anni per questa funzione vi sono anche i composti polimerici [40].

L'attività antibatterica dell'argento su scala nanometrica è stata molto utile nei settori medico e sanitario, dove è stata studiata l'incorporazione di AgNPs in centinaia di prodotti, tra cui strumenti chirurgici e per la manipolazione degli alimenti, indumenti, cosmetici, prodotti dentali, cateteri e medicazioni [50]. Oggigiorno, le nanoparticelle d'argento vengono esplorate in vari settori, come



**Politecnico
di Torino**

medicina, biotecnologia, scienza dei materiali e settori energetici, e, in particolare, per prodotti medicinali, industrie alimentari e tessili e sistemi di disinfezione dell'acqua.

Le applicazioni mediche delle nanoparticelle d'argento spaziano dai trattamenti antimicrobici e anticancro alla guarigione delle ferite, alla riparazione delle ossa, agli adiuvanti dei vaccini, agli agenti antidiabetici e ai biosensori [51]. Le nanoparticelle d'argento sono altamente rilevanti come agenti antibatterici nei settori tessile, sanitario e alimentare, e mostrano eccellenti proprietà antimicrobiche, compatibili con applicazioni nel campo della purificazione dell'aria, permettendo di migliorare l'attività antibatterica dei materiali di filtrazione [52-53].



**Politecnico
di Torino**

3.4 Membrane polimeriche elettrospinnate con potere antibatterico

L'utilizzo di nano-fibre realizzate tramite elettrofilatura ha riscosso notevole successo in diversi settori, tra i quali anche quello biomedicale. Tali nano-fibre presentano caratteristiche distintive come ampia superficie, elevata porosità, struttura interconnessa, che le rendono ottimali per una vasta gamma di applicazioni, come l'ingegneria tissutale, la protezione di tessuti, la realizzazione di filtri, i sistemi per la somministrazione di farmaci, la realizzazione di materiali compositi e il campo antimicrobico [46]. L'elettrospinning è il processo di conversione di una soluzione polimerica liquida in nanofibre solide mediante l'applicazione di una forza elettrica in presenza di un forte campo elettrico; esso consente di produrre in modo efficiente fibre con diametri che vanno da pochi nanometri a diversi micrometri. I numerosi vantaggi che questa tecnica offre permettono di realizzare nano-fibre, utilizzando una vasta gamma di soluzioni polimeriche sintetiche o naturali, biodegradabili o non biodegradabili [47]. Una pratica ampiamente sviluppata prevede di combinare nano-fibre realizzate a partire da soluzioni polimeriche con AgNPs, permettendo di ottenere materiali con proprietà antibatteriche e antivirali per una varietà di applicazioni, tra le quali il campo della filtrazione. Inoltre, i processi di rivestimento con AgNPs sulle superfici di nano-fibre a base di polimeri permettono la realizzazione di materiali ibridi, che migliorano l'attività funzionale delle AgNPs [46]. I polimeri utilizzati per la fabbricazione di nano-fibre antibatteriche possiedono proprietà quali la non tossicità, buone proprietà meccaniche, biocompatibilità e biodegradabilità. Tra questi vi sono: PCL, PVA, PLA, PLGA Chitosano ecc... [57]. Diversi studi hanno dimostrato come la realizzazione di nanofibre elettrospinnate combinando polimeri e AgNPs abbiano rivelato proprietà antibatteriche. Un esempio è lo studio condotto da *Zhang et al.* [48], dove hanno prodotto delle nanofibre di PVA con nanoparticelle d'argento preparate tramite elettrospinning: questi film compositi hanno mostrato buone attività antibatteriche contro microorganismi Gram-positivi e Gram-negativi.

L'utilizzo di membrane elettrofilate composte da materiale polimerico e nanoparticelle d'argento è oggetto di studio anche nel campo della filtrazione d'aria; nello studio condotto da *Yang et al.*



**Politecnico
di Torino**

[49] è stata realizzata una membrana nanofibrosa composta di AgNPs e PAN, preparata tramite elettrofilatura, dove le particelle di Ag fungevano da antibatterico e la nanofibra in PAN come supporto del prodotto composito. I test antibatterici condotti contro *E.coli* e *S.aureus* hanno mostrato come la presenza delle AgNPS all'interno del materiale composito permettano l'inibizione sulla crescita di entrambe le specie batteriche, confermando la possibilità di applicazione in maschere, filtri d'aria condizionata, zanzariere ed oggetti simili.



**Politecnico
di Torino**

3.5 Rivestimenti compositi con Nanoparticelle d'Argento

La realizzazione di rivestimenti compositi che incorporano le AgNPs all'interno di una matrice consente di mantenere un potere battericida durevole nel tempo attraverso un rilascio controllato e graduale degli ioni di argento ed evita, inoltre, la dispersione di nanoclusters nell'ambiente [42]. Recentemente sono state studiate nuove tecniche per la realizzazione di rivestimenti compositi contenenti nanoparticelle d'argento, che consentono di trasferire le proprietà antibatteriche dell'argento a un'ampia classe di materiali: vetri, ceramici, metalli e polimeri. Tra queste, lo sputtering si è rivelata uno dei metodi di rivestimento più versatili, essendo adatto alla maggior parte dei substrati poiché non raggiunge alte temperature che potrebbero compromettere le proprietà meccaniche e termiche dei materiali da rivestire [41]. Lo sputtering è un metodo di deposizione fisica da vapore (PVD) per depositare film sottili su substrati: la tecnica si basa sul bombardamento ionico di un materiale sorgente, definito target, viene effettuato all'interno di camere a vuoto e può essere performato utilizzando diverse fonti di energia, come il DC sputtering o RF sputtering. In particolare, il co-sputtering è il processo mediante il quale due o più materiali target o sorgenti vengono depositi, contemporaneamente o in sequenza, all'interno della camera a vuoto; è una tecnica che utilizza più di un catodo nella camera di processo, dove la potenza di ogni catodo può essere controllata in modo indipendente. Ciò consente di combinare diversi tipi di materiale target per creare composizioni e proprietà uniche in film sottili. Diversi studi condotti da *Ferraris et al.* [44-45] testimoniano come la co-deposizione o "co-sputtering" in radiofrequenza RF rappresenti un metodo valido per la realizzazione di rivestimenti antibatterici costituiti da nanoclusters di argento. L'impiego combinato della tecnica del co-sputtering e dei nanoclusters metallici consente di ottenere rivestimenti con elevata resistenza meccanica e termica all'usura e all'invecchiamento ottenendo al contempo proprietà antibatteriche durevoli nel tempo [43].

In un altro studio condotto da *Balagna et al.*[42] gli autori hanno sviluppato un rivestimento composito di nanoclusters di argento/silice depositato tramite co-sputtering. Lo scopo è stato



quello di valutare le proprietà antibatteriche e antivirali di questi rivestimenti depositati su filtri d'aria in fibra di vetro e polimerici. Le deposizioni sono state eseguite in atmosfera di argon puro a una pressione di 5,5 dPa, variando i parametri di processo; una potenza di 200W è stata applicata in modalità di radiofrequenza (RF) al target in silice per entrambi i filtri d'aria, mentre per l'argento 3 e 5 W sono stati applicati in modalità corrente continua (DC) al filtro in fibra di vetro, e 3 W in corrente continua (DC) al filtro polimerico. Il test di rilascio di ioni di argento in acqua ha mostrato un rilascio graduale di ioni, noto per il suo effetto antibatterico prolungato e continuo del rivestimento; inoltre, quest'ultimo ha mostrato proprietà antibatteriche contro ceppi di batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Il test dell'alone d'inibizione e un conteggio CFU hanno confermato l'effetto antibatterico del rivestimento composito in nanocluster d'argento/silice su entrambi i filtri d'aria (*figura 5*).

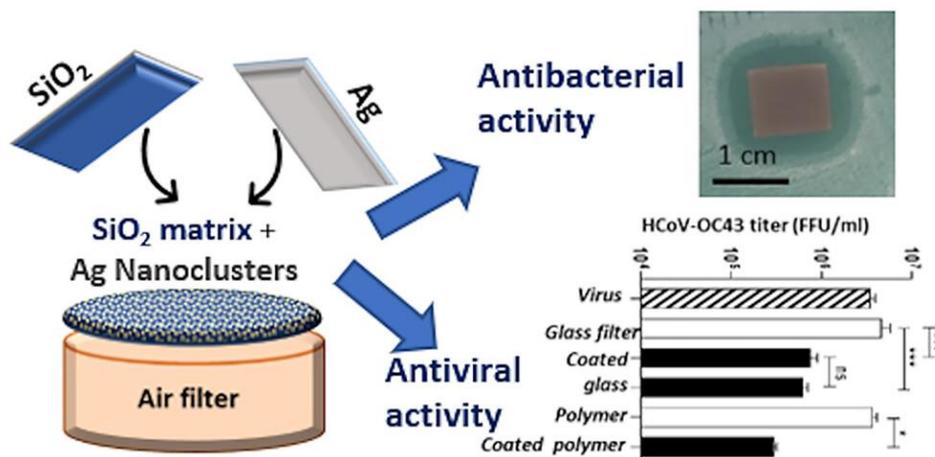


Figura 5 [42]



4 Materiali e Metodi

4.1 Le Membrane

I substrati delle membrane in Nylon 6 e PVA sono stati forniti dal *Polimi*, realizzati a partire dalla soluzione composta dal *Nylon6 Aldrich 181110* come polimero funzionale (25% wt rispetto all'acido formico) e l'acido formico come solvente, la soluzione è stata agitata a T ambiente per circa un'ora. Per il PVA è stata aggiunta lentamente ad acqua distillata una quantità ponderata di PVA (alcool polivinilico) completamente idrolizzato ($M_w=89000-98000$ Da) ed è stato lasciato sciogliere sotto moderata agitazione, la concentrazione scelta di PVA puro in acqua è stata mantenuta al 12% w/w, la soluzione è stata agitata a 95°C per un'ora e poi è stata raffreddata lentamente a temperatura ambiente, ottenendo così una soluzione di PVA limpida e priva di precipitati. Per ottenere le fibre in configurazione random attraverso l'elettrospinning si è utilizzato un set up orizzontale statico sia per Nylon6 che per il PVA (*figura 6*).

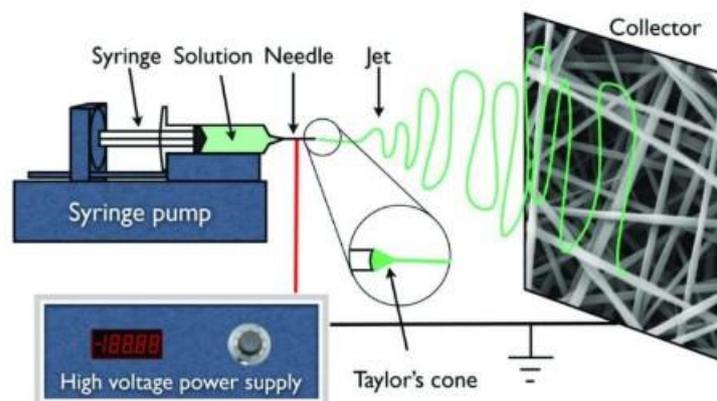


Figura 6 Set up statico orizzontale elettrospinning (Nanosustech)



**Politecnico
di Torino**

Per la soluzione di Nylon6 i con questa configurazione i parametri ottimali sono: flusso di 0,05 ml/h e un voltaggio di 18kV distanza dal collettore di 20 cm.

Per il PVA si è optato per un voltaggio a pari a 14kV e un flusso di 0,2 ml/h distanza dal collettore di 20 cm. Entrambi i campioni sono stati elettrospinnati per 1-2 ore. Per i campioni con configurazione allineata delle fibre è stato utilizzato il set up verticale dinamico con collettore rotante, per il Ny6 i parametri sono stati: flusso di 0,1 ml/h voltaggio a 18 kV e una velocità del collettore di 400 giri/min; per il PVA, matrici uniformi sono state ottenute a valori medio-bassi di umidità, alti valori di umidità relativa sono stati evitati perché l'elettrospinning in queste condizioni ha portato a fibre difettose in qualsiasi condizione sperimentale testata. Successivamente per il PVA è stato eseguito un secondo step di reticolazione, poiché risultava solubile in acqua e poteva facilmente dissolversi in caso di contatto prolungato con essa o in condizioni prolungate di atmosfera umida.

La realizzazione dei rivestimenti antibatterici costituiti da Argento/Silice(SiO_2) e Argento/Zirconia(ZrO_2) sulle membrane elettrospinnate di Nylon 6 in configurazione allineata e random e sul PVA come filato e quello reticolato è stata effettuata al Politecnico di Torino presso il DISAT attraverso la tecnica del co-sputtering (*figura 7*).



**Politecnico
di Torino**

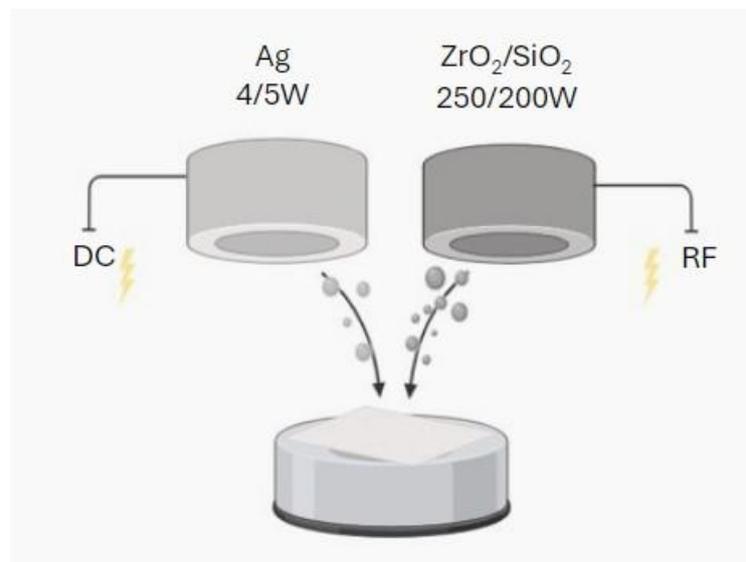


Figura 7 deposizione tramite co-sputtering di rivestimenti composti su membrane elettrospinnate

Lo sputtering è stato effettuato predisponendo due bersagli per ogni deposizione, la Silice o la Zirconia e l'Argento. Una potenza di 200 W in modalità radiofrequenza (RF) al target in Silice e di 5 W in modalità di corrente continua (DC) al target in Argento sono stati forniti al fine di realizzare il rivestimento composito Silice/Argento sulle membrane precedentemente elettrospinnate. Per quanto riguarda invece la deposizione del rivestimento composito Zirconia/Argento è stata applicata una potenza di 250 W in modalità radiofrequenza (RF) al target in Zirconia e di 4 W in modalità corrente continua (DC) al target in Argento. Per il PVA inoltre sono state realizzate anche delle membrane che incorporassero le AgNPs nella soluzione da elettrospinnare denominate PVA AgNPs crosslinked che non sono state successivamente sottoposte a co-sputtering.

Per quanto riguarda le membrane in PAN funzionalizzate con le AgNPs, sono state realizzate elettrospinnando un blend polimerico costituito da PAN e AgNPs con una differente concentrazione di PVP, ottenendo tre tipologie di membrane: PAN + 0,1mMPVPAgNPs, PAN + 1mMPVPAgNPs, PAN + 2mMPVPAgNPs, essendo stato riscontrato che la concentrazione di



**Politecnico
di Torino**

PVP è strettamente correlata alla concentrazione di AgNPs all'interno della membrana funzionalizzata. Le nanoparticelle sono state realizzate tramite riduzione chimica, a partire da un sale d'argento sciolto nel solvente DMF (dimetilformammide) ottenendo così ioni Ag^+ , viene poi utilizzato come agente riducente e di capping il PVP a tre diverse concentrazioni 0,1mM, 1mM, 2mM così si ottiene la riduzione degli ioni argento da Ag^+ ad Ag^0 , ciò consente l'aggregazione e la formazione delle AgNPs, il PVP si dispone intorno alle nanoparticelle per stabilizzarle, si tratta di un polimero solubile in acqua dalla cui concentrazione dipende anche la percentuale di AgNPs presenti all'interno delle membrane elettrospinate.



**Politecnico
di Torino**

4.2 Caratterizzazione morfologica e composizionale

Dal punto di vista morfologico e composizionale, le membrane sono state indagate mediante microscopia elettronica a scansione con sorgente a emissione di campo (FESEM) e spettroscopia per dispersione di energia (EDS). La prima tecnica consente di ottenere immagini con dimensioni nell'ordine della nano scala; ciò permette di analizzare la morfologia delle membrane, riuscendo, quindi, a caratterizzarle dal punto di vista dell'orientazione e disposizione delle nano-fibre e di indagare la distribuzione delle nanoparticelle d'argento e del rivestimento composito contenente nanoclusters di Ag. L'EDS consente, invece, di effettuare un'analisi a livello composizionale, grazie alla quale è possibile ottenere informazioni circa la presenza di argento all'interno delle membrane e riguardo la presenza di Si e Zr per i campioni rivestiti attraverso la tecnica del co-sputtering.



**Politecnico
di Torino**

4.3 Test Antibatterici

4.3.1 Test dell'alone d'inibizione

Per la valutazione dell'attività antibatterica, come test iniziale è stato condotto il test dell'alone d'inibizione (NCCLS M2- A9) [55], effettuato su tutte le tipologie di membrane. Si tratta di un test qualitativo, nel quale si verifica la formazione di un alone privo di batteri nelle immediate vicinanze del campione incubato a contatto con il ceppo batterico. Come ceppi batterici sono stati impiegati lo *S.epidermidis*, un batterio non patogeno naturalmente presente sulla pelle e l'*E.coli*. Il test viene effettuato preparando una soluzione batterica in brodo nutriente, che contiene una determinata concentrazione di cellule batteriche per volume di sospensione; questa viene determinata in base all'indice di McFarland: il valore di riferimento scelto è stato pari a 0.5, corrispondente a circa 10^8 CFU (unità formanti colonie su ml). La soluzione batterica così preparata viene poi omogeneamente distribuita su una piastra di agar Mueller-Hinton e, a questo punto, i campioni vengono posizionati sulla piastra con la parte rivestita a contatto con essa. La piastra contenente i campioni viene posta in incubatore a 35°C e dopo 24/48h viene prelevata e si verifica l'azione antibatterica, osservando la formazione o meno di un alone privo di batteri nell'intorno e al di sotto del campione.



**Politecnico
di Torino**

4.3.2 Test di contaminazione batterica tramite bioaerosol e della conta delle unità formanti colonie (CFU).

Il test di contaminazione batterica tramite bioaerosol è stato condotto sulle membrane in Nylon6 SiO₂Ag e ZrO₂Ag in configurazione random. È stata dapprima realizzata una sospensione batterica, utilizzando come batterio lo *S. epidermidis*, prelevato tramite cotton fioc dalla piastra e posto all'interno di un brodo Cuore-Cervello (Brain Heart infusion- BHI), al fine di raggiungere un indice di McFarland pari a 6,6 misurato tramite densitometro. Successivamente, sono stati disposti i campioni di dimensione pari a 1x1 cm² corrispondenti a: due Nylon6 tal quali, 3 Nylon6 SiO₂Ag, 3 Nylon6 ZrO₂Ag, tutti in configurazione random all'interno di una petri. Per lo step di contaminazione è stato allestito un set up sperimentale, costruito per simulare le condizioni del sistema di ventilazione dell'aria; questo apparato è costituito da un generatore di bioaerosol (TOPAS, atm 220) (figura 8), che permette, tramite aria compressa con flusso d'aria regolabile che scorre attraverso il generatore di aerosol, di produrre il bioaerosol dalla sospensione batterica. Questo entra nella colonna di filtrazione e inquina i campioni disposti sulla petri. Il tutto è stato eseguito sotto cappa biologica, per un tempo di contaminazione pari a trenta minuti. Trascorsi i trenta minuti, i campioni sono stati prelevati e disposti all'interno di provette contenenti brodo Mueller-Hinton e posti in incubatore per 24 ore alla temperatura di 35°C, in modo da permettere lo sviluppo delle colonie batteriche. Passate le 24 ore, per valutare il numero di CFU che hanno aderito alla superficie dei campioni, questi sono stati prelevati dal brodo e posti all'interno di 3 ml di soluzione fisiologica, successivamente sono stati vortexati per 5 minuti in un bagno a ultrasuoni; queste soluzioni vengono poi diluite con altre soluzioni fisiologiche e, infine, un'aliquota delle soluzioni diluite viene depositata su piastre di coltura agar-sangue sotto cappa biologica. Trascorse altre 24 ore in incubatore a 35°C, la crescita di eventuali colonie batteriche viene quantificata tramite conta: più efficace è il carattere antibatterico del campione testato, minore sarà il numero delle colonie batteriche cresciute.



**Politecnico
di Torino**



Figura 8 bioaerosol TOPAS, atm 220



**Politecnico
di Torino**

4.4 Prove di rilascio ionico in acqua

Per valutare il rilascio di ioni argento Ag^+ delle membrane, strettamente correlato all'attività antibatterica, sono stati effettuati dei test di rilascio ionico in acqua Milli-Q a temperatura ambiente. Questa prova è stata condotta per i campioni di PAN, 0,1 mM, 1mM, 2mM e per il PVA, considerando intervalli di tempo diversi per le due tipologie di membrane.

Per quanto riguarda le membrane di PAN, sono stati preparati sei campioni per ciascuna tipologia (0,1mM,1mM,2mM), di dimensione pari a $1 \times 1 \text{ cm}^2$, tre dei quali utilizzati tal quali per la prova di rilascio ionico; per gli altri tre è stato effettuato uno step preliminare di risciacquo, nel quale sono stati posti in acqua Milli-Q per trenta minuti, al fine di valutare l'andamento del rilascio a seguito dell'esposizione in ambiente acquoso (questi campioni verranno poi denominati Rinsed) e non. Per il PAN 0,1mM i sei campioni sono stati immersi in 30 ml di acqua Milli-Q a temperatura ambiente per diversi intervalli di tempo: 1 ora, 3 ore, 6 ore, 8 ore, 16, ore 24 ore. Al termine di ogni intervallo temporale, la soluzione è stata prelevata ed è stata determinata la concentrazione di ioni Ag^+ in soluzione tramite fotometro (Hanna instrument) (*figura 9*). La stessa procedura è stata adoperata per il PAN 1mM e 2mM.



**Politecnico
di Torino**



Figura 9 set up per la valutazione del rilascio di ioni argento Ag^+ in acqua

Per le membrane di PVA crosslinked con AgNPs, PVA SiO_2Ag , PVA ZrO_2Ag , sono stati preparati tre campioni per ciascuna delle tre tipologie, di dimensione $1 \times 1 \text{ cm}^2$, dopodiché questi sono stati immersi in 30 ml di acqua Milli-Q a temperatura ambiente per intervalli di tempo pari a: 1 ora, 3 ore, 1 giorno, 3 giorni, 7 giorni, 14 giorni. Al termine di ogni lasso temporale, la soluzione è stata prelevata ed è stata determinata la concentrazione di ioni Ag^+ in soluzione tramite fotometro (Hanna instrument).



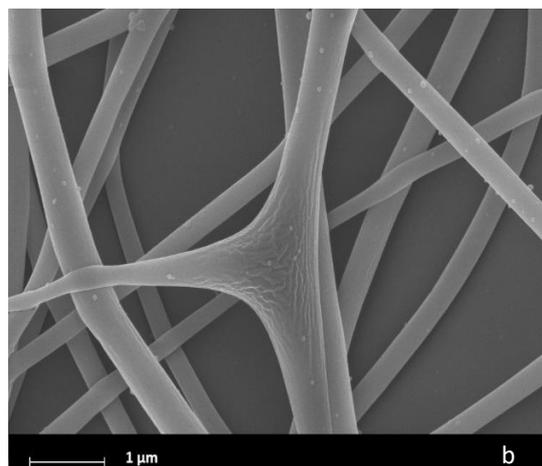
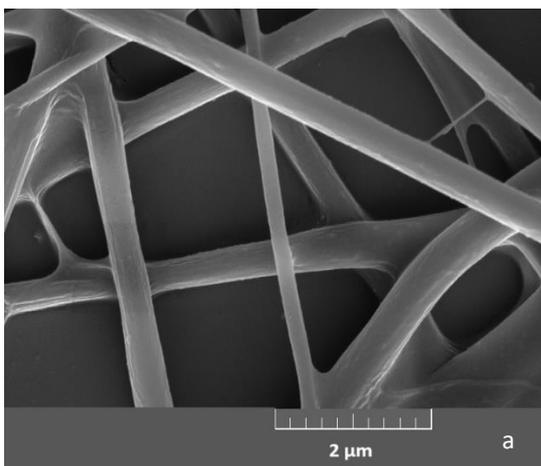
**Politecnico
di Torino**

5 Risultati

5.1 Caratterizzazione morfologica e composizionale

Microscopia elettronica con sorgente a emissione di campo (FESEM)

Per verificare la presenza di argento e la presenza dei rivestimenti di Silice/Argento e Zirconia/Argento sulle membrane in PAN, PVA e Nylon, è stata effettuata un'analisi morfologica tramite microscopia elettronica a scansione con sorgente a emissione di campo (FESEM). Sono stati dapprima indagati i campioni in PVA crosslinked con AgNPs, PVA cross SiO_2Ag e PVA cross ZrO_2Ag .



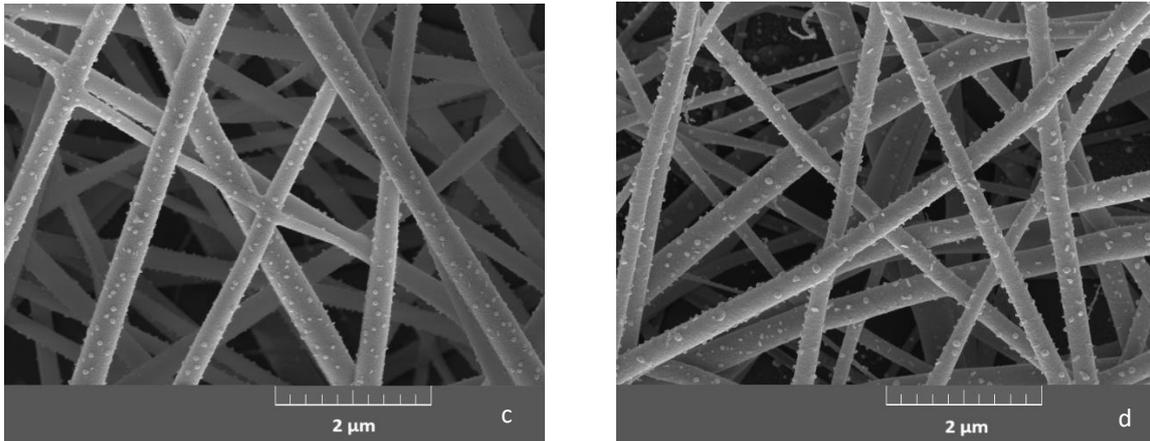


Figura 10 Micrografia FESEM delle membrane in PVA crosslinked con ingrandimento a 30kX:
a) PVA controllo; b) PVA AgNPs; c) PVA SiO₂Ag; d) PVA ZrO₂Ag

In *figura 10* è possibile osservare la micrografia FESEM delle membrane in PVA. Dalle immagini appare chiaro come, nel caso del PVA di controllo (*figura a*), non si riscontrino presenza di argento, testimoniato dalle fibre che appaiono lisce e senza presenza di AgNPs; nella *figura b*, rappresentante il PVA con AgNPs, sono osservabili le AgNPs all'interno e sulla superficie delle fibre; nelle *figura c* e *figura d*, che identificano il PVA SiO₂Ag e PVA ZrO₂Ag ottenuti con la tecnica del co-sputtering, si nota come le fibre siano ben ricoperte dal rivestimento composito rispetto al campione b, dove la presenza di AgNPs appare molto meno uniforme; ciò evidenzia come la tecnica di co-sputtering consenta di ottenere rivestimenti uniformi e una migliore distribuzione di argento sulle fibre.

La microscopia FESEM è stata poi impiegata anche per le membrane in Nylon in entrambe le configurazioni (allineata e random) per valutarne l'orientazione delle fibre e indagare i rivestimenti compositi (matrice di silice o zirconia) contenenti nanoclusters di Ag depositati tramite co-sputtering.



Politecnico
di Torino

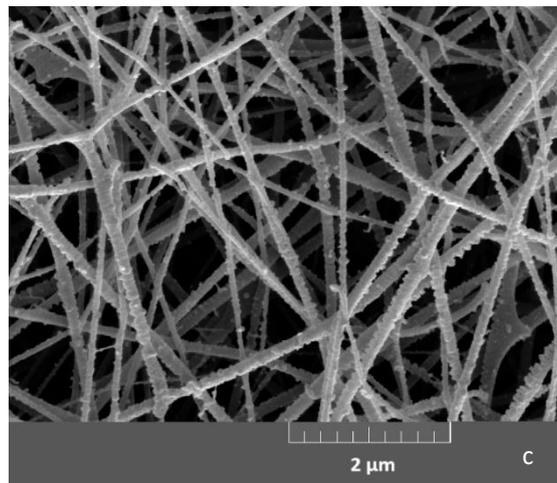
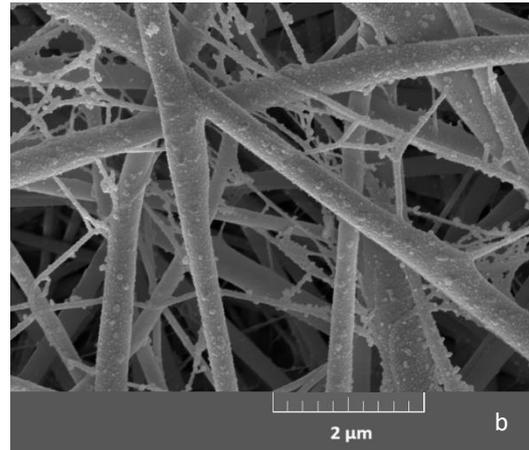
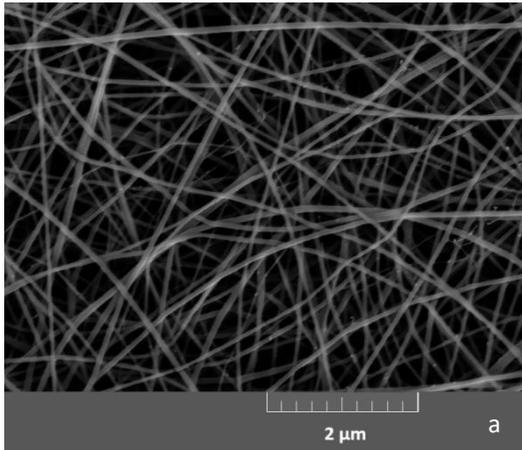
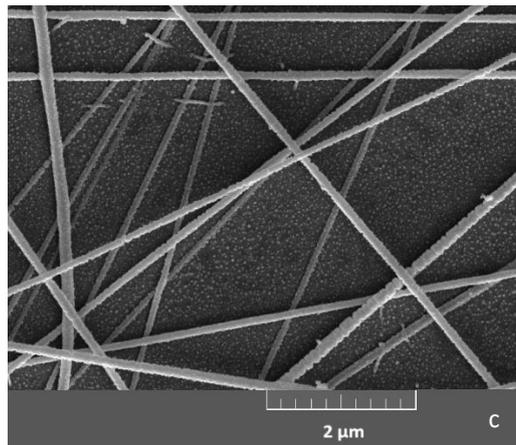
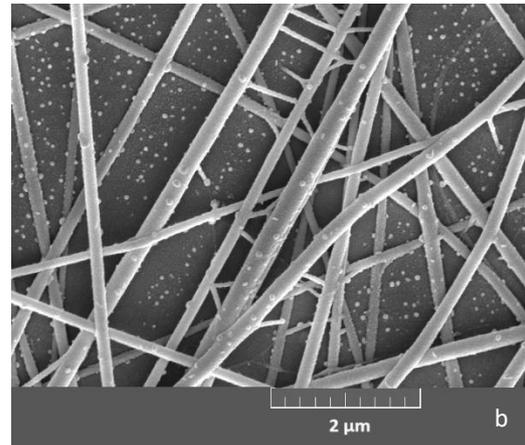
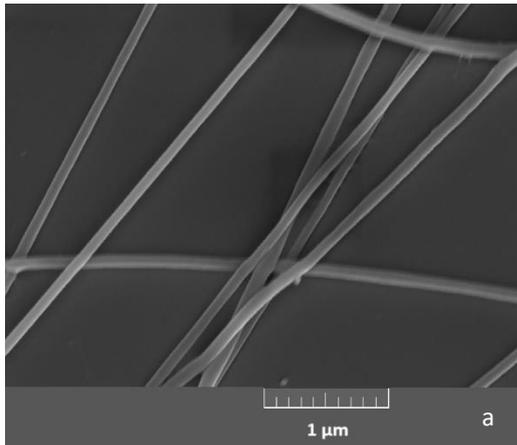


Figura 11 Micrografia FESEM delle membrane in Nylon 6 random con ingrandimento a 30kX:
a) Nylon 6 control; b) Nylon 6 SiO₂Ag; c) Nylon 6 ZrO₂Ag

La figura 11 testimonia l'efficacia del rivestimento tramite co-sputtering: si nota chiaramente dal confronto tra l'immagine a e le immagini b e c come questi ultimi campioni presentino fibre in configurazione random ben ricoperte, con una distribuzione uniforme dei rivestimenti.



Politecnico
di Torino



*Figura 12 Micrografia FESEM delle membrane in Nylon 6 aligned:
a) Nylon 6 control a 10kX; b) Nylon 6 SiO₂/Ag a 30kX; c) Nylon 6 ZrO₂/Ag a 30kX*

In *figura 12* si nota, anzitutto, l'orientazione allineata delle fibre costituenti le membrane in Nylon 6, ben differente rispetto al caso precedente in configurazione random; inoltre, si certifica la deposizione del rivestimento composito ottenuto tramite co-sputtering: i campioni b e c presentano anche in questo caso fibre ben ricoperte, che non si riscontrano, invece, nel caso del campione a non sottoposto al processo di co-sputtering.



In seguito, è stata indagata la morfologia delle membrane in PAN 0,1 mM PVP AgNPs, 1 mM PVP AgNPs, 2mM PVP AgNPs, confrontando i campioni non sottoposti allo step preliminare di risciacquo, denominati “not rinsed”, con quelli posti in acqua Milli-Q per 30 minuti, denominati “rinsed”.

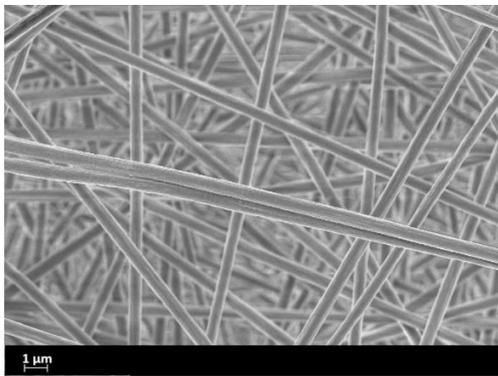


Figura 13 FESEM 10kX PAN 0.1mM PVP AgNPs not rinsed

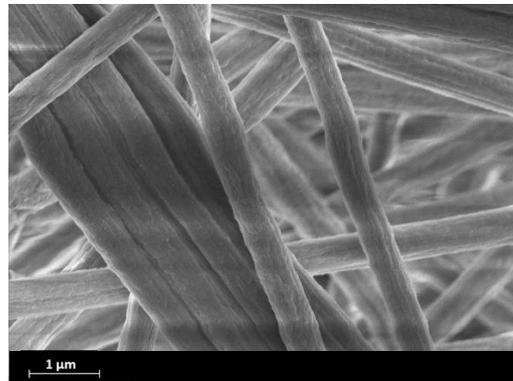


Figura 14 FESEM 30kX PAN 0.1mM PVP AgNPs rinsed

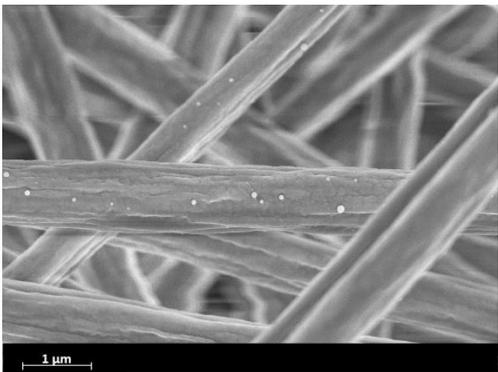


Figura 15 FESEM 30kX PAN 1mM PVP AgNPs not rinsed

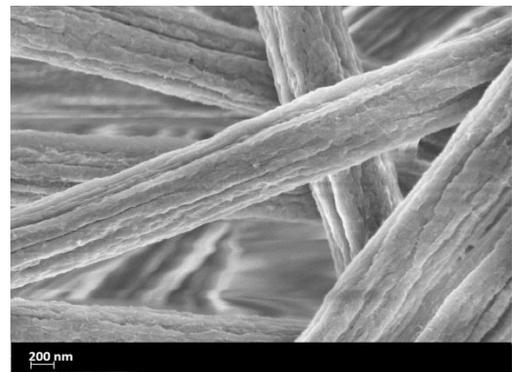


Figura 16 FESEM 50kX PAN 1mM PVP AgNPs rinsed



**Politecnico
di Torino**

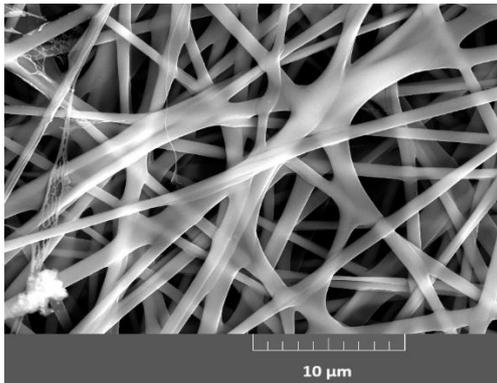


Figura 17 FESEM 10kX PAN 2mMPVPAgNPs not rinsed

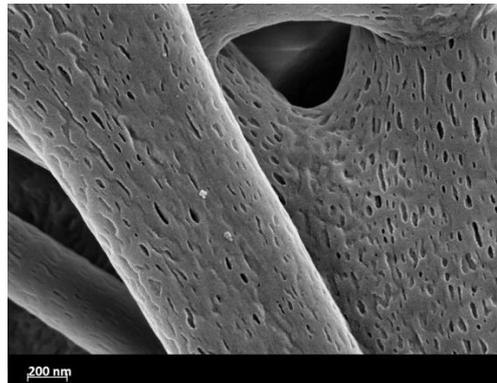


Figura 18 FESEM 80kX PAN 2mMPVPAgNPs rinsed

Le immagini ottenute tramite microscopia FESEM mostrano come, all'aumentare della concentrazione di PVP, aumenti anche la presenza di AgNPs, essendovi una diretta correlazione tra i due. Inoltre, si osserva come la morfologia delle nanofibre sia differente nel caso not rinsed e rinsed: in questi ultimi campioni le fibre presentano delle porosità dovute alla solubilità in acqua del PVP che all'aumentare della sua concentrazione risulta sempre più evidente; inoltre, vi è una minore concentrazione di AgNPs sulla superficie delle fibre dovute al rilascio ionico di argento in ambiente acquoso, coerentemente con quanto ci si aspettava. Si evidenzia, poi, come la tecnica di funzionalizzazione con AgNPs, incorporate nella soluzione da elettrospinnare, comporti una distribuzione di nanoparticelle d'argento non uniforme sulle fibre, ma più localizzata in determinate aree.



**Politecnico
di Torino**

Spettroscopia per dispersione di energia (EDS)

L'analisi elementare delle membrane in PVA è stata effettuata tramite EDS per verificarne la composizione. Sono stati esaminati i campioni in PVA crosslinked con AgNPs e quelli sottoposti a co-sputtering con la deposizione del rivestimento SiO_2Ag e ZrO_2Ag . Per ogni campione è stata calcolata la media, in termini di percentuale atomica, dei valori rilevati su tre aree.

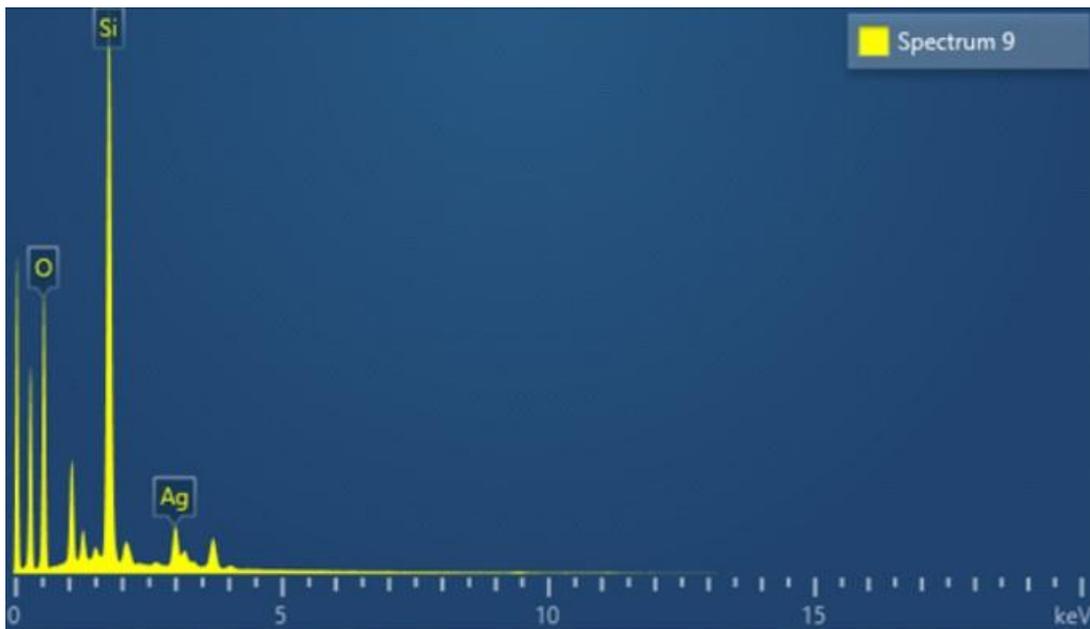


Figura 19 spettro EDS del PVA SiO_2Ag



**Politecnico
di Torino**

PVA Cross SiO ₂ Ag	
Elemento	Media (% atomica)
Si	48,57 ± 0,30
O	46,26 ± 0,26
Ag	5,16 ± 0,05

Tabella 1 composizione rivestimento tramite co-sputtering SiO₂Ag

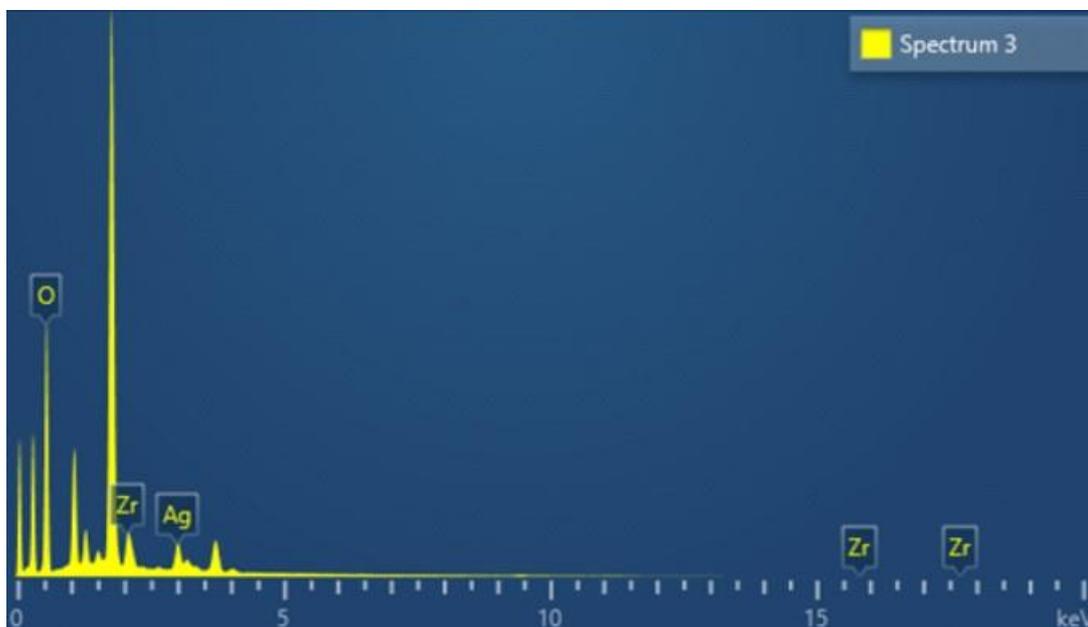


Figura 20 spettro EDS PVA ZrO₂Ag



**Politecnico
di Torino**

PVA Cross ZrO ₂ Ag	
Elemento	Media (% atomica)
Zr	3,76 ± 0,35
O	92,41 ± 0,09
Ag	3,82 ± 0,11

Tabella 2 composizione rivestimento tramite co-sputtering ZrO₂Ag

Come si nota dagli spettri ottenuti dalle analisi EDS (*Figure 19-20 tabelle 1-2*), in entrambi i rivestimenti depositi tramite co-sputtering vi è presenza di argento, che risulta maggiore nel caso del rivestimento SiO₂Ag. Si riscontra, inoltre, un aumento della presenza di ossigeno nel caso del campione PVA ZrO₂Ag rispetto al rivestimento composito con matrice di silice.

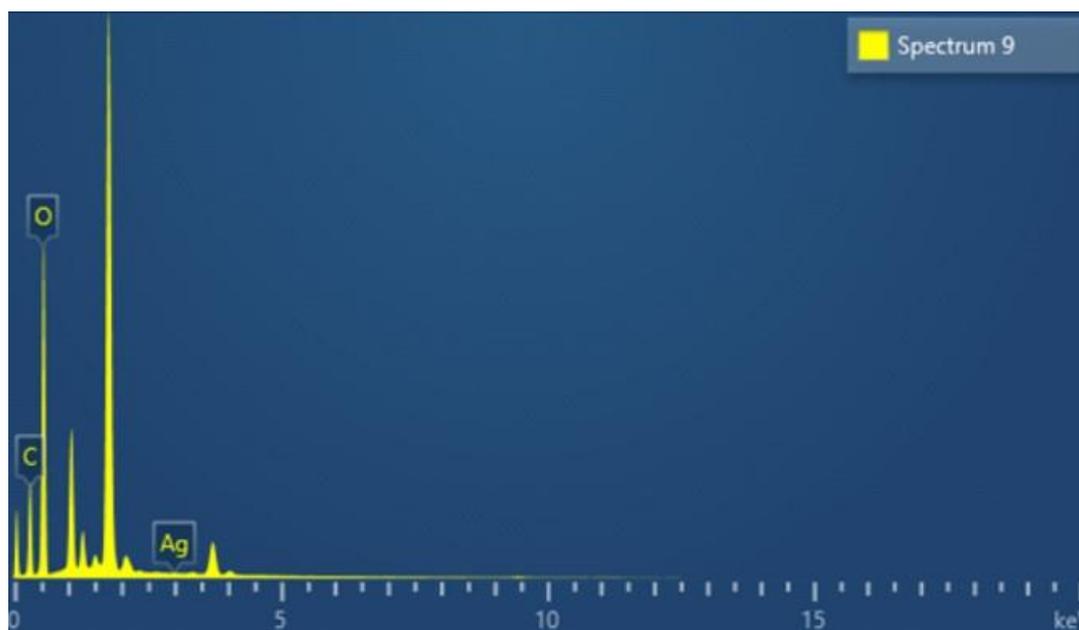


Figura 21 spettro EDS PVA AgNPs



**Politecnico
di Torino**

PVA Cross AgNPs	
Elemento	Media (% atomica)
C	29,25 ± 1,05
O	70,94 ± 0,88
Ag	0,04 ± 0,01

Tabella 3 composizione PVA AgNPs

L'analisi composizionale tramite EDS riportata in *figura 21* e in *tabella 3* mostra come nel caso delle membrane di PVA funzionalizzate con AgNPs incorporate nella soluzione da elettrospinnare la presenza di argento sia notevolmente inferiore rispetto al caso dei rivestimenti depositati tramite co-sputtering.



5.2 Test Antibatterici

Test dell'alone d'inibizione

Per quanto riguarda l'attività antibatterica, tutte le membrane sono state sottoposte al test dell'alone di inibizione, i cui risultati verranno ora illustrati.

Per le membrane in PAN è stata condotta una valutazione dell'alone di inibizione nei confronti della specie batterica *S.epidermidis*. I campioni indagati sono: PAN con solo PVP senza AgNPs come controllo, PAN 0,1mM PVP-AgNPs, PAN 1mM PVP-AgNPs, PAN 2mM PVP-AgNPs, rinsed e not rinsed.

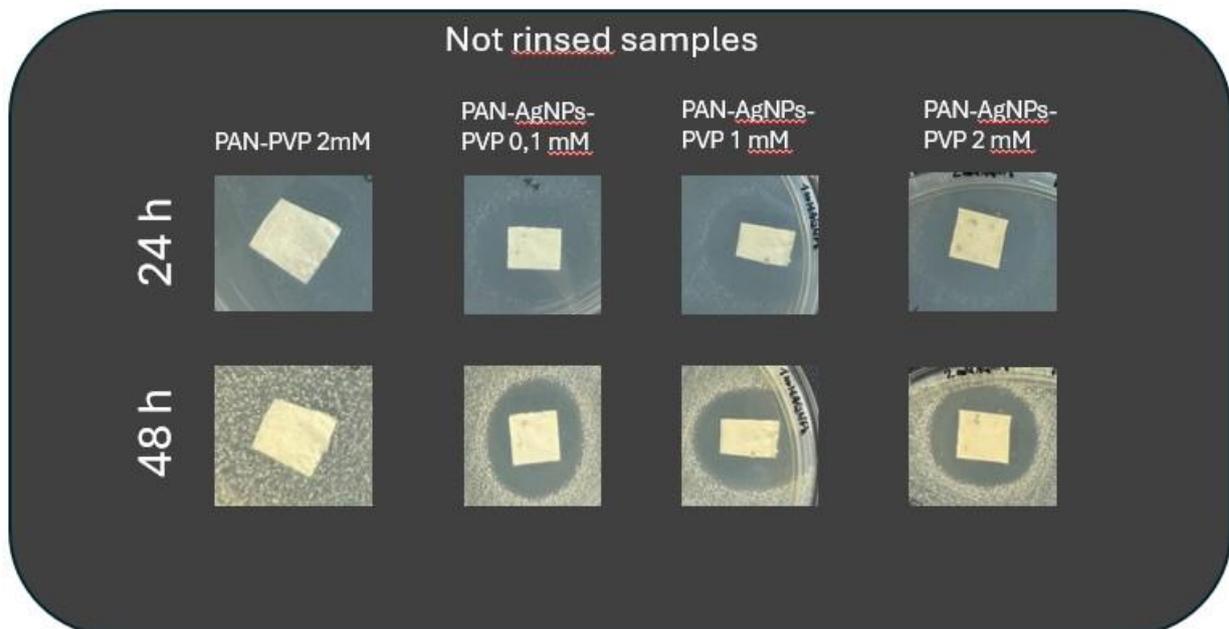


Figura 22 PAN-PVP-AgNPs not rinsed *S.epidermidis*

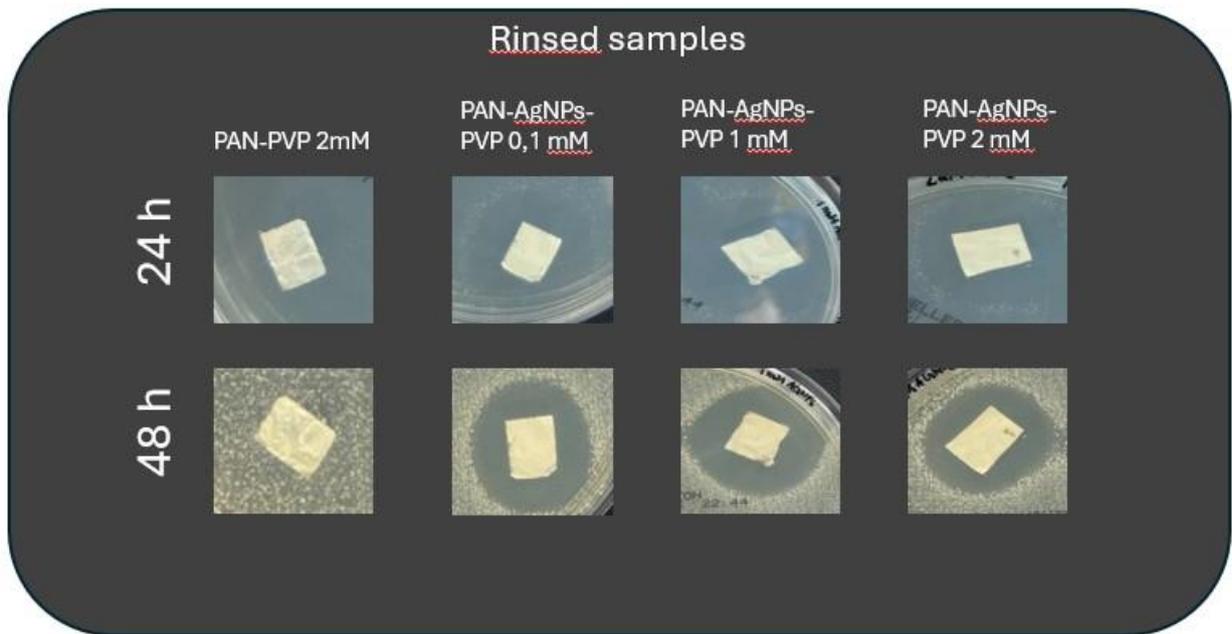


Figura 23 PAN-PVP-AgNPs Rinsed *S.epidermidis*

Le figure 22-23 mostrano i risultati ottenuti dopo 24 e 48 ore di incubazione: si nota come il campione con solo PVP di entrambe le tipologie (rinsed e not rinsed), non mostri alcun effetto antibatterico, coerentemente a quanto ci si aspetta, non essendovi presenza di AgNPs all'interno di esso; al contrario, negli altri campioni 0,1 mM PVP-AgNPs, 1mM PVP-AgNPs, 2mM PVP-AgNPs, rinsed e not rinsed, l'attività antibatterica è testimoniata dalla presenza di un alone d'inibizione nell'intorno del campione, già presente dopo le 24 ore e ancora più evidente dopo le 48.

Lo stesso test è stato eseguito per le membrane in Nylon6 in configurazione allineata e random, nella forma tal quale, quindi senza rivestimento tramite co-sputtering e nelle configurazioni con rivestimento Silice/Argento (SiO_2Ag) e Zirconia/Argento (ZrO_2Ag). La valutazione dell'alone d'inibizione è stata condotta nei confronti della specie batterica *S.epidermidis*.



Politecnico
di Torino

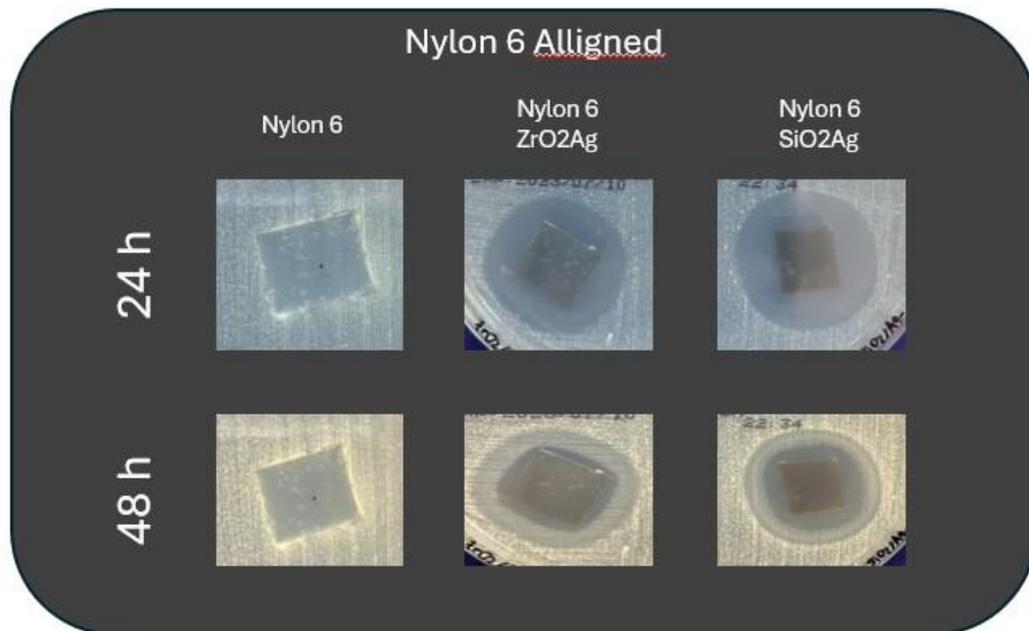


Figura 24 Nylon 6 alligned *S.epidermidis*

Le figura 24 illustra i risultati ottenuti dopo 24 e 48 ore di incubazione per le membrane allineate. Si nota come il campione rappresentante il Nylon6 tal quale, senza rivestimento, non mostri alcuna attività antibatterica, testimoniata dall'assenza di aloni di inibizione, coerentemente a quanto ci si aspetta non essendovi presenza di argento; diversamente, i campioni Nylon 6 ZrO₂Ag e Nylon 6 SiO₂Ag mostrano la presenza di un alone di inibizione nel loro intorno, sia dopo le 24 che le 48 ore.



Politecnico
di Torino

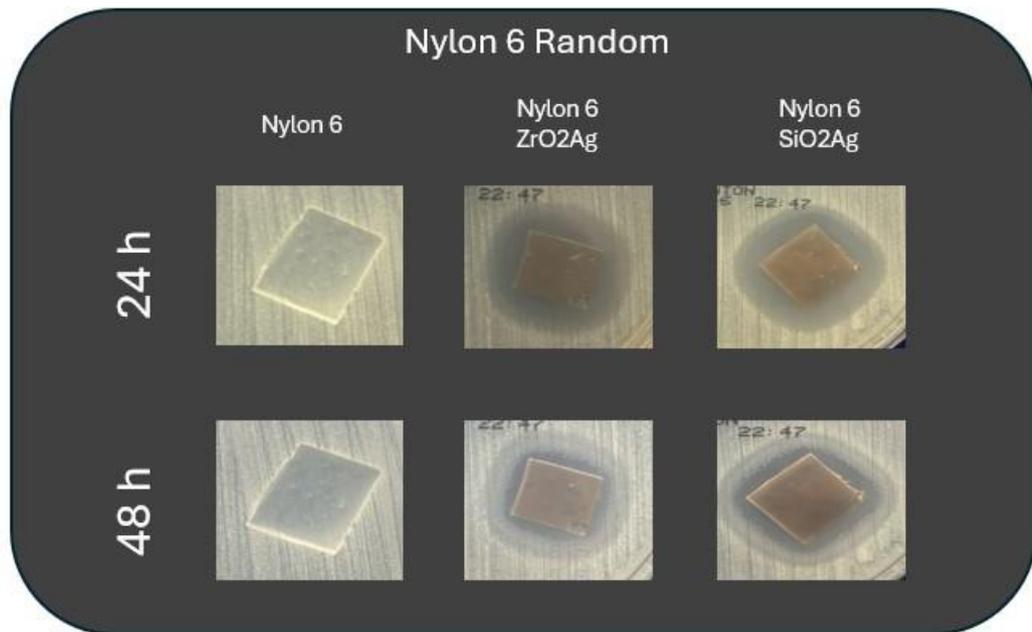


Figura 25 Nylon 6 random *S.epidermidis*

La stessa attività antibatterica dopo 24 e 48 ore di incubazione è stata riscontrata nei campioni Nylon 6 in configurazione random per entrambi i rivestimenti SiO_2Ag e ZrO_2Ag , nei confronti della specie batterica *S.epidermidis*. Nella figura 25 è visibile un alone di inibizione nell'intorno dei campioni di Nylon rivestiti, che è, invece, assente nel caso dei campioni in Nylon non rivestiti.

In ultimo, il test dell'alone di inibizione è stato eseguito per valutare l'attività antibatterica delle membrane in PVA crosslinked in forma tal quale, con solo la presenza di AgNPs e nella forma rivestita con rivestimento di Silice/Argento e Zirconia/Argento ottenuto tramite co-sputtering.



Politecnico
di Torino

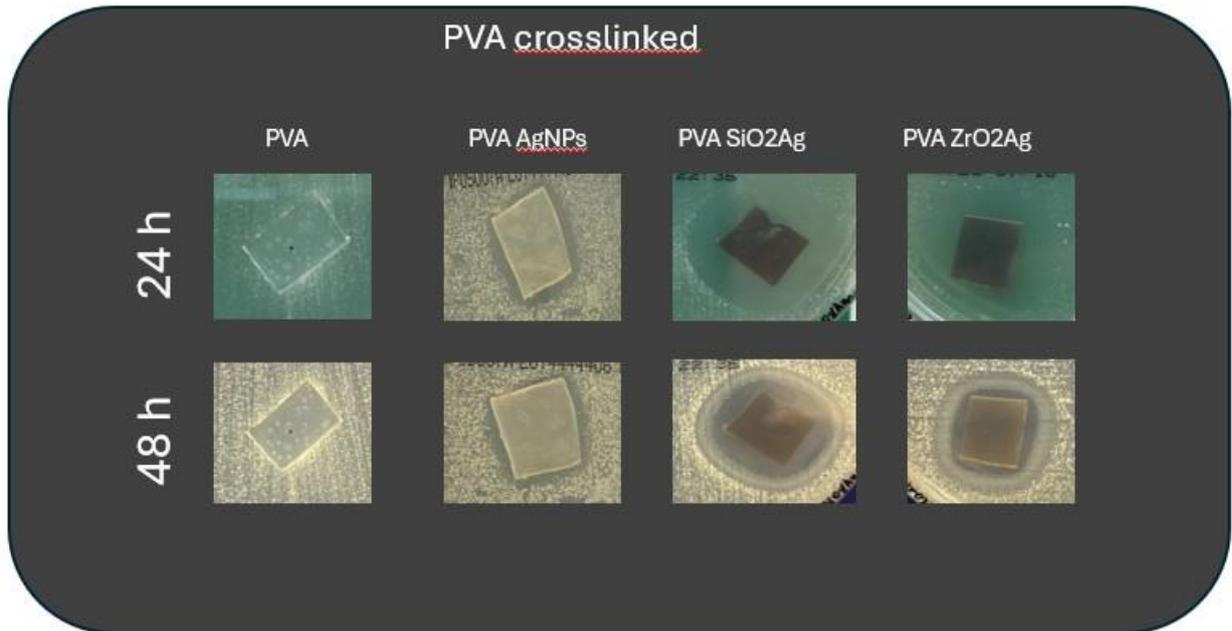


Figura 26 PVA reticolato SiO₂Ag e ZrO₂Ag e PVA AgNPs *S.epidermidis*

I risultati ottenuti dopo 24 e 48 ore di incubazione sono mostrati nella *figura 26* e confermano l'attività antibatterica del PVA reticolato e rivestito tramite co-sputtering con il rivestimento SiO₂Ag e ZrO₂Ag; si riscontra, infatti, la presenza di aloni di inibizione nell'intorno dei campioni rivestiti e del PVA con AgNPs e l'assenza di aloni di inibizione nell'intorno dei campioni di PVA non rivestiti. Inoltre, è interessante sottolineare come nel caso del PVA con AgNPs l'alone sia di dimensione inferiore rispetto ai campioni sottoposti a co-sputtering. L'attività antibatterica è quindi confermata nei confronti del ceppo batterico *S.epidermidis*.



Politecnico
di Torino

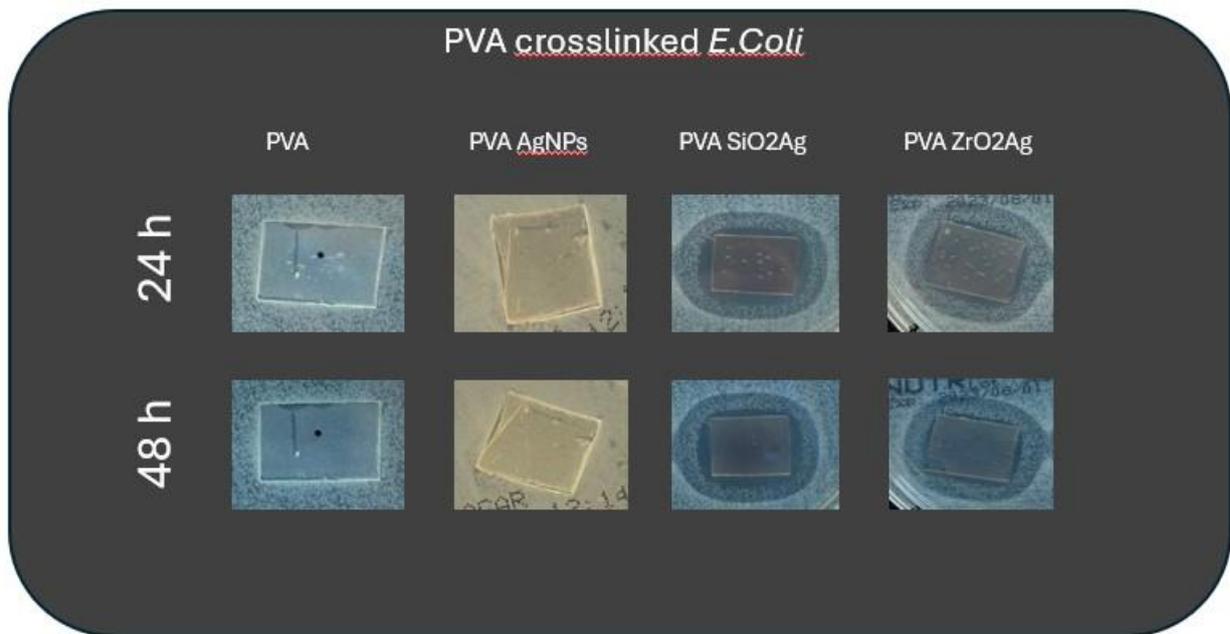


Figura 27 PVA reticolato SiO₂Ag e ZrO₂Ag e PVA AgNPs *E.coli*

È stato condotto, infine, il test dell'alone di inibizione anche contro il ceppo batterico *E.coli* per le membrane in PVA crosslinked. In figura 27 sono mostrati i risultati ottenuti dopo 24 e 48 ore; si riscontra come l'attività antibatterica sia confermata anche nei confronti di questo ceppo batterico da parte delle membrane con rivestimento ZrO₂Ag e SiO₂Ag ottenuto tramite co-sputtering, mentre, il campione in PVA con AgNPs incorporate nelle soluzione da elettrospinnare non mostri un'azione antibatterica nei confronti dell' *E.coli*.



Test di contaminazione batterica tramite bioaerosol e della conta delle unità formanti colonie (CFU).

In *figura 28* sono mostrati i risultati ottenuti nel test della conta delle unità formanti colonie (CFU) ottenuti tramite contaminazione bioaerosol con ceppo batterico *S.epidermidis*, condotto in duplicato sulle membrane in Nylon6 tal quale e in triplicato sulle membrane in Nylon6 SiO₂Ag e Nylon6 ZrO₂Ag in configurazione random .

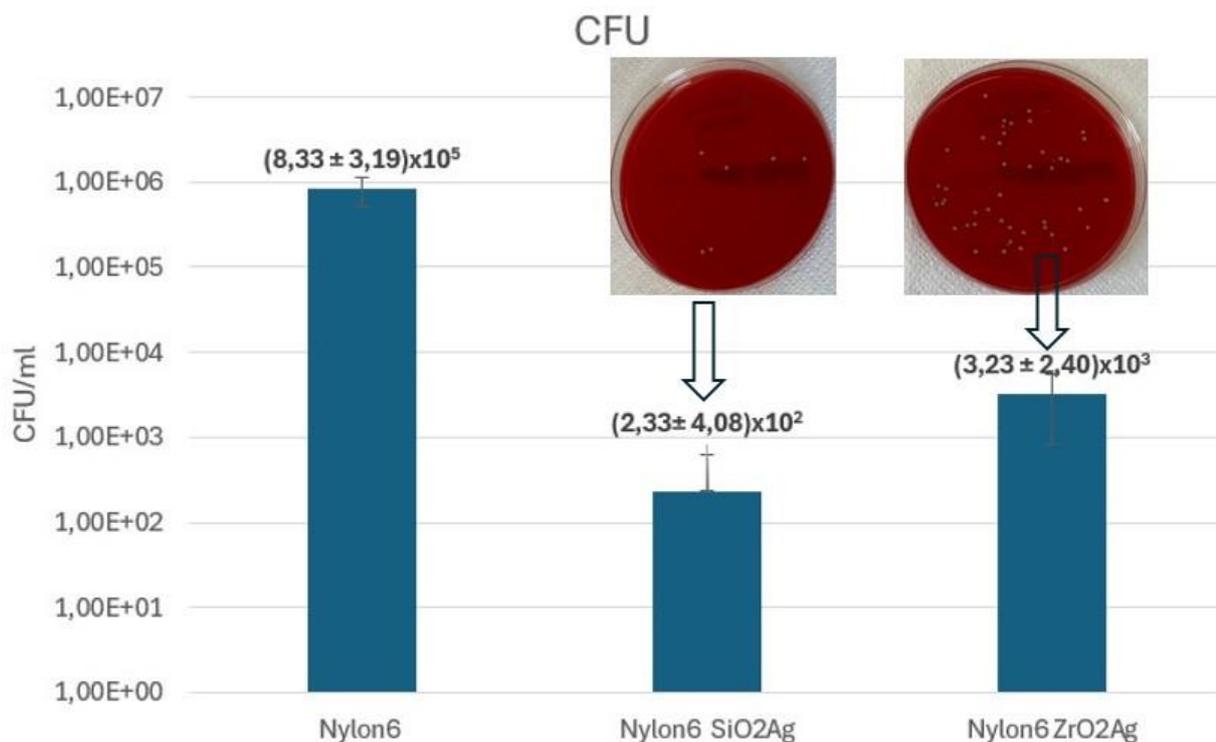


Figura 28 Test Unità formanti colonie con ceppo batterico *S. epidermidis*

Come evidenziato in *figura 20*, le membrane in Nylon 6 su cui è stato depositato tramite co-sputtering il rivestimento in SiO₂Ag e ZrO₂Ag mostrano un'azione antibatterica nei confronti



**Politecnico
di Torino**

della specie *S.epidermidis*, testimoniata da un numero di unità formanti colonie di qualche ordine di grandezza inferiore rispetto al Nylon 6 tal quale; in particolare, si riscontra come il rivestimento in SiO_2Ag evidenzi un carattere antibatterico migliore rispetto al rivestimento in ZrO_2Ag , consentendo una minore adesione batterica in condizione di contaminazione tramite bioaerosol. Un possibile approccio futuro potrebbe essere quello di ripetere il test anche sulle membrane in Nylon6 realizzate tramite co-sputtering in configurazione allineata.



5.3 Test di rilascio ionico in acqua

È stato effettuato il test di rilascio ionico in acqua per indagare le cinetiche di rilascio di ioni argento Ag^+ del PVA crosslinked. Le tipologie analizzate sono PVA AgNPs e PVA rivestito tramite co-sputtering dal coating Zirconia/Argento (ZrO_2Ag) e Silice/Argento (SiO_2Ag). Il test di rilascio ionico in acqua è stato realizzato su un periodo di tempo di 14 giorni, prelevando e analizzando la soluzione con i seguenti time step: 1 ora, 3 ore, 1 giorno, 3 giorni 7 giorni e 14 giorni.

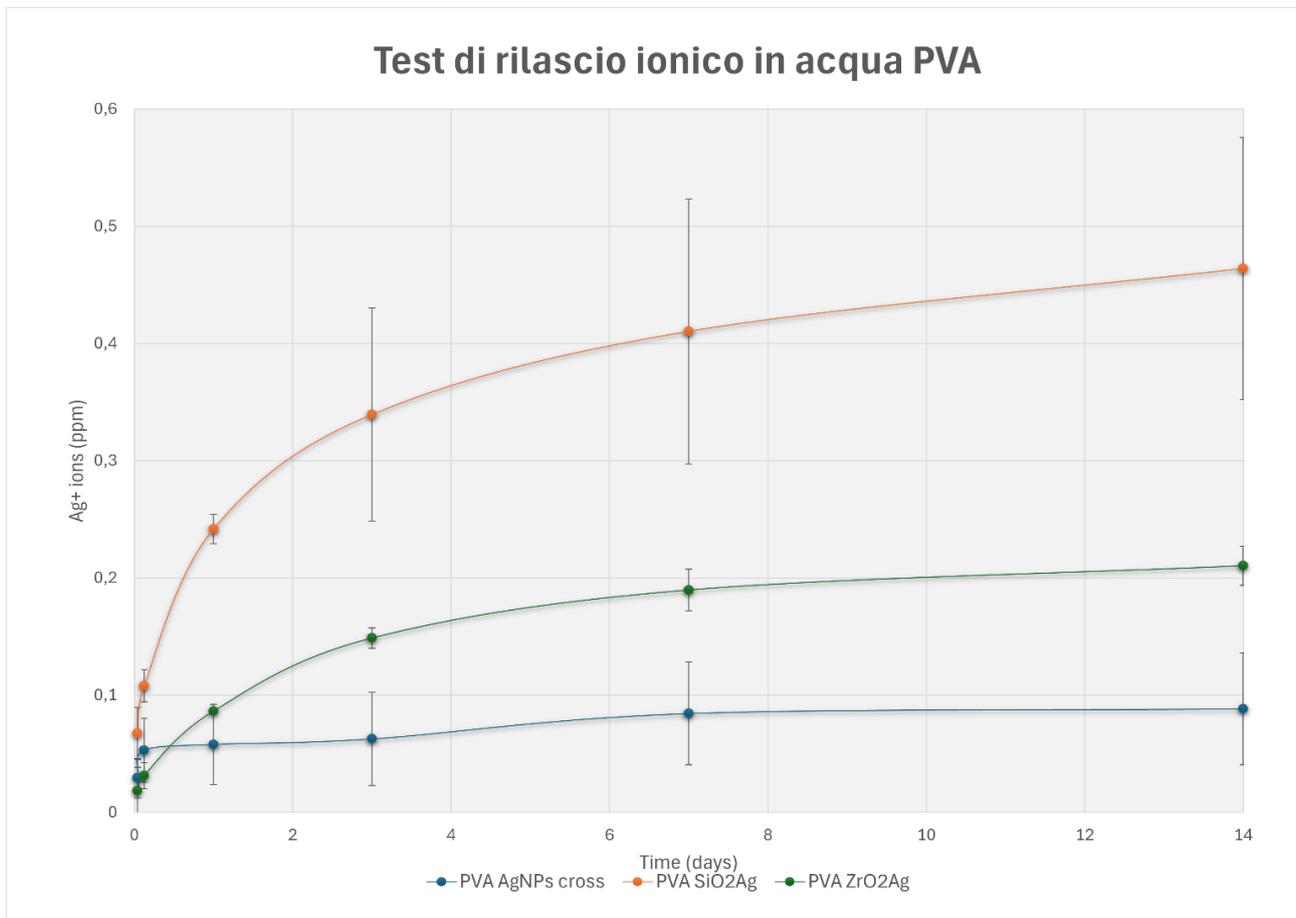


Figura 29 Curva di rilascio di ioni d'argento in acqua per il PVA AgNPs crosslinked, PVA SiO_2Ag , PVA ZrO_2Ag



**Politecnico
di Torino**

La *figura 29* mostra la curva di rilascio di ioni di argento per le tre tipologie di campioni. Si nota come in tutti e tre i casi vi sia un rilascio di ioni responsabili dell'azione antibatterica. Inoltre, si evince chiaramente come l'utilizzo della tecnica di co-sputtering per la realizzazione dei rivestimenti compositi (Zirconia/Argento e Silice/argento) permetta di ottenere un rilascio di ioni d'argento nel tempo superiore alla sola presenza di AgNPs nella membrana elettrospinnata di PVA. In ultimo, si riscontra come, tra i due rivestimenti ottenuti tramite co-sputtering, quello che consente di ottenere un rilascio di ioni maggiore è quello costituito da Silice/Argento. Ciò è coerente con quanto ci si aspettava, essendovi all'interno un maggior quantitativo di argento rispetto al caso del rivestimento Zirconia/Argento.

Il test di rilascio ionico in acqua per indagare le cinetiche di rilascio di ioni argento Ag^+ è stato effettuato anche per le membrane in PAN. Le tipologie analizzate sono PAN PVP-AgNPs 0,1mM, PAN PVP-AgNPs 1mM e PAN PVP-AgNPs 2mM nella versione rinsed e not rinsed. Il test è stato realizzato prelevando e analizzando la soluzione con i seguenti time step: 1 ora, 3 ore, 6 ore, 8 ore, 16 ore, 24 ore. Verranno illustrati i risultati ottenuti considerando l'analisi condotta alle 16 ore e nel caso in cui non venga considerata.



Test di rilascio ionico in acqua PAN 0.1 mM

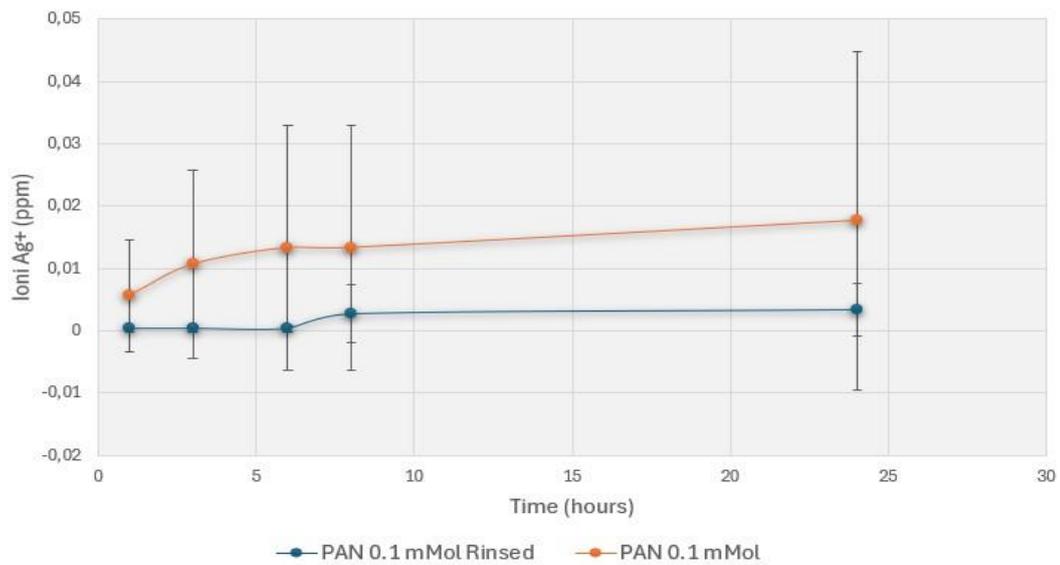


Figura 30 Curva di rilascio di ioni d'argento in acqua per il PAN 0,1 mM

Test di rilascio ionico in acqua PAN 0.1 mM con 16 ore

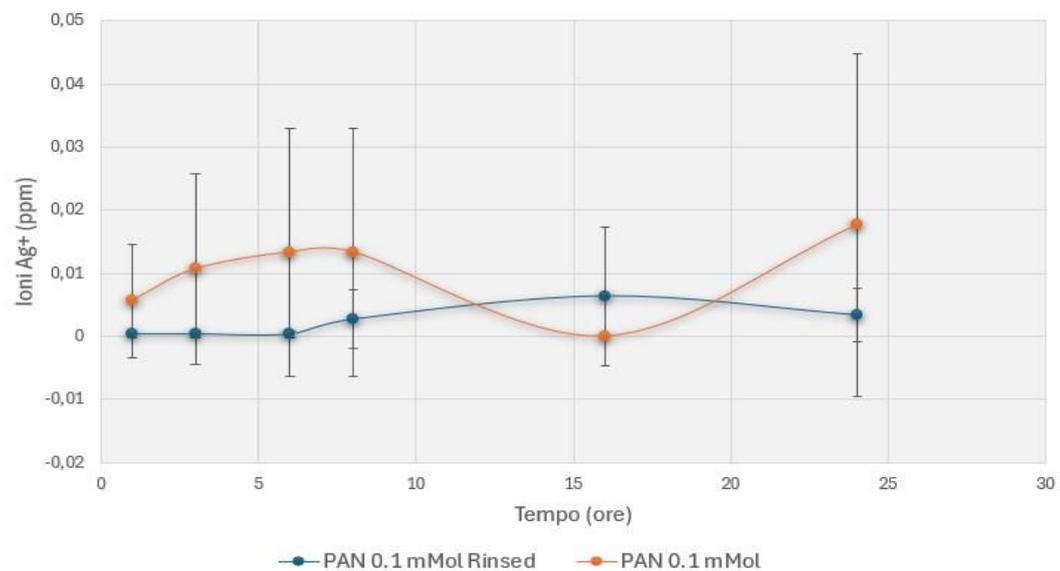


Figura 31 Curva di rilascio di ioni d'argento in acqua per il PAN 0,1 mM



Test di rilascio ionico in acqua PAN 1mM

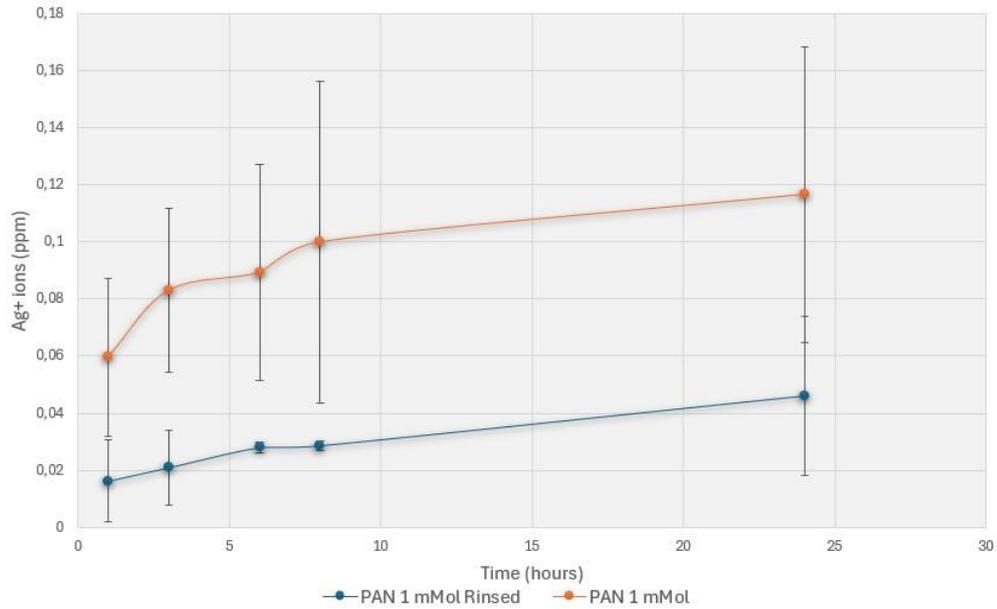


Figura 32 Curva di rilascio di ioni d'argento in acqua per il PAN 1 mM

Test di rilascio ionico in acqua PAN 1mM con 16 ore

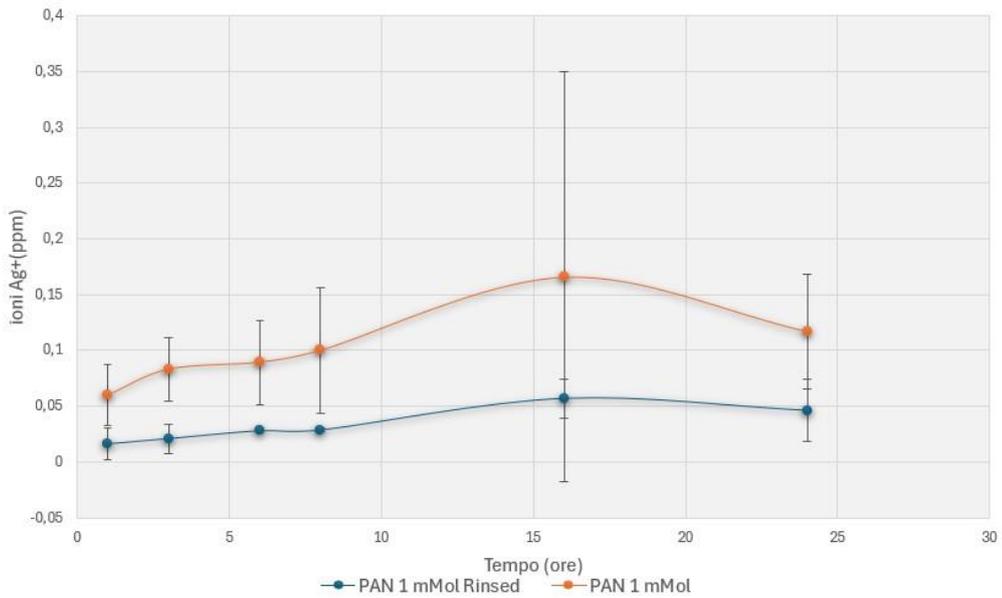


Figura 33 Curva di rilascio di ioni d'argento in acqua per il PAN 1 mM



Test di rilascio ionico in acqua PAN 2mM

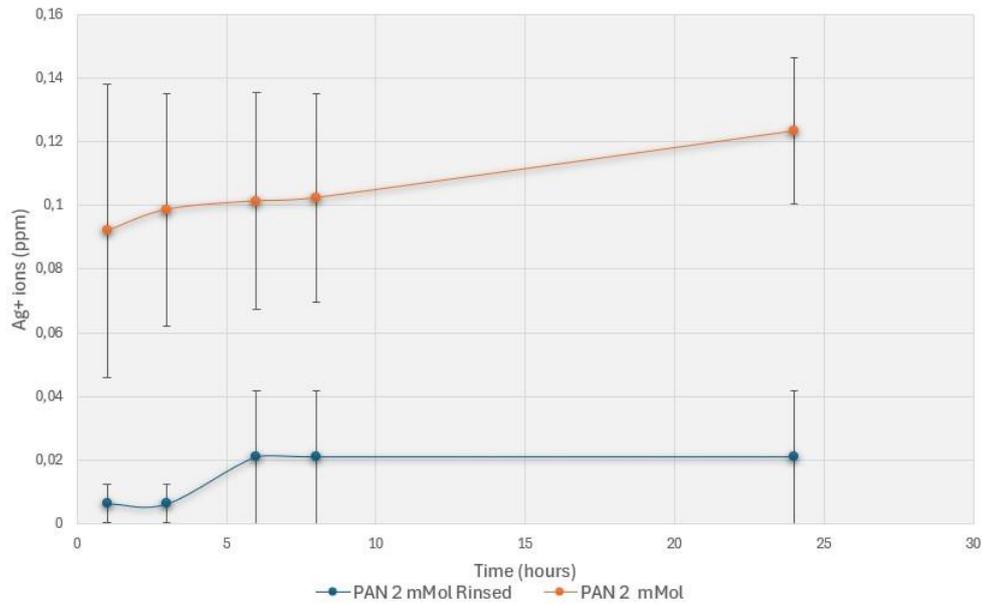


Figura 34 Curva di rilascio di ioni d'argento in acqua per il PAN 2 mM

Test di rilascio ionico in acqua PAN 2mM con 16 ore

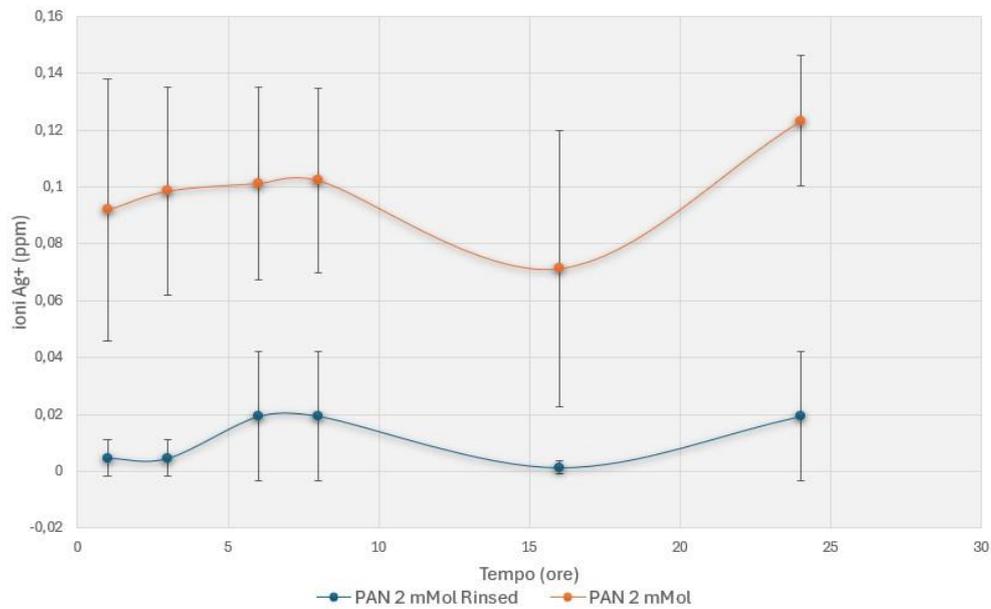


Figura 35 Curva di rilascio di ioni d'argento in acqua per il PAN 2 mM



**Politecnico
di Torino**

Le *figure 30-35* mostrano le curve di rilascio di ioni argento Ag^+ in soluzione per le membrane PAN rinsed e not rinsed. Per tutte le membrane analizzate il rilascio di ioni argento, la cui azione antibatterica è ampiamente riconosciuta, è confermato. In dettaglio, si riscontra come gli ioni Ag^+ rilasciati aumentino all'aumentare della concentrazione di PVP-AgNPs da (0,1mM a 2 Mm) coerentemente con quanto ci si aspettava. Si nota come, per entrambe le tipologie in tutte le concentrazioni, la dinamica di rilascio di ioni argento Ag^+ non cambia; quello che cambia è la quantità di ioni Ag^+ rilasciati, che risulta maggiore nel caso not rinsed. Ciò probabilmente è dovuto al fatto che, essendovi stato uno step precedente di risciacquo in acqua Milli-Q per 30 minuti, al quale sono stati sottoposti solo i campioni rinsed, in questo intervallo di tempo sia già avvenuto un rilascio di ioni Ag^+ , dovuto soprattutto alle AgNPs superficiali presenti sulle nanofibre.

Le precedenti considerazioni sono relative alle curve che non riportano l'analisi dei campioni alle 16 ore. Nelle curve in cui questa analisi viene invece considerata, si osserva un andamento della curva in questo time step molto variabile per tutte le concentrazioni e tipologie di campioni testati. Ciò è dovuto al fatto che per l'analisi delle 16 ore sono stati impiegati campioni differenti rispetto a quelli utilizzati per le 1 ora, 3 ore, 6 ore, 8 ore, 24 ore e, come osservato nel sottocapitolo relativo alla "caratterizzazione morfologica e composizionale", la distribuzione delle AgNPs in queste tipologie di membrane non è uniforme, ma vi sono zone a maggiore concentrazione e zone a concentrazione minore; questo spiega la variabilità dei risultati osservati alle 16 ore.



**Politecnico
di Torino**



**Politecnico
di Torino**

6. Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è la caratterizzazione di membrane polimeriche realizzate tramite elettrospinning (PAN, PVA, Nylon) con proprietà antibatteriche per applicazioni nel campo della filtrazione d'aria. Le membrane sono state funzionalizzate con AgNPs incorporate nella soluzione da elettrospinnare, come nel caso del PAN-PVP-AgNPs realizzato a diverse concentrazioni di PVP-AgNPs: 0,1 mM, 1 mM, 2mM e del PVA-AgNPs reticolato, o rivestite con un rivestimento composito (matrice di silice o zirconia) contenente nanoclusters di Ag depositato attraverso la tecnica del co-sputtering, nel caso delle membrane in Nylon 6 SiO₂Ag e Nylon 6 in configurazione random e allineata e del PVA SiO₂Ag e PVA ZrO₂Ag reticolato. I risultati raccolti hanno permesso di effettuare un confronto tra le due tecniche (funzionalizzazione con AgNPs e rivestimento via co-sputtering).

In generale, le analisi condotte a livello morfologico (FESEM), composizionale (EDS), i test di antibattericità (alone di inibizione, contaminazione bioaerosol e test di conta delle unità formanti colonie (CFU)) e i test di rilascio ionico in acqua hanno prodotto risultati che evidenziano un possibile utilizzo di queste membrane nel campo della filtrazione d'aria. In particolare, in tutti i campioni analizzati tramite caratterizzazione morfologica e composizionale, è stata riscontrata la presenza di argento; tuttavia, in quelli realizzati tramite co-sputtering si nota come le nanofibre siano ben ricoperte e la distribuzione di nanoclusters di Ag sia uniforme, a differenza delle membrane funzionalizzate con AgNPs, dove le nanoparticelle non sono distribuite in maniera uniforme ma localizzate in alcune aree.

I test antibatterici hanno confermato il carattere antibatterico delle membrane. In particolare, il test dell'alone, condotto su tutte le tipologie di campioni contro il ceppo batterico *S.epidermidis*, ha dato risultati positivi e il test delle unità formanti colonie (CFU), condotto sempre contro il ceppo batterico *S.epidermidis* sulle membrane in Nylon 6 SiO₂Ag e Nylon 6 ZrO₂Ag, in



**Politecnico
di Torino**

configurazione random, ha evidenziato la capacità di entrambi i rivestimenti di ridurre l'adesione batterica in condizioni di contaminazione tramite bioaerosol.

In ultimo, la prova di rilascio ionico in acqua ha testimoniato l'effettivo rilascio di ioni Ag^+ in soluzione da parte delle membrane sottoposte ad analisi. Anche in questo caso è interessante notare come risultati migliori siano stati ottenuti per i campioni rivestiti tramite co-sputtering rispetto a quelli funzionalizzati con AgNPs.

In conclusione, l'impiego di membrane polimeriche contenenti argento in dimensioni dell'ordine della nanoscala, specialmente nel caso di rivestimenti realizzati tramite co-sputtering, si è rivelato promettente nel campo della filtrazione d'aria, grazie alle caratteristiche antibatteriche delle membrane. Sono comunque necessarie ulteriori indagini: possibili estensioni potrebbero coinvolgere la realizzazione di nuovi test con differenti ceppi batterici e l'ampliamento delle caratterizzazioni effettuate a tutte le tipologie di campioni.



**Politecnico
di Torino**

Bibliografia

- [1] Ahmed, Sirwan and Hussein, Safin and Qurbani, Karzan and Ibrahim, Radhwan and Saber, Abdulmalik and Mahmood, Kochr and Mohamed, Mona, Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects, {2024-03},pagg 100081,volume 2, Journal of Medicine Surgery and Public Health, doi: 10.1016/j.glmedi.2024.100081
- [2] World Health Organization *WHO global strategy for the containment of antimicrobial resistance*, 2001
- [3] Acar J, Röstel B., Antimicrobial resistance: an overview. Rev Sci Tech. 2001 Dec;20, pagg:797-810. doi: 10.20506/rst.20.3.1309.
- [4] Arıkan I, Genç Ö, Uyar C, Tokur ME, Balcı C, Perçin Renders D. Effectiveness of air purifiers in intensive care units: an intervention study. J Hosp Infect. 2022 Feb;120:14-22. doi: 10.1016/j.jhin.2021.10.011. Epub 2021 Oct 22
- [5] Bonetta S, Bonetta S, Mosso S, Sampò S, Carraro E. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. Environ Monit Assess. 2010 Feb;161(1-4):473-83. doi: 10.1007/s10661-009-0761-8. Epub 2009 Feb 18
- [6] Brdová D, Ruml T, Viktorová J. Mechanism of staphylococcal resistance to clinically relevant antibiotics. Drug Resist Updat. 2024 Nov;77:101147. doi: 10.1016/j.drup.2024.101147. Epub 2024 Aug 31
- [7] Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol. 2018 Jun 26;4(3):482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229;
- [8] Chancey ST, Zähler D, Stephens DS. Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. Future Microbiol. 2012 Aug;7(8):959-78. doi: 10.2217/fmb.12.63.
- [9] Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. St. Louis: Saunders; 2014. Mechanisms of action and resistance of antimicrobial agents; pp. 254–273.
- [10] Li W, Liu C, Ho HC, Shi L, Zeng Y, Yang X, Huang Q, Pei Y, Huang C, Yang L. Association between antibiotic resistance and increasing ambient temperature in China: An ecological study with



**Politecnico
di Torino**

nationwide panel data. *Lancet Reg Health West Pac.* 2022 Nov 14;30:100628. doi: 10.1016/j.lanwpc.2022.100628.

[11] MacFadden DR, McGough SF, Fisman D, Santillana M, Brownstein JS. Antibiotic Resistance Increases with Local Temperature. *Nat Clim Chang.* 2018 Jun;8(6):510-514. doi: 10.1038/s41558-018-0161-6. Epub 2018 May 21.

[12] McGough SF, MacFadden DR, Hattab MW, Mølbak K, Santillana M. Rates of increase of antibiotic resistance and ambient temperature in Europe: a cross-national analysis of 28 countries between 2000 and 2016. *Euro Surveill.* 2020 Nov;25:1900414. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.45.1900414

[13] Bonilla-Gameros L, Chevallier P, Sarkissian A, Mantovani D. Silver-based antibacterial strategies for healthcare-associated infections: Processes, challenges, and regulations. An integrated review. *Nanomedicine.* 2020 Feb;24:102142. doi: 10.1016/j.nano.2019.102142. Epub 2019 Dec 14

[14] Release Strategies of Silver Ions from Materials for Bacterial Killing, Xu, Zhiwen- Zhang, Cai - Wang, Xiang-Liu, Dingbin, ACS Applied Bio Materials, PB - American Chemical Society doi: 10.1021/acsabm.0c01485

[15] Benjamin Le Ouay, Francesco Stellacci, Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight, *Nano Today*, Volume 10, Issue 3, 2015, Pages 339-354, ISSN 1748-0132,

[16] Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine.* 2012 Jan;8(1):37-45. doi: 10.1016/j.nano.2011.05.007. Epub 2011 Jun 2.

[17] Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res.* 2006 Apr;5(4):916-24. doi: 10.1021/pr0504079.

[18] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005 Oct;16(10):2346-53. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059. Epub 2005 Aug 26.



- [19] Paredes D, Ortiz C, Torres R. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against Escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Int J Nanomedicine*. 2014 Apr 3;9:1717-29. doi: 10.2147/IJN.S57156.
- [20] Debasish Kar, Samiran Bandyopadhyay, Umesh Dimri, Deba Brata Mondal, Pramod Kumar Nanda, Arun Kumar Das, Subhasish Batabyal, Premanshu Dandapat, Subhasish Bandyopadhyay, Antibacterial effect of silver nanoparticles and capsaicin against MDR-ESBL producing Escherichia coli: An in vitro study, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, Volume 6, Issue 10, 2016, Pages 807-810, [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61135-0](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61135-0)
- [21] Journal Article, Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles on Multi Drug Resistant Pseudomonas Aeruginosa, Amirulhusni, Athirah Nur, Palanisamy, Navindra Kumari, Mohd-Zain, Zaini, A Ping, Liew Jian, A Durairaj, Rajkumar, *International Journal of Medical and Health Sciences*, V 6, P 291-294, D 2012
- [22] Yuan YG, Peng QL, Gurunathan S. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 6;18(3):569. doi: 10.3390/ijms18030569
- [23] Doudi M, Naghsh N, Setorki M. Comparison of the effects of silver nanoparticles on pathogenic bacteria resistant to beta-lactam antibiotics (ESBLs) as a prokaryote model and Wistar rats as a eukaryote model. *Med Sci Monit Basic Res*. 2013 Mar 18;19:103-10. doi: 10.12659/MSMBR.883835.
- [24] Subashini J, Khanna VG, Kannabiran K. Anti-ESBL activity of silver nanoparticles biosynthesized using soil Streptomyces species. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014 Jun;37(6):999-1006. doi: 10.1007/s00449-013-1070-8.
- [25] Loo YY, Rukayadi Y, Nor-Khaizura MA, Kuan CH, Chieng BW, Nishibuchi M, Radu S. *In Vitro* Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. *Front Microbiol*. 2018 Jul 16;9:1555. doi: 10.3389/fmicb.2018.01555.
- [26] More PR, Pandit S, Filippis A, Franci G, Mijakovic I, Galdiero M. Silver Nanoparticles: Bactericidal and Mechanistic Approach against Drug Resistant Pathogens. *Microorganisms*. 2023 Feb 1;11(2):369. doi: 10.3390/microorganisms11020369.



**Politecnico
di Torino**

[27] Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front Microbiol.* 2016 Nov 16;7:1831. doi: 10.3389/fmicb.2016.01831.

[28] Galdiero S, Falanga A, Vitiello M, Cantisani M, Marra V, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules.* 2011 Oct 24;16(10):8894-918. doi: 10.3390/molecules16108894.

[29] Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Rev.* 2005 Apr;105(4):1025-102. doi: 10.1021/cr030063a.

[30] Cheon JY, Kim SJ, Rhee YH, Kwon OH, Park WH. Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2019 Apr 23;14:2773-2780. doi: 10.2147/IJN.S196472.

[31] Meikle TG, Dyett BP, Strachan JB, White J, Drummond CJ, Conn CE. Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity of Cubosome Encapsulated Metal Nanocrystals. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020 Feb 12;12(6):6944-6954. doi: 10.1021/acsmi.9b21783.

[32] Noronha VT, Paula AJ, Durán G, Galembeck A, Cogo-Müller K, Franz-Montan M, Durán N. Silver nanoparticles in dentistry. *Dent Mater.* 2017 Oct;33(10):1110-1126. doi: 10.1016/j.dental.2017.07.002

[33] Jadhav PA, Gadgil SA. The Efficacy of Silver Nanoparticles in Combating Biofilm Formation by Uropathogenic *Escherichia coli*. *J Pure Appl Microbiol.* 2023;17(4):2424-2430. doi: 10.22207/JPAM.17.4.37

[34] Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* 2018 Jan 1;9(1):522-554. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.

[35] Preda VG, Săndulescu O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries (Craiova).* 2019 Sep 30;7(3):e100. doi: 10.15190/d.2019.13.

[36] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:165-99. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.

[37] Barabadi, Hamed & Hosseini, Omid & Jounaki, Kamyar & Sadeghian-Abadi, Salar & Ashouri, Fatemeh & Alrikabi, Ayat & Vahidi, Hossein & Amidi, Salimeh & Mojab, Faraz & Mohammadi, Neda & Mostafavi, Ebrahim. (2023). Bioinspired green-synthesized silver nanoparticles: In vitro



**Politecnico
di Torino**

physicochemical, antibacterial, biofilm inhibitory, genotoxicity, antidiabetic, antioxidant, and anticoagulant performance. *Materials Advances*. 10.1039/D3MA00089C

[38] Sheikh, Shaheen & Tale, Vidya. (2017). EFFECT OF GREEN SYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES ON QUORUM SENSING INHIBITION OF UTI PATHOGENS. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10. 302. 10.22159/ajpcr.2017.v10i5.16949

[39] Vigneswari S, Amelia TSM, Hazwan MH, Mouriya GK, Bhubalan K, Amirul AA, Ramakrishna S. Transformation of Biowaste for Medical Applications: Incorporation of Biologically Derived Silver Nanoparticles as Antimicrobial Coating. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Feb 24;10(3):229. doi: 10.3390/antibiotics10030229

[40] Nguyen, Ngoc & Dang, Ngoc & Doan, Linh & Nguyen, Hoai. (2023). Synthesis of Silver Nanoparticles: From Conventional to 'Modern' Methods—A Review. *Processes*. 11. 2617. 10.3390/pr11092617.

[41] Ferraris, Monica & Balagna, Cristina & Perero, Sergio & Miola, Marta & Ferraris, Sara & Baino, Francesco & Battiato, Alfio & Manfredotti, C. & Vittone, Ettore & Vernè, Enrica. (2012). Silver nanocluster/silica composite coatings obtained by sputtering for antibacterial applications. *Materials Science and Engineering Conference Series*. 40. 2037-. 10.1088/1757-899X/40/1/012037.

[42] Antibacterial and Antiviral Activities of Silver Nanocluster/Silica Composite Coatings Deposited onto Air Filters AU - Luceri, Angelica AU - Francese, Rachele AU - Perero, Sergio AU - Lembo, David AU - Ferraris, Monica AU - Balagna, Cristina Y1 - 2024/01/24 PY - 2024 DA - 2024/01/24 N1 - doi: 10.1021/acsami.3c13843 DO - 10.1021/acsami.3c13843 T2 - ACS Applied Materials & Interfaces JF - ACS Applied Materials & Interfaces JO - ACS Appl. Mater. Interfaces SP - 3955 EP - 3965 VL - 16 IS - 3 PB - American Chemical Society SN - 1944-8244 M3 - doi: 10.1021/acsami.3c13843 UR - <https://doi.org/10.1021/acsami.3c13843>

[43] National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Patent Summary for EP-3701062-A1, Method for the application of an antiviral coating to a substrate and relative coating. Retrieved October 16, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/EP-3701062-A1>.

[44] S. Ferraris, S. Perero, M. Miola, E. Vernè, A. Rosiello, V. Ferrazzo, G. Valletta, J. Sanchez, M. Ohrlander, S. Tjörnhammar, M. Fokine, F. Laurell, E. Blomberg, S. Skoglund, I. Odnevall Wallinder, M. Ferraris, Chemical, mechanical and antibacterial properties of silver nanocluster/silica composite coated textiles for safety systems and aerospace applications, *Applied Surface Science*,



**Politecnico
di Torino**

Volume 317,2014, Pages 131-139,ISSN 0169-4332, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.07.196>.

[45] Monica Ferraris, Sergio Perero, Marta Miola, Sara Ferraris, Enrica Verné, Jerzy Morgiel, Silver nanocluster–silica composite coatings with antibacterial properties, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 120, Issue 1, 2010, Pages 123-126, ISSN 0254-0584, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2009.10.034>.

[46] Meshari Aljohani, Jafar Alkabli, Matokah M. Abualnaja, Abdulmajeed F. Alrefaei, Samah J. Almehmadi, Mohamed H.H. Mahmoud, Nashwa M. El-Metwaly,Electrospun AgNPs-poly lactate nanofibers and their antimicrobial applications,*Reactive and Functional Polymers*,Volume 167,2021,104999,ISSN 1381-5148, <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104999>.

[47] Maliszewska I, Czapka T. Electrospun Polymer Nanofibers with Antimicrobial Activity. *Polymers (Basel)*. 2022 Apr 20;14(9):1661. doi: 10.3390/polym14091661.

[48] Zhang Z, Wu Y, Wang Z, Zou X, Zhao Y, Sun L. Fabrication of silver nanoparticles embedded into polyvinyl alcohol (Ag/PVA) composite nanofibrous films through electrospinning for antibacterial and surface-enhanced Raman scattering (SERS) activities. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Dec 1;69:462-9. doi: 10.1016/j.msec.2016.07.015. Epub 2016 Jul 7.

[48] Minghuan Liu, Xiao-Peng Duan, Ye-Ming Li, Da-Peng Yang, Yun-Ze Long, Electrospun nanofibers for wound healing, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 76, 2017, Pages 1413-1423, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.034>.

[49] Wenxiu Yang; Lin Li; Shuo Wang; Jinshu Liu. Preparation of multifunctional AgNPs/PAN nanofiber membrane for air filtration by one-step process. *Pigment & Resin Technology* **2020**, *49*, 355 -361.

[50] Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 4;22(13):7202. doi: 10.3390/ijms22137202.

[51] Granja Alvear A, Pineda-Aguilar N, Lozano P, Lárez-Velázquez C, Suppan G, Galeas S, Debut A, Vizuete K, De Lima L, Saucedo-Vázquez JP, Alexis F, López F. Synergistic Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles and Its Reducing Agent from Cinnamon Bark Extract. *Bioengineering (Basel)*. 2024 May 20;11(5):517. doi: 10.3390/bioengineering11050517.

[52] Chen Chen, Wenping Li, Xiaohui Liu, Junjie Yu, Shijun Xing, Jiazhi Yang, Qiaofeng Han,



**Politecnico
di Torino**

Silver nanoparticles/graphene oxide arranged on polytetrafluoroethylene substrate hydrophilic modified with TiO₂ to construct efficient air purification material, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 11, Issue 6, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110848>.

[53] Almatroudi A. Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sci.* 2020 Nov 19;15(1):819-839. doi: 10.1515/biol-2020-0094.

[54] L'impatto dell'antibiotico-resistenza in Europa e nel mondo. ISS.

<https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/impatto-europa-mondo#writers>

[55] "NCCLS M2-A9. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 9th Edn, NCCLS, Villanova, PA, USA 2003."

[56] Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 4;

[57] Minghuan Liu, Xiao-Peng Duan, Ye-Ming Li, Da-Peng Yang, Yun-Ze Long, Electrospun nanofibers for wound healing, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 76, 2017, Pages 1413-1423, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.034>.