



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA INDUSTRIALE

“Preparazione, caratterizzazione e sperimentazione di resine epossidiche con proprietà antimicrobiche”

Relatore: Prof.ssa Roberta Bertani

Laureando: Andrea Sassi

Correlatore: Dott. Mario Rigo

ANNO ACCADEMICO 2023 - 2024

Data di laurea 16/04/2024

SOMMARIO

ABSTRACT	5
CAP. 1 - INTRODUZIONE	6
1.1 I nanocompositi	6
1.2 I nanocompositi a base polimerica (PMNC)	8
1.2.1 Caratterizzazione dei PMNC	9
1.3 I minerali argillosi	10
1.3.1 Struttura delle argille	11
1.3.2 Proprietà dei minerali argillosi	15
1.3.3 Tecniche di caratterizzazione delle argille	16
1.4 Le resine epossidiche	20
1.4.1 Resine epossidiche funzionalizzate con minerali argillosi	24
1.4.2 Tecniche di produzione dei nanocompositi a base polimerica (PMNC) caricati con argille	25
1.5 Proprietà antimicrobiche delle argille	29
1.5.1 Processo biologico antibatterico	32
1.5.2 Processo biologico antifungino	36
1.5.3 Processo biologico antivirale	38
CAP. 2 - SCOPO DELLA TESI	41
CAP. 3 - PARTE SPERIMENTALE	42
3.1 Preparazione resine epossidiche	42
3.1.1 Preparazione resina EC157	42
3.1.2 Preparazione resina Epikote™ MGS	43
3.1.3 Preparazione nanocomposito EC157/Cloisite 15A	43
3.2 Tecniche di caratterizzazione	45
3.2.1 Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR)	45
3.2.2 Diffrazione a raggi-X (XRD)	49
3.2.3 Microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM ed XRF)	52
3.2.4 Risonanza Magnetica Nucleare (FT-NMR)	56
3.3 Strumentazione per le prove meccaniche	59
3.3.1 Prove di trazione monoassiale	59
3.3.2 Prova di propagazione della cricca (CT)	60

3.4 Prove antimicrobiche	61
3.4.1 Saggio sulle proprietà antibatteriche	61
3.4.2 Saggio sull'attività antivirale	64
4.1 Caratterizzazione componenti EC157 e Indurente	66
4.1.1 Caratterizzazione FTIR prepolimero	66
4.1.2 Caratterizzazione ¹ H NMR prepolimero	67
4.1.3 Caratterizzazione FTIR Indurente	67
4.1.4 Caratterizzazione ¹ H NMR Indurente	68
4.2 Caratterizzazione dei componenti EPIKOTE MGS e Indurente	69
4.2.1 Caratterizzazione FTIR prepolimero	69
4.2.2 Caratterizzazione ¹ H NMR prepolimero	69
4.2.3 Caratterizzazione FTIR indurente	70
4.2.4 Caratterizzazione ¹ H NMR indurente	71
4.3 Caratterizzazione della Cloisite 15A	71
4.3.1 Analisi FTIR	72
4.3.2 Analisi ESEM e XRF	72
4.4 Caratterizzazione delle resine epossidiche	73
4.4.1 Caratterizzazione FTIR resina EC157	73
4.4.2 Caratterizzazione ESEM resina EC157	73
4.4.3 Caratterizzazione FTIR resina EPIKOTE MGS	74
4.4.4 Caratterizzazione ESEM della resina EPIKOTE MGS	75
4.4.5 Studio delle proprietà meccaniche delle resine epossidiche	76
4.5 Caratterizzazione dei nanocompositi	78
4.5.1 Spettroscopia FTIR	78
4.5.2 Proprietà meccaniche dei nanocompositi con Cloisite15A	78
4.6 Proprietà antimicrobiche dei materiali preparati	81
4.6.1 Proprietà antibatteriche delle resine epossidiche	81
4.6.2 Proprietà antivirali delle resine epossidiche	84
4.6.3 Proprietà antibatteriche dei nanocompositi	86
4.6.4 Proprietà antivirali dei nanocompositi	90
CAP. 5 - CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	92
BIBLIOGRAFIA	95

ABSTRACT

Obiettivo della tesi è quello di studiare resine epossidiche commerciali e nanocompositi ottenuti da prodotti commerciali per valutarne l'attività antimicrobica. Il progetto di lavoro, che rappresenta la prosecuzione di studi precedenti, si inserisce in un programma di ricerca in collaborazione con INAIL volto a identificare materiali che possano ridurre se non prevenire la diffusione di infezioni in istituti nosocomiali.

Sono state studiate due resine epossidiche commerciali di largo uso, Elan-tech EC157 e Epikote™ MGS, avendo potuto osservare che anch'esse avevano una certa attività antimicrobica. Sono stati preparati vari campioni e sono state determinate le proprietà meccaniche e verificata notevole l'attività antibatterica nei confronti di *E.coli* e *S.Aureus* oltre all'attività virucida, in particolare nei confronti di HSV-1. In generale la resina Epikote™ MGS si è mostrata molto più attiva.

Le prove di attività antimicrobica sono state eseguite dal Laboratorio Rischio Biologico dell'Inail (Roma) mentre i test di attività virucida eseguiti sono stati condotti presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Sezione di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia.

Sono poi stati preparati con la Elan-tech EC157 dei nanocompositi contenenti 1%, 3% e 5% in peso dell'argilla commerciale Cloisite 15A che organo-modificata con ioni ammonio contenenti lunghe catene alifatiche per la compatibilizzazione con una matrice polimerica.

Anche dei nanocompositi sono state testate le proprietà meccaniche, sia con misure di trazione (con provini dog bone) che di propagazione della cricca (con provini CT). Sono state poi studiate le proprietà antibatteriche nei confronti di *E.coli* verificando che il nanocomposito caricato col 5% di argilla porta a completa eliminazione dopo 24 h ed è stata verificata una notevole attività virucida ancora una volta soprattutto nei confronti di HSV-1 da parte del nanocomposito al 5%.

CAP. 1 - INTRODUZIONE

1.1 I nanocompositi

Il termine “nanocomposito”, relativamente nuovo nel panorama letterario, venne introdotto per la prima volta da Roy, Komarneni e altri studiosi all’inizio degli anni ‘80 nel contesto dei processi sol-gel, quando venne riconosciuta la non omogeneità a livello nanometrico di alcuni dei materiali ottenuti sfruttando tale tecnica [1]. Sebbene la sintesi e lo studio di questi materiali eterogenei siano stati sviluppati dall’uomo solamente da pochi anni, sono numerosi gli esempi di nanocompositi in natura, come ossa, denti e conchiglie.

Un nanocomposito è un tipo di materiale solido multifasico, con almeno una fase dotata di una dimensione inferiore a 100 nm. Queste fasi possono essere costituite da mezzi porosi, colloidali, gel, copolimeri o miscele polimeriche. Solitamente ci si riferisce alla combinazione solida di una matrice, che fornisce forma e supporto al materiale, e una o più fasi nanodimensionali, le quali si distinguono per le loro proprietà a causa delle differenze chimiche e strutturali. Le caratteristiche finali del materiale sono strettamente dipendenti dalle proprietà delle fasi costituenti, dalle loro quantità relative, dalla geometria, dalla distribuzione ed orientazione della fase dispersa e dalle proprietà dell’interfaccia che si sviluppano tra di esse. Le proprietà dei nanocompositi, come quelle catalitiche, meccaniche, elettriche, termiche, ottiche ed elettrochimiche, differiscono da quelle dei materiali costituenti presi singolarmente, un fenomeno noto come “effetto nano”. Si possono dunque ottenere materiali con maggiore rigidità, resistenza e stabilità dimensionale, maggiore tenacità e resistenza all’urto, ridotta permeabilità ai gas o a liquidi oppure modifiche delle proprietà termiche ed elettriche, contenendo costi di produzione.

La struttura generale dei nanocompositi consiste, quindi, in una matrice del materiale di base contenente componenti di rinforzo di dimensioni nanometriche, come particelle organiche ed inorganiche, lamelle, fibre, nanotubi di carbonio, ecc (Figura 1). Questi nanorinforzi possono essere raggruppati in tre categorie generali:

- *Nano cariche 3D (particelle isodimensionali) come nanoparticelle o nanosfere (diametro < 2 μm);*
- *Fibre o tubi aventi diametri minori di 100 nm;*
- *Nano cariche a forma di foglietti con spessore nell’ordine di 1 nm.*

Per migliorare le proprietà della matrice, è essenziale garantire un'elevata uniformità nella dispersione delle particelle. Tuttavia, la dispersione dei nanorinforzi all'interno della matrice spesso si presenta come uno dei principali ostacoli nella produzione di questi materiali, a causa della loro tendenza ad agglomerare. L'agglomerazione o l'aggregazione delle particelle aumenta all'aumentare delle concentrazioni e al diminuire delle dimensioni delle particelle, risultando in una minore concentrazione effettiva delle particelle all'interno, e spesso anche in un deterioramento delle proprietà. Altri fattori critici includono la determinazione delle concentrazioni adeguate e delle dimensioni ottimali delle nanoparticelle, poiché vi sono valori ottimali per entrambi i parametri che dipendono sia dal materiale della matrice sia dalla proprietà che si desidera migliorare ("principio della massima nanoeterogeneità") [2].

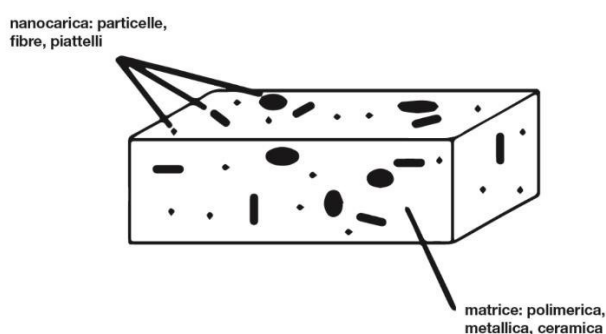


Figura 1: Schematizzazione di un nanocomposito.

A seconda della tipologia di matrice, i materiali nanocompositi possono essere divisi in tre differenti categorie:

- **Ceramic Matrix Nanocomposites (CMNC):** i materiali ceramici possiedono un'eccellente stabilità termica e chimica, nonché buona resistenza all'usura. L'impiego di matrici ceramiche consente di migliorare ulteriormente le proprietà meccaniche, aumentando la tenacità del materiale [3].
- **Metal Matrix Nanocomposites (MMNC):** materiali costituiti da una matrice metallica duttile in cui sono distribuiti rinforzi nanodimensionali; si combinano solitamente caratteristiche metalliche e ceramiche per ottenere duttilità e tenacità, insieme a una elevata resistenza e modulo elastico [4].
- **Polymer Matrix Nanocomposites (PMNC):** i polimeri sono vantaggiosi per la loro facilità di produzione, la bassa densità e la loro natura tipicamente duttile. Tuttavia, presentano un basso modulo elastico e una scarsa resistenza rispetto ai metalli e ai composti ceramici. L'aggiunta di nanofasi ceramiche e metalliche in una matrice polimerica ha un impatto significativo sia nel migliorare che nel promuovere nuove caratteristiche rispetto al solo materiale polimerico.

La matrice svolge diverse funzioni cruciali: innanzitutto, deve garantire coerenza con il rinforzo, poiché è attraverso di essa che lo sforzo viene trasferito al rinforzo stesso. Inoltre, la matrice deve sostenere parte del carico applicato al componente. Un'altra funzione fondamentale è quella di proteggere il rinforzo da danneggiamenti superficiali, come abrasioni meccaniche o reazioni chimiche con l'ambiente esterno, che potrebbero causare difetti superficiali in grado di generare cricche e portare alla rottura del componente anche a bassi carichi. Inoltre, la matrice deve mantenere le fibre o le particelle del rinforzo separate l'una dall'altra per prevenire la propagazione di cricche tra di esse, che potrebbero causare una frattura fragile. In ultima analisi, la *qualità dell'adesione tra matrice e rinforzo* è un fattore chiave nella scelta dei due materiali da accoppiare per creare il composito.

1.2 I nanocompositi a base polimerica (PMNC)

Al fine di comprendere il lavoro di tesi, si ponga l'attenzione sull'ultima classe dei nanocompositi citati, quelli a base polimerica polimerici. Essi condividono la caratteristica di avere una matrice polimerica che può essere termoplastica (materie che possono essere fuse e rimodellate più volte) o termoindurente (grazie alla loro lavorazione per mezzo del calore e della pressione, subiscono delle variazioni che modificano permanentemente la loro natura, dette "resine") e possono essere suddivisi in base alla geometria del rinforzo in tre classi [5].

- La prima classe presenta un rinforzo *con tutte e tre le dimensioni nella scala nanometrica*, come ad esempio silice sferica o particelle metalliche. Queste particelle, chiamate isodimensionali, formano i nanocompositi nanoparticellari.
- La seconda categoria comprende rinforzi nanometrici come whiskers o nanotubi (ad esempio nanotubi di carbonio o whiskers di cellulosa), dove le *dimensioni nanometriche della carica sono due*, presentando così strutture allungate.
- La terza classe presenta cariche con *una sola dimensione nell'intervallo nanometrico*, come ad esempio fogli di grafite, argille o piattelli di silicati (montmorillonite, hectorite, saponite). Questi materiali formano i "nanocompositi stratificati" ottenuti dall'intercalazione delle catene polimeriche nella struttura delle nanoparticelle di rinforzo.

L'introduzione di nanocariche nella matrice polimerica porta a significativi miglioramenti delle proprietà. Questi miglioramenti sono influenzati da vari fattori, come la forma e le dimensioni delle nanostrutture, le modifiche superficiali, il grado di dispersione nella matrice polimerica e la densità di reticolazione del polimero. Anche con bassi livelli di dispersione, si possono ottenere notevoli miglioramenti delle proprietà, mantenendo allo stesso tempo la facilità di

produzione tipica dei polimeri. Nel 1990, i laboratori Toyota in Giappone condussero uno studio sui nanocompositi con matrice in Nylon-6 [6], in cui un contenuto molto basso di nanocarica fu in grado di determinare un notevole miglioramento delle prestazioni termomeccaniche. Le caratteristiche dei nanocompositi dipendono non solo dalle proprietà delle singole fasi (carica e matrice), ma anche dalla loro morfologia e dalle caratteristiche all'interfaccia.

Non è possibile ottenere tutti i vantaggi desiderati in un singolo composito, ma è necessario trovare un giusto equilibrio tra le proprietà che sono di maggior interesse ed eventuali effetti indesiderati, come un comportamento reologico più complesso e una maggiore difficoltà di lavorazione. I nanocompositi, trovando impiego in tantissimi settori (dal packaging a quello biomedico), stanno comunque divenendo i materiali del XXI secolo.

1.2.1 Caratterizzazione dei PMNC

Le tecniche di caratterizzazione dei nanocompositi polimerici sono fondamentali per comprenderne la struttura, le proprietà e le prestazioni di questi materiali avanzati. Alcune delle tecniche più comuni includono:

- Microscopia elettronica a scansione (SEM): la tecnica consente di ottenere immagini ad alta risoluzione della morfologia della superficie del nanocomposito, permettendo di visualizzare la dispersione delle nanoparticelle nella matrice polimerica e valutare la distribuzione dimensionale [7].
- Microscopia a forza atomica (AFM): la tecnica è utilizzata per studiare la morfologia e la topografia delle superfici su scala nanometrica. Questa tecnica è particolarmente utile per analizzare la rugosità superficiale e misurare le dimensioni delle nanoparticelle [8].
- Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR): la tecnica fornisce informazioni sulla composizione chimica e sulla struttura molecolare dei nanocompositi polimerici; viene utilizzata per identificare gruppi funzionali, confermare la presenza di nanoparticelle e monitorare eventuali reazioni chimiche durante la sintesi o il trattamento del materiale [9].
- Analisi termogravimetrica (TGA): la tecnica misura la variazione del peso del campione in funzione della temperatura, consentendo di determinare la stabilità termica, il contenuto di filler e le transizioni di fase nel nanocomposito [10].
- Diffrattometria a raggi X (XRD): la tecnica viene utilizzata per analizzare la struttura cristallina delle nanoparticelle e la loro dispersione nella matrice polimerica; può anche fornire informazioni sulla cristallinità del polimero e sull'orientamento molecolare [11].

- Analisi dinamico-meccanica (DMA): la tecnica valuta le proprietà meccaniche e viscoelastiche dei nanocompositi, inclusa la rigidità, la resilienza e la temperatura di transizione vetrosa [10].

Alcune delle tecniche di caratterizzazione utilizzate per studiare i nanocompositi polimerici verranno riprese in seguito per descrivere la caratterizzazione dei materiali utilizzati in questa tesi. L'uso combinato di più tecniche può fornire una visione completa delle proprietà e del comportamento di questi materiali innovativi.

1.3 I minerali argillosi

I minerali argillosi si formano in seguito alla degradazione delle rocce causata dall'interazione con soluzioni acquose e dalla successiva ricristallizzazione [12]. L'idratazione comporta un aumento del volume e una diminuzione della densità rispetto alle rocce iniziali. I processi di formazione di minerali argillosi sono diversi (Figura 2): tra i principali abbiamo l'erosione chimica, l'alterazione idrotermale (nella quale fluidi caldi, come acque sotterranee, reagiscono con la roccia madre) e la sedimentazione (che comporta la deposizione di particelle, compresi i minerali argillosi, in un corpo idrico). Le argille si trovano nelle croste esposte e nei suoli, nei sedimenti continentali e marini, nei depositi vulcanici, nei campi geotermici, nelle rocce di parete alterate prodotte dall'intrusione di rocce plutoniche e fluidi idrotermali, e nelle rocce metamorfiche di grado molto basso. Le proprietà fisico-chimiche di un minerale formato in un ambiente possono essere considerevolmente diverse da quelle di uno stesso minerale formatosi in un altro ambiente. Le proprietà di argille di origine idrotermale, residuo e sedimentario sono chiaramente diverse, ma i minerali di origine sono simili e hanno di solito proprietà comparabili. Il processo specifico che porta alla formazione dei minerali argillosi dipende dalla roccia madre e dalle condizioni ambientali. Durante il processo di formazione dell'argilla si creano dei vuoti nella sua struttura la cui quantità è legata al rapporto tra acqua e roccia.

Le argille della famiglia delle smectiti, tra cui la montmorillonite (Figura 3), sono le più diffuse, e i silicati a strati sono i materiali più adatti per la progettazione dei nanocompositi, principalmente per due ragioni: innanzitutto, possono essere facilmente modificati chimicamente per renderli compatibili con il polimero e quindi dispersi a livello nanometrico; in secondo luogo, sono ampiamente disponibili in natura e possono essere ottenuti in forma mineralogicamente pura a basso costo [13]. Le smectiti possono anche essere sintetizzate, ma quelle estratte dalla natura e poi purificate hanno solitamente un costo di produzione inferiore rispetto a quelle sintetiche.

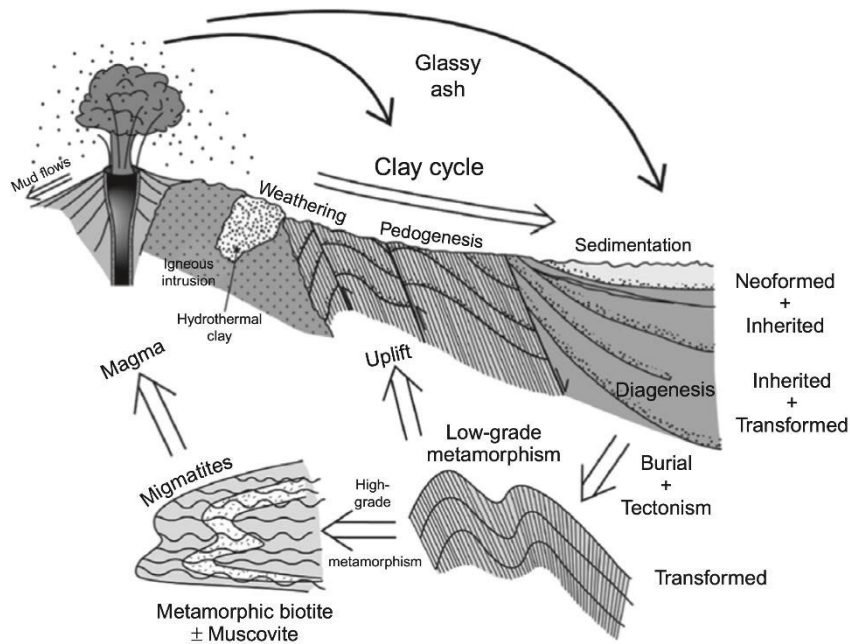


Figura 2: Processi naturali nella formazione dell'argilla.

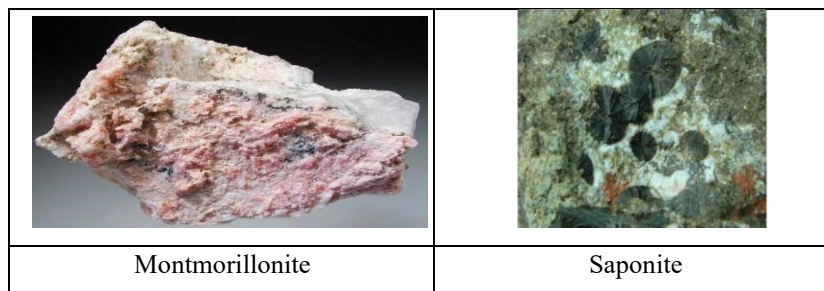


Figura 3: Alcune smectiti.

1.3.1 Struttura delle argille

I minerali argillosi sono costituiti da silicati idrati a struttura lamellare e fanno parte della famiglia dei fillosilicati (silicati caratterizzati da una struttura a strati a simmetria tetraedrica in cui ogni tetraedro tende a legarsi con altri tre tramite ponti a ossigeno). Gli strati lamellari costituenti l'argilla possono essere compattati molto vicini in fogli paralleli, lasciando uno spazio minimo tra i pori. Il numero di strati sovrapposti varia da 1 a 15 a seconda del tipo di minerale argilloso, della densità superficiale di carica, della locazione delle cariche e della natura dei cationi scambiabili [14]. I minerali che compongono l'argilla conferiscono la capacità di assorbire e rilasciare facilmente l'acqua. La superficie dei minerali argillosi attira le molecole d'acqua polari attraverso interazioni che includono legami a ponte idrogeno, attrazione dipolo-dipolo, repulsione tra ligandi e interazioni di van der Waals [15]. Questa nuova unità formata dal legame tra l'argilla e l'acqua cambia le proprietà fisiche e la viscosità

della soluzione acquosa: l'acqua può modificare le dimensioni delle particelle dell'argilla posizionandosi all'interno o all'esterno della sua struttura, formando così l'argilla espansa ("swelling clay"). Le superfici dei materiali argillosi interagiscono con gli ioni presenti in soluzione acquosa. Gli ioni carichi e le specie molecolari disciolte in soluzione vengono attratti dalle superfici cariche dei minerali argillosi e vengono adsorbiti sulla superficie e/o nei siti interni. Gli ioni adsorbiti sono solitamente accompagnati da molecole d'acqua, provocando l'espansione dell'argilla (Figure 4 e 5). L'espansione comporta un aumento della distanza tra gli strati delle particelle dei minerali, dovuto all'assorbimento delle molecole d'acqua nello spazio interstiziale. Questo processo è influenzato dalla carica elettrica degli strati, dal tipo di catione presente tra gli strati e dal tipo di molecole o ioni adsorbiti ("cation exchange capacity", CEC) [16]. L'argilla espansa ha una struttura base a strati lamellari di silicato delle dimensioni di 10 Å. L'acqua introdotta attorno ai cationi idratati forma uno strato di 2,5 Å o un doppio strato con uno spessore di 5,2 Å. Condizioni particolari di umidità o temperatura possono aumentare il numero di strati d'acqua che si formano tra gli strati di silicato.

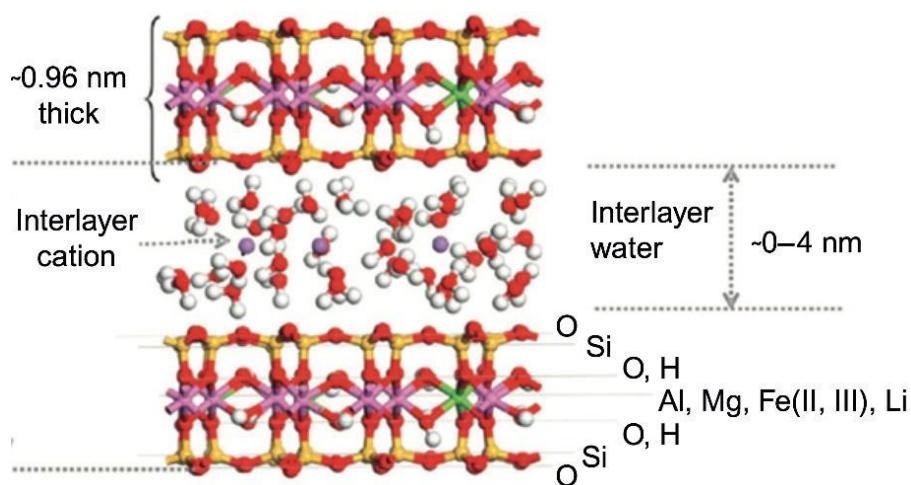


Figura 4: Struttura della montmorillonite del Wyoming espansa con un interstrato d'acqua caricato di ioni positivi.

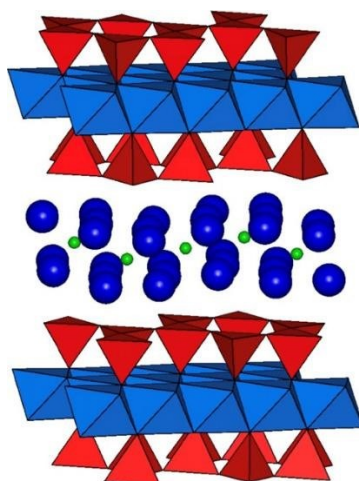


Figura 5: Schema della struttura cristallina di una smectite, i cationi interlamellari (sfere verdi) e le molecole di H_2O (sfere blu) tra gli strati TOT (T = struttura tetraedrica, O = struttura ottaedrica).

La composizione chimica dei minerali argillosi consiste principalmente di silice, allumina e acqua. Questi minerali sono caratterizzati dalla loro struttura laminare, composta da strati di tetraedri di silice e ottaedri di allumina. Ogni tetraedro contiene un catione legato a quattro atomi di ossigeno e si connette ad altri tetraedri condividendo tre angoli, formando un modello a maglie bidimensionale “esagonale” infinito. I cationi tetraedrici comuni sono Si^{4+} , Al^{3+} e Fe^{3+} . Gli ottaedri, invece, sono formati da un catione legato a sei atomi di ossigeno e si collegano agli ottaedri vicini condividendo i bordi [14]. Questi fogli ottaedrici condivisi formano strutture con simmetria esagonale o pseudo-esagonale, con due diverse topologie a seconda della posizione degli $\bullet OH$ ottaedrici: lungo un bordo (orientamento *cis*) e lungo la diagonale (orientamento *trans*). I cationi ottaedrici comuni sono Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} o Fe^{2+} . Gli angoli liberi dei tetraedri puntano nella stessa direzione e collegano i fogli tetraedrici e ottaedrici per formare un piano comune con la posizione anionica ottaedrica. La presenza di cationi scambiabili polarizza gli atomi di ossigeno superficiali, aumentando la loro carica rispetto alla situazione senza cationi scambiabili. In altre parole, i cationi polarizzano gli atomi di ossigeno con cui sono in contatto. Nella superficie del minerale argilloso, gli atomi di ossigeno sono coinvolti in legami Si-O, che conferiscono alla superficie un carattere idrofobico. L'idrofilicità è introdotta dalla presenza dei cationi scambiabili, che sono idrofilici e polarizzano gli atomi di ossigeno superficiali. Il centro di ogni tetraedro è comunemente occupato da uno ione Si^{4+} o può essere sostituito da uno ione Al^{3+} o Fe^{3+} . Il centro dell'ottaedro è occupato dagli ioni Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Li^+ (Figura 6).

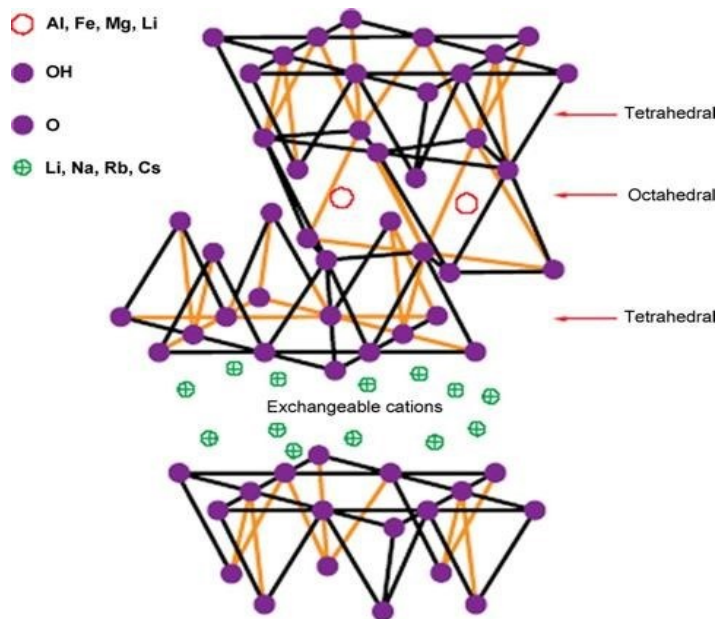


Figura 6: Schema semplificato della struttura di un minerale argilloso.

I minerali argillosi possono essere divisi in tre categorie secondo il numero di fogli tetraedrici e ottaedrici che li compongono (Figura 7), tenuti insieme da deboli forze elettrostatiche, permettendo lo scivolamento dell'uno sull'altro [14]:

- La struttura 1:1 presenta un singolo strato tetraedro appaiato con uno ottaedrico (struttura OT-OT-OT);
- La struttura 2:1 è costituita da uno strato ottaedrico inserito tra due strati tetraedrici. Il primo tipo di strato è formato da tetraedri dello spessore di circa 3 Å e il secondo tipo di strato da ottaedri dallo spessore di circa 4 Å (struttura TOT-TOT-TOT).
- La struttura 2:1:1 è composta dalla somma di due strati tetraedrici e due strati ottaedrici, per uno spessore complessivo di 14 Å (struttura TOT-O-TOT-O-TOT).

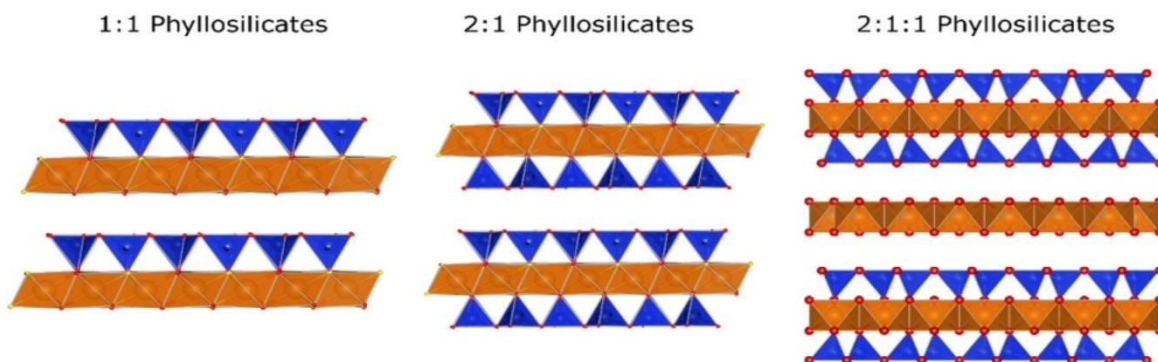


Figura 7: Classificazione della struttura dei fillosilicati secondo il numero di strati tetraedrici e ottaedrici che la compongono.

Esistono diversi tipi di minerali argillosi, tra cui caolinite, smectite, illite, clorite, vermiculite, ecc. Ogni tipo ha una composizione e una struttura chimica diversa, che si traducono in proprietà fisiche e chimiche uniche. Comprendere la composizione chimica e la struttura dei minerali argillosi è importante per prevederne il comportamento e le applicazioni in vari campi.

1.3.2 Proprietà dei minerali argillosi

Una delle proprietà uniche dei minerali argillosi è la loro capacità di adsorbire e scambiare ioni, importante per varie applicazioni industriali e ambientali. Sono ad esempio impiegati come adsorbenti per rimuovere i contaminanti dall'acqua e come catalizzatori nelle reazioni chimiche [17]. Tuttavia, i minerali argillosi possiedono un insieme unico di proprietà fisiche e chimiche che li rendono utili in diverse applicazioni. Alcune delle loro caratteristiche principali includono:

- Piccole dimensioni delle particelle: i minerali argillosi hanno dimensioni delle particelle molto ridotte, di solito inferiori a 2 μm . Questa dimensione consente loro di avere una vasta superficie per unità di peso, rendendoli efficaci nell'adsorbimento e nello scambio di ioni.
- Superficie elevata: i minerali argillosi sono caratterizzati da particelle con forma lamellare, ne consegue un'area superficiale maggiore rispetto ad altri minerali con dimensioni dei grani simili ma che tendono ad avere una forma cubica o sferica: infatti le particelle a forma lamellare hanno una maggiore estensione superficiale a causa della loro struttura piatta e sottile, che consente loro di avere una maggiore interazione con l'ambiente circostante. La loro ampia superficie li rende efficaci nell'adsorbire e nello scambiare ioni, così come nell'adsorbire composti organici.
- Capacità di scambio cationico (CEC): i minerali argillosi hanno un'elevata capacità di scambio cationico, possono assorbire e scambiare ioni carichi positivamente, come calcio, magnesio e potassio. La CEC si misura in milliequivalenti per grammo (meq/g) o più frequentemente su 100 grammi (meq/100g) [16].
- Plasticità: grazie alle loro dimensioni ridotte delle particelle e alla superficie elevata, i minerali argillosi possono essere modellati e plasmati quando miscelati con acqua.
- Coesione: la loro struttura a lamelle permette ai minerali argillosi di legarsi tra loro, creando una massa coesiva che può essere plasmata.
- Capacità di assorbimento e desorbimento: i minerali argillosi possono assorbire e trattenere molecole d'acqua, così come altre molecole come composti organici, metalli pesanti e sostanze inquinanti.

- Capacità di rigonfiarsi: alcuni minerali argillosi possono rigonfiarsi quando idratati. Tale proprietà risulta utile in varie applicazioni come i fanghi di perforazione.
- Reattività chimica: i minerali argillosi possono subire reazioni chimiche con altre sostanze, che possono portare alla formazione di nuovi minerali o all'alterazione di quelli esistenti.

1.3.3 Tecniche di caratterizzazione delle argille

Esistono diverse tecniche analitiche utilizzate per la caratterizzazione dei minerali argillosi, necessarie in quanto le proprietà chimico-fisiche e meccaniche sono intimamente connesse alle caratteristiche morfologiche, composizionali e strutturali. Conoscere queste proprietà consente di capire e successivamente prevedere un certo tipo di comportamento. Si riportano alcune delle tecniche più comunemente utilizzate:

- **Diffrazione di raggi X (XRD)**: è una potente tecnica utilizzata che fornisce informazioni sulla struttura cristallina, la mineralogia e la composizione chimica dei minerali argillosi. In particolare, dai valori angolari ottenuti secondo la legge di Bragg si possono ricavare informazioni e forma della cella unitaria: $n\lambda = 2d \sin\theta$ [11], oltre all'espressione del parametro di cella, in funzione della distanza interplanare e degli indici di Miller (Figura 8). Questa tecnica consente di determinare gli spazi tra i piani strutturali del silicato. Monitorando la posizione, la forma e l'intensità dei riflessi basali dai piani distribuiti del silicato, è possibile identificare la struttura del nanocomposito.

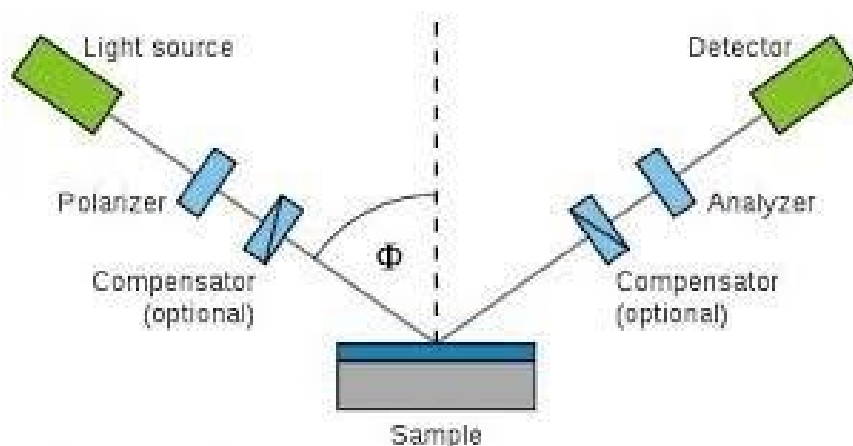


Figura 8: Descrizione schematica dell'analisi XRD.

- **Microscopia elettronica a scansione (SEM):** la tecnica viene utilizzata per la caratterizzazione morfologica dei minerali argillosi: fornisce informazioni sulle caratteristiche della superficie, forma, dimensione e distribuzione delle particelle di argilla. Questo strumento utilizza un fascio focalizzato di elettroni come sonda (Figura 9), con un'energia compresa tra 1 e 30 keV. Questi elettroni interagiscono con il campione, generando altri elettroni che vengono rilevati da un rivelatore, il quale genera un segnale. L'intensità di questo segnale determina la luminosità del pixel misurato [7].

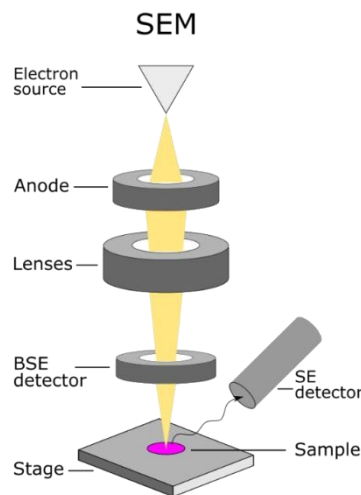


Figura 9: Struttura di un microscopio elettronico a scansione (SEM).

- **Microscopia elettronica a trasmissione (TEM):** la tecnica viene utilizzata per l'imaging ad alta risoluzione di minerali argillosi. Fornisce informazioni sulla struttura cristallina, la morfologia e la composizione chimica delle singole particelle di argilla. Questa tecnica utilizza un fascio di elettroni ad alta energia e riproduce le immagini utilizzando la parte trasmessa del fascio (Figura 10); l'immagine viene osservata su uno schermo fluorescente, su una lastra fotografica o per mezzo di una telecamera CCD [18].

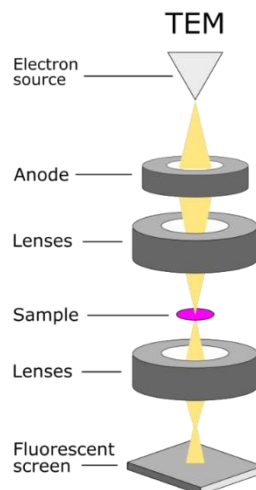


Figura 10: Struttura di un microscopio a trasmissione (TEM).

- Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR):** la tecnica viene utilizzata per l'identificazione di minerali argillosi e la caratterizzazione della loro chimica superficiale. Fornisce informazioni sulla presenza di gruppi funzionali e sui legami chimici presenti sulla superficie delle particelle di argilla. Quando esposte alla radiazione infrarossa, le molecole del campione assorbono selettivamente le radiazioni di lunghezze d'onda specifiche, provocando un cambiamento nel momento di dipolo delle molecole stesse (Figura 11). Questo comporta un trasferimento di energia vibrazionale delle molecole dallo stato fondamentale allo stato eccitato. La frequenza del picco di assorbimento è determinata dal gap di energia vibrazionale. Il numero di picchi di assorbimento è correlato al numero di modi di vibrazione della molecola. L'intensità dei picchi di assorbimento è correlata al cambiamento del momento di dipolo e alla probabilità di transizione tra i livelli di energia. Pertanto, l'analisi dello spettro infrarosso fornisce informazioni dettagliate sulla struttura molecolare [9].

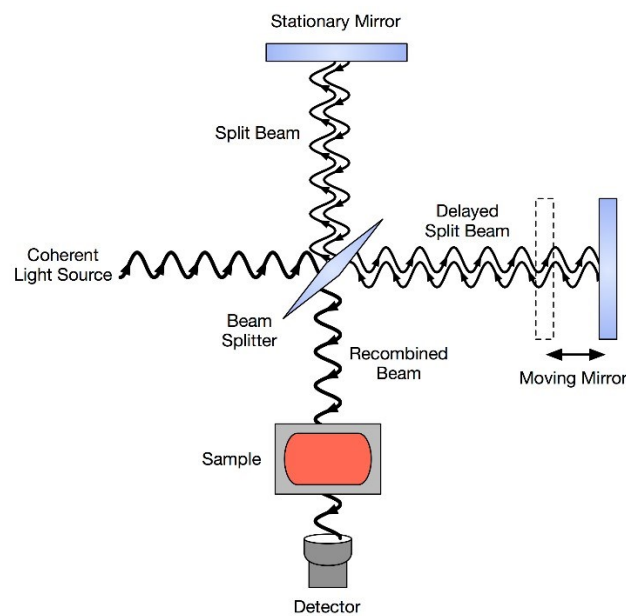


Figura 11: Funzionamento semplificato di un interferometro utilizzato negli strumenti FTIR.

- Analisi termogravimetrica (TGA):** la tecnica è utilizzata per la determinazione della stabilità termica dei minerali argillosi. Fornisce informazioni sull'eventuale decomposizione termica e sui cambiamenti mineralogici che si verificano durante il riscaldamento. Il campione viene sottoposto a un ciclo termico predefinito e si registra l'andamento del suo peso in funzione della temperatura (Figura 12). Operando in atmosfera inerte, è possibile rilevare la diminuzione di peso del campione alle temperature in cui avvengono specifiche reazioni chimiche che, di solito, comportano la formazione di composti gassosi. Conoscendo

le temperature a cui si verificano tali reazioni, in base alla perdita di peso, è possibile determinare il contenuto percentuale del composto che si è trasformato. Registrando il peso del campione in funzione della temperatura (o del tempo), si ottiene una curva a gradini chiamata “termogravimetria” [10].

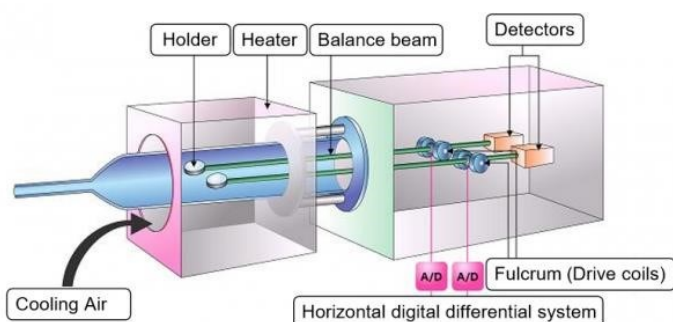


Figura 12: Schema di un analizzatore per analisi termogravimetriche.

- **Capacità di scambio cationico (CEC):** viene utilizzata per la determinazione delle proprietà di scambio ionico dei minerali argillosi: fornisce informazioni sulla quantità e sul tipo di ioni scambiabili presenti sulla superficie delle particelle di argilla. La determinazione è basata sull'analisi in fluorescenza a raggi X dei campioni, grazie alla quale si determinano i principali elementi alcalini ed alcalinoterrosi nel campione scambiato con Ba^{2+} , per esempio. L'adozione di questo elemento chimico come ione compensatore è sicuramente consigliabile rispetto ad altri cationi spesso utilizzati per la determinazione delle proprietà, come Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ o Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , sia per la sua elevata forza di scambio che per il suo notevole peso atomico, che garantisce una maggiore sensibilità nella misura del CEC. Un'altra possibilità consiste nel determinare la quantità di sale alchilammonio trattenuto nell'argilla organicamente modificata. A tale scopo, l'argilla organofilica essiccata e un campione di argilla originale vengono riscaldati a $1000\text{ }^{\circ}C$. I due campioni vengono quindi pesati, correggendo la perdita di acqua strutturale dovuta al riscaldamento. Conoscendo il peso molecolare del sale di alchilammonio, è possibile calcolare i milliequivalenti dell'alchilammonio trattenuti nell'argilla. Da questo valore è poi possibile calcolare la capacità di scambio cationico (CEC) [16].
- **Superficie specifica (SSA):** tale valore viene utilizzato per la determinazione della superficie dei minerali argillosi. Fornisce informazioni sull'adsorbimento e sulla reattività delle particelle di argilla [19]. Il metodo principale di misura della superficie specifica di un materiale microporoso è per adsorbimento dei gas (metodo BET). La misura si effettua a basse temperature e pressioni e consiste nella valutazione del volume di gas adsorbito dal solido a varie pressioni.

- **Spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (NMR):** la spettroscopia a risonanza magnetica nucleare allo stato solido è una tecnica avanzata che consente di studiare la struttura, la dinamica e le interazioni molecolari all'interno dei minerali con elevata risoluzione spettrale [20] e completare la caratterizzazione chimica.

La combinazione di diverse tecniche analitiche è necessaria per caratterizzare completamente le proprietà e il comportamento dei minerali argillosi.

1.4 Le resine epossidiche

Le resine epossidiche sono polimeri termoindurenti che si ottengono per reazione di due componenti: il precursore polimerico (resina base) e il termoindurente, necessario per la polimerizzazione. Una miscelazione opportuna dà luogo ad uno strato vetrificato lucido. Il precursore polimerico è un polimero a basso peso molecolare, in genere compreso tra 300 e 10000 uma, composto da un insieme di monomeri contenenti ognuno un anello epossidico (Figura 13), che è un etere ciclico a tre atomi, molto reattivo. La reattività è dovuta alla cosiddetta "tensione d'anello" [21]: sia la tensione angolare (60° circa per gli angoli di legame), sia la tensione torsionale dovuta all'eclissamento degli atomi di idrogeno, comportano una facile apertura dell'anello, in particolare in presenza di attacchi nucleofili od elettrofili.

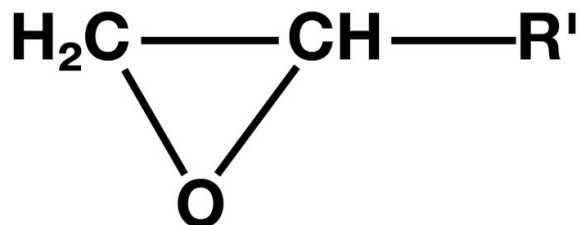


Figura 13: Struttura chimica dell'anello epossidico.

In realtà, il termine epossidico è usato anche solo per la resina base, in quanto è essa stessa a contenere tali anelli ossiranicici. Il precursore polimerico, infatti, si ottiene dalla reazione di epichelidrina, contenente i gruppi ossiranicici, con un bisfenolo (A o F).

La reazione tra fenolo ed epichelidrina avviene attraverso diversi stadi (Figura 14):

1. la formazione dell'anione fenossido ad opera della base;
2. la reazione del gruppo epossidico dell'epichelidrina con l'anione fenossido;
3. l'eliminazione del cloruro che porta alla formazione del glicidil etere;
4. la reazione del gruppo epossidico del glicidil etere con un altro anione fenossido;
5. la formazione del gruppo ossidrilico per protonazione.

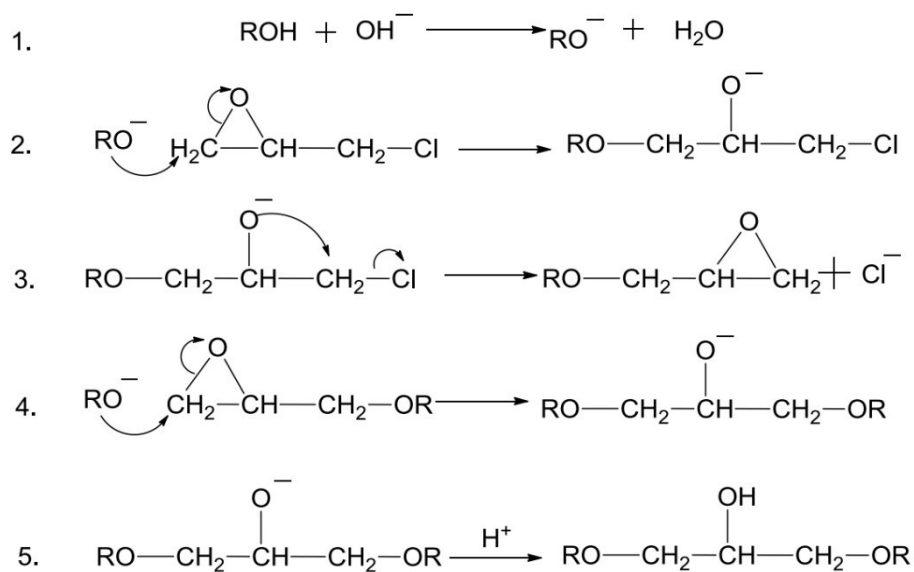


Figura 14: Schema di sintesi a stadi per la formazione del precursore polimerico.

L'uso del bisfenolo A, in possesso di due gruppi epossidici, al posto del fenolo, risulterà nella formazione del diglicidil etere del bisfenolo A (DGEBA, uno dei precursori più utilizzati), la cui struttura è riportata in figura 15.

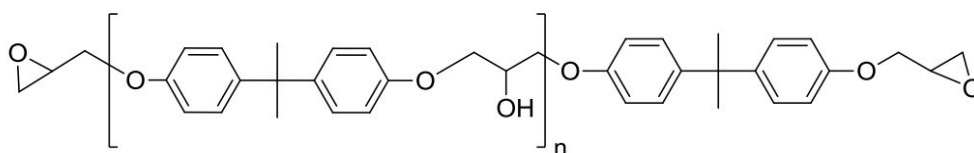


Figura 15: Struttura chimica del prepolimero da bisfenolo A.

Gli agenti indurenti, necessari per la polimerizzazione in quanto il solo calore non è sufficiente, possono essere di diverse tipologie [22]: mono- o di-anidridi, poliammidi, ammine terziarie, poliammide alifatiche ed aromatiche.

Le *ammine alifatiche*, per esempio, reagiscono più rapidamente formando reticoli, in condizioni di temperatura ambiente. Questo tipo di reazione conferisce eccellenti proprietà fisiche e resistenza chimica ai solventi. D'altra parte, le *ammine aromatiche* sono meno reattive e richiedono temperature e tempi di reazione più elevati. Tuttavia, determinano una maggiore temperatura di distorsione termica e una maggiore rigidità grazie alla loro struttura aromatica. Per quanto riguarda le *anidridi*, esse sono meno reattive e generano reazioni meno esotermiche. Di conseguenza, richiedono l'impiego di un accelerante, spesso sotto forma di un'ammina terziaria. Queste reazioni avvengono a temperature elevate e per tempi più lunghi, conferendo

proprietà come maggiore stabilità termica, ottime proprietà di isolamento elettrico e buona resistenza chimica.

Le *poliammidi* mostrano un comportamento simile alle ammine alifatiche polifunzionali: la reticolazione avviene a temperatura ambiente, ma i tempi di reazione sono più lunghi. Tuttavia, le poliammidi conferiscono una maggiore adesione e alta viscosità.

In generale, l'indurimento a temperatura ambiente delle resine epossidiche si traduce in una bassa temperatura di transizione vetrosa (T_g), conferendo loro grande flessibilità, resistenza agli shock elettrico e termico. Al contrario, l'indurimento ad alte temperature delle stesse resine epossidiche comporta un aumento della T_g , migliorando la resistenza alla trazione, al calore e la resistenza chimica [23]. (Figura 16)

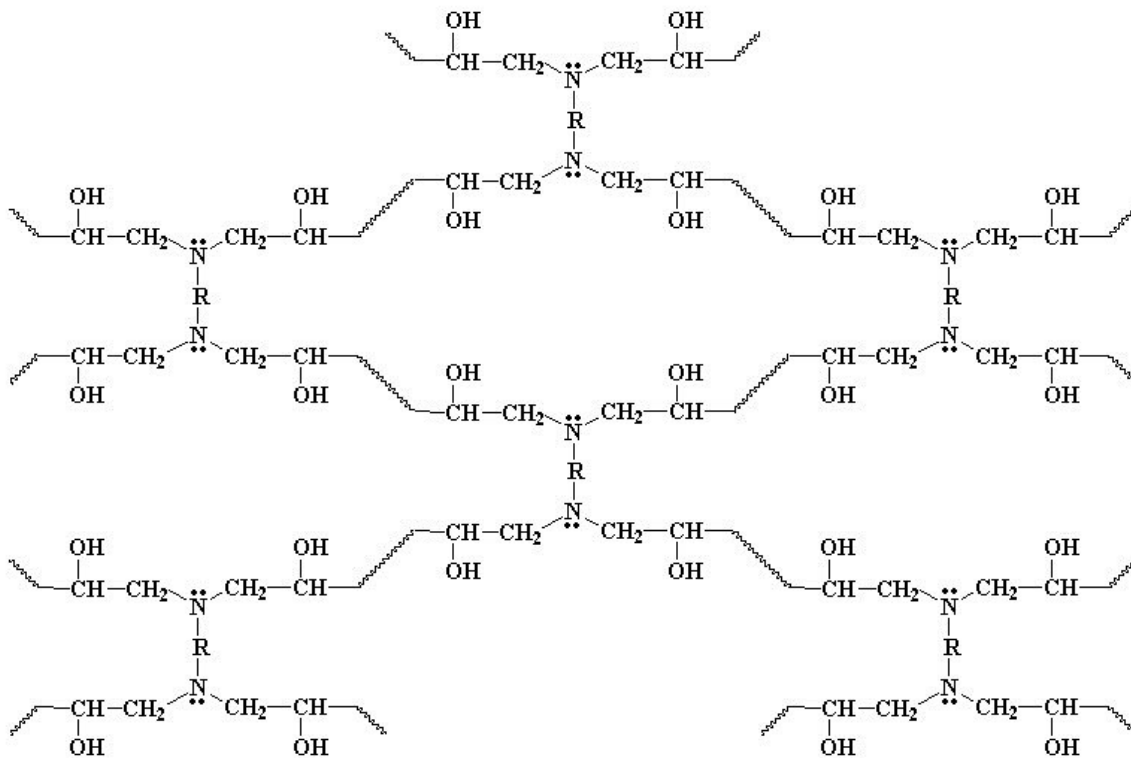


Figura 16: Schema della formazione di una resina epossidica con indurente poliamminico.

La preparazione di un composito termoindurente, dunque, richiede una valutazione della velocità di indurimento per determinare la temperatura ideale di transizione vetrosa e comprendere il comportamento fluido della resina indurita. È importante predire quando avviene la transizione dalla fase liquida alla fase gelificata, poiché prima di questo punto il polimero può essere facilmente lavorato e modellato. Il punto di gelificazione rappresenta il momento in cui il polimero subisce una trasformazione irreversibile, determinando un

repentino cambiamento di viscosità e una diminuzione della fluidità. Questo segna il passaggio da una viscosità praticamente nulla a una viscosità praticamente infinita, accompagnata dall'emergere di proprietà elastiche [23]. Una volta che il polimero raggiunge questo punto, passa dallo stato liquido a quello solido e diventa insolubile in qualsiasi solvente. La resina risultante mostra un aumento del peso molecolare e la formazione di una struttura reticolare tridimensionale (Figura 16).

L'indurimento della resina epossidica con un indurente amminico coinvolge tre principali reazioni.

- Nella prima fase, due gruppi funzionali differenti si combinano per formare un polimero lineare. L'introduzione di un'ammina primaria al gruppo epossidico conduce alla formazione di un gruppo ossidrilico e di un'ammina secondaria.
- La seconda fase coinvolge la reticolazione tra le ammine secondarie e i gruppi epossidici, dando origine a una rete tridimensionale di macromolecole.
- La terza fase, nota anche come eterificazione, è una reazione secondaria in cui un gruppo idrossilico reagisce con un gruppo epossidico, producendo un legame eterico e un altro gruppo idrossilico. La velocità della reazione di eterificazione dipende dalla composizione chimica e dalla struttura della resina epossidica, dell'indurente e dalla temperatura di reazione. Quando l'attività dell'ammina è limitata o quando ci sono eccesso di gruppi idrossilici, la reazione di eterificazione può competere con quella di indurimento della miscela formata dalla resina epossidica e dall'indurente.

Dopo il processo di indurimento, le resine epossidiche presentano diverse proprietà chiave [24]:

- *Eccellente adesione alle superfici*: la presenza dei gruppi ossidrilici polari nella resina interagiscono fortemente con le superfici, specialmente quelle metalliche, garantendo un'adesione elevata.
- *Elevata resistenza agli agenti chimici*: lo scheletro della resina non contiene gruppi funzionali che possono essere facilmente ossidati o idrolizzati, conferendo alla resina una buona resistenza agli agenti chimici.
- *Buona resistenza termica*: la struttura reticolata e la presenza di anelli aromatici del bisfenolo A o F producono un materiale termoisolante e rigido, conferendo alla resina una buona resistenza alle alte temperature.
- *Buone proprietà meccaniche*: queste sono dovute alla struttura rigida e reticolata della resina, nonché alla presenza di legami covalenti relativamente forti come i legami carbonio-carbonio, carbonio-ossigeno e carbonio-azoto.

- *Eccellente isolamento elettrico*: non ci sono zone di coniugazione lungo le catene della resina, che potrebbero permettere il passaggio di elettroni, pertanto la resina epossidica fornisce un ottimo isolamento elettrico.

Come accade in genere per altri materiali polimerici, è possibile modificare o migliorare le proprietà delle resine epossidiche mediante l'aggiunta di additivi. Questo processo consente di renderle più adatte a una vasta gamma di utilizzi.

1.4.1 Resine epossidiche funzionalizzate con minerali argillosi

I minerali argillosi sono uno dei possibili additivi implementabili nella funzionalizzazione delle resine epossidiche, permettendo di creare innovativi nanocompositi applicabili in vari campi tra cui quello medicale. I nanocompositi a base di resina epossidica e silicati lamellari sono realizzati attraverso la polimerizzazione *in situ* [25]. La resina epossidica viene pre-intercalata nell'argilla, dopo l'aggiunta dell'indurente avviene la reazione di polimerizzazione e la formazione del nanocomposito. La dispersione a livello nanoscopico dell'argilla nella matrice polimerica riduce la mobilità delle macromolecole con un sensibile effetto rinforzante mentre l'elevata superficie interfacciale permette il trasferimento degli sforzi dalla matrice alla carica (rinforzante) con conseguente significativo innalzamento delle proprietà meccaniche quali il modulo di Young e la tenacità.

Sin dall'antichità, l'argilla veniva utilizzata come medicinale cicatrizzante, come evidenziato nelle antiche tavolette di Nippur [26]. Intorno al 1600 a.C., il Papiro di Ebers, considerato il più antico testo medico del mondo [27], raccomandava l'argilla per trattare una varietà di disturbi, tra cui diarrea, dissenteria, parassiti intestinali, ferite e ascessi. Nel XIX secolo, l'argilla divenne un trattamento topico comune per le ferite chirurgiche, dimostrando benefici nell'alleviare il dolore, ridurre l'infiammazione, prevenire l'infezione e favorire il processo di guarigione. Alcuni minerali argillosi espandibili possiedono la capacità di assorbire cationi, rilasciando ioni metallici e generando radicali idrossilici dannosi per i microbi. Questa caratteristica può essere sfruttata per eliminare agenti patogeni e contrastare la proliferazione di ceppi batterici che col tempo stanno diventando sempre più resistenti agli antibiotici.

1.4.2 Tecniche di produzione dei nanocompositi a base polimerica (PMNC) caricati con argille

Molti materiali inorganici, come fibre di vetro, talco, carbonato di calcio e minerali argillosi sono stati usati con successo come additivi o rinforzanti per migliorare la rigidità e la resistenza dei polimeri. L'entità del miglioramento delle proprietà dei polimeri caricati dipende da molti fattori quali il rapporto di forma, il grado di dispersione e orientazione del filler nella matrice polimerica e l'adesione all'interfaccia tra i due. Generalmente, i materiali inorganici non interagiscono correttamente con i polimeri organici; al fine di realizzare una buona dispersione o un'adeguata adesione, sono necessari trattamenti superficiali.

In particolare, i PMNC a base di argille possono essere classificati anche in base alla tecnica di produzione scelta [14].

I **nanocompositi a fasi separate** si ottengono quando il polimero non può inserirsi tra gli strati di silicato ottenendo un composito in cui il polimero e il silicato rimangono separati, comportandosi in modo simile ai tradizionali microcompositi (Figura 17).

I **nanocompositi intercalati** sono composti da singole molecole di polimero che si inseriscono tra i piani cristallini del fillosilicato. Gli strati del materiale di riempimento vengono allontanati, di solito di 1-4 nm, ma il silicato mantiene la sua struttura a strati ordinata. La morfologia finale è quella di un composito in cui la fase cristallina è sempre presente e non completamente dispersa nella fase plastica (Figura 18).

Nei **nanocompositi esfoliati** la penetrazione delle molecole di polimero è molto più estesa: la distanza tra le lamelle aumenta al punto da divenire maggiore del loro raggio di azione con conseguente totale annullamento delle interazioni tra le lamelle stesse che quindi perdono il loro parallelismo e risultano orientate casualmente le une rispetto alle altre. La fase cristallina viene dunque distrutta così che si ottiene un'eccellente dispersione della carica nella matrice a cui corrispondono i massimi incrementi prestazionali possibili (Figura 19).

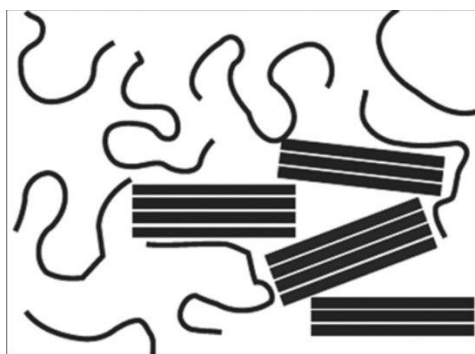


Figura 17: Esempio schematizzato di nanocomposito a fasi separate.

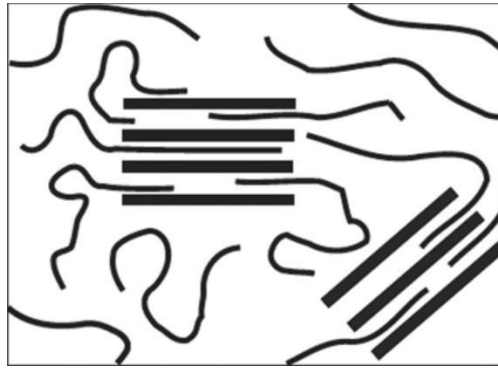


Figura 18: Esempio schematizzato di nanocomposito intercalato.

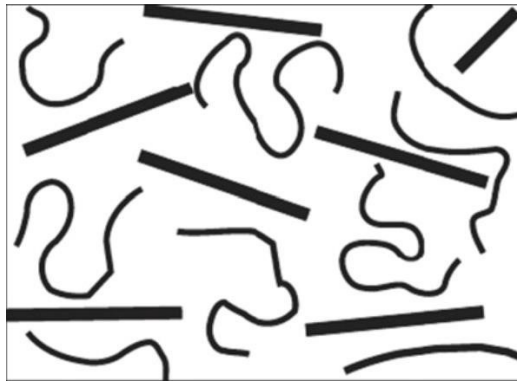


Figura 19: Esempio schematizzato di nanocomposito esfoliato.

In realtà, l'intercalazione e l'esfoliazione rappresentano casi estremi e ideali: in generale, un nanocomposito polimerico sarà parzialmente intercalato e parzialmente esfoliato: potrebbe, ad esempio, presentare un aumento parziale della distanza tra le lamelle (tipico di un materiale intercalato), ma con le lamelle orientate casualmente (come in un materiale esfoliato), oppure lamelle molto distanziate ma disposte parallelamente le une rispetto alle altre.

Le tecniche di produzione di tali nanocompositi polimerici possono essere riassunte in quattro principali processi [14]:

- (1) Esfoliazione-assorbimento,
- (2) polimerizzazione intercalativa in situ,
- (3) template synthesis,
- (4) intercalazione da polimero fuso.

(1) **Esfoliazione-assorbimento.** Tale tecnica prevede che i silicati stratificati vengano esfoliati in singoli strati utilizzando un solvente nel quale il polimero sia solubile. Essendo debole la forza che tiene uniti i singoli strati di un cristallite, i silicati possono facilmente essere

dispersi in un opportuno solvente, nel quale sia immerso anche il polimero. Questo si adsorbe sugli strati delaminati e, eliminato il solvente per evaporazione o precipitazione, rimane intrappolato tra gli strati che si legano nuovamente tra di loro, generando una struttura ordinata multistrato. Nei nanocompositi esfoliati la penetrazione delle molecole di polimero è molto più estesa: la distanza tra le lamelle aumenta con conseguente totale annullamento delle interazioni tra le lamelle stesse che quindi perdono il loro parallelismo e risultano orientate casualmente l'una rispetto alle altre. La fase cristallina viene dunque distrutta così che si ottiene un'eccellente dispersione della carica nella matrice a cui corrispondono i massimi incrementi prestazionali possibili [28].

(2) **Polimerizzazione intercalativa *in situ*.** Il processo prevede l'introduzione del monomero liquido o in soluzione negli interstizi del silicato, in modo che la polimerizzazione possa avvenire direttamente all'interno delle cavità. La polimerizzazione è indotta tramite irraggiamento, applicazione di calore, diffusione di un iniziatore appropriato o mediante l'uso di un iniziatore organico o catalizzatore già presente negli interstizi tramite scambio cationico (Figura 20). La polimerizzazione *in situ* viene usata anche per la produzione di nanocompositi a base di polimeri termoindurenti, in particolare le resine epossidiche. In questo caso l'abilità di esfoliazione dell'argilla organicamente modificata dipende dalla sua natura, dal suo effetto catalitico nella reazione d'indurimento e dalla miscibilità con l'agente indurente [25], [29].

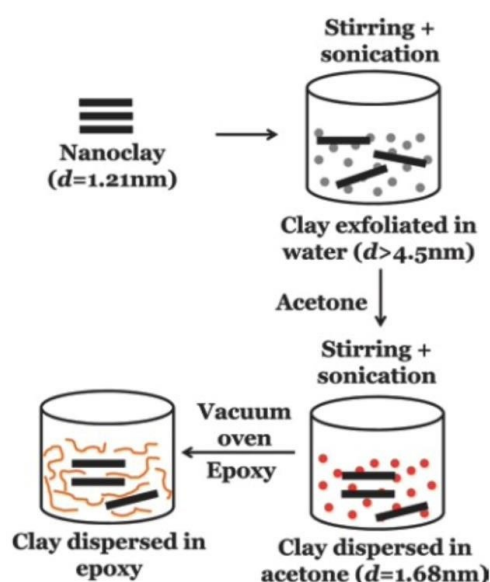


Figura 20: Rappresentazione schematica del processo di miscelazione del nanocomposito.

(3) **Template synthesis.** Questo approccio impiega il polimero per favorire la nucleazione e la crescita dei cristalli inorganici, che successivamente lo intrappolano. Questa tecnica è quindi ampiamente usata per la produzione di nanocompositi a doppio strato a base di idrossidi, ma è poco impiegata per la produzione di silicati stratificati [30]. Le catene polimeriche costituiscono uno stampo per la crescita degli strati d'argilla, per esempio, e ne rimangono intrappolati mentre crescono. Gli svantaggi di questa tecnica sono l'uso di alte temperature, che possono decomporre il polimero, e la tendenza ad aggregarsi degli strati argillosi generati da un processo di auto-assemblaggio.

(4) **Intercalazione da polimero fuso (Melt Compounding).** In questa tecnica, gli strati di silicato vengono mescolati con il polimero fuso; se le superfici degli strati sono abbastanza compatibili con il polimero, le catene polimeriche possono penetrare negli interstizi degli strati, generando una struttura intercalata o esfoliata. In questo metodo non è necessario l'uso di solventi. La sintesi dei polimeri per intercalazione allo stato fuso prevede la ricottura di un miscuglio costituito dal polimero e dal silicato lamellare. Il composto è riscaldato a una temperatura superiore al punto di rammollimento del polimero [31].

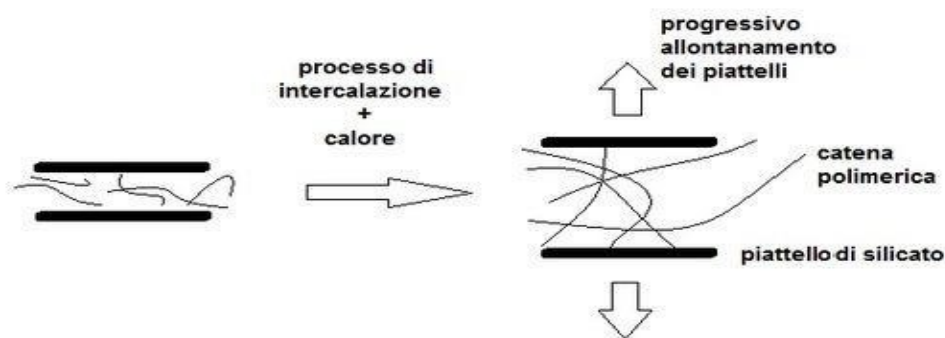


Figura 21: Schematizzazione della tecnica di intercalazione da polimero fuso.

Giannelis et al. [32], hanno sperimentato una tecnica alternativa per la produzione di nanocompositi, dimostrando che l'intercalazione delle catene polimeriche tra gli strati dell'argilla può avvenire senza l'uso di solventi. Prima del processo, l'argilla viene modificata scambiando i suoi cationi alcalini originali con cationi organici surfactanti, al fine di aumentare la miscibilità con altri polimeri e ridurre l'energia superficiale degli strati dei silicati. La procedura prevede il riscaldamento di un composto formato dal polimero e dalla polvere di argilla modificata al di sopra della temperatura di fusione del polimero. In questo modo, le catene polimeriche si diffondono tra gli strati dell'argilla, formando il nanocomposito.

I cationi organici più comunemente utilizzati per modificare l'argilla e renderla organofilica, cioè miscibile con i polimeri, sono gli ioni di alchilammonio aventi formula generale R_3NH^+ (dove R rappresenta la catena idrocarburica) e altri sali con carica positiva [33]. Lo scambio cationico consente di aumentare la distanza tra gli strati dei silicati, consentendo alle catene polimeriche di intercalarsi nella galleria interstrato e rendendo tutti gli strati dei silicati idrofobici. Le molecole di surfactante sono composte da una testa polare idrofila, che si dissolve facilmente in acqua, e una coda apolare idrofobica, che è insolubile in acqua. La testa del surfactante, caricata positivamente, si posiziona sulla superficie degli strati dei silicati, che presentano cariche negative, mentre le lunghe code organiche si estendono nello spazio interstrato irradiandosi dalla superficie.

1.5 Proprietà antimicrobiche delle argille

Gli agenti antimicrobici comprendono una vasta gamma di sostanze chimiche utilizzate per combattere i microrganismi patogeni o per impedire la loro crescita e proliferazione. Gli antibiotici sono uno dei principali esempi di antimicrobici e sono specificamente progettati per combattere batteri patogeni. Tuttavia, ci sono anche altri tipi di antimicrobici che possono essere diretti contro virus, funghi, parassiti o altri microrganismi nocivi. L'uso di antimicrobici è fondamentale nel trattamento delle infezioni batteriche, virali o fungine, ma è importante utilizzarli in modo responsabile per prevenire l'insorgere della resistenza ad essi. La resistenza agli antimicrobici (AMR) è la capacità dei microrganismi di sopravvivere ai trattamenti antimicrobici, come gli antibiotici, e di continuare a proliferare nonostante l'esposizione a tali agenti. Questo fenomeno può derivare dall'uso scorretto o eccessivo di antibiotici, che può causare la selezione di ceppi batterici resistenti [34]. I batteri possono infatti mettere in atto delle difese: alcuni batteri hanno sviluppato nel tempo svariate strategie, come la formazione di pompe di efflusso che "sputano" fuori dalla cellula l'antibiotico, mentre altri ne disattivano la funzione spezzando l'antibiotico e altri ancora bloccano il sito laddove la molecola dell'antibiotico si attacca. L'uso indiscriminato degli antibiotici ha prodotto quelli che la medicina definisce come "super batteri", capaci di resistere anche all'azione dei più potenti antibiotici.

Un esempio ben noto di batterio che ha sviluppato resistenza a diversi antibiotici è lo *Staphylococcus aureus* *meticillino-resistente* (MRSA) [35]. Questo batterio è in grado di resistere all'effetto degli antibiotici beta-lattamici, tra cui la meticillina (Figura 22-23), che è comunemente usata per trattare le infezioni da stafilococco.

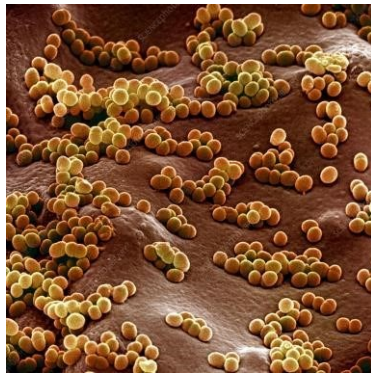


Figura 22: Immagine SEM di *Staphylococcus Aureus*

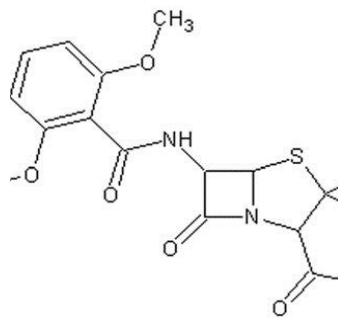


Figura 23: Struttura chimica della meticillina

Diversi ricercatori hanno dimostrato poteri antibatterici dell'argilla contro batteri come *E. Coli* e *Staphylococcus aureus*. Lo studio condotto da Morrison K. et al [36], per esempio, dimostra che l'argilla medicinale (Argilla blu dell'Oregon) è in grado di uccidere efficacemente una vasta gamma di ceppi batterici, compresi quelli resistenti agli antibiotici convenzionali. Questo effetto antibatterico è attribuito principalmente alla presenza di minerali argillosi specifici, come la montmorillonite, che interagiscono con i batteri in modi diversi. In particolare, l'argilla medicinale agisce danneggiando le membrane cellulari batteriche e inducendo lo stress ossidativo, attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno o ROS (Figura 24). Questi meccanismi di azione sono supportati da analisi geochimiche dettagliate condotte sugli estratti di argilla e sulle colture batteriche. Viene spiegato il meccanismo di morte cellulare dovuto da particelle di argilla blu dell'Oregon (Oregon Blue Clays, USA): il rilascio di ioni Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} e Ca^{2+} dell'argilla comporta una degradazione dei lipopolisaccaridi tipici della membrana esterna dell'*Escherichia Coli*. La tossicità dei metalli è correlata alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano stress ossidativo nei batteri. Esempi di queste specie includono l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale idrossile (OH). Queste specie dell'ossigeno si formano attraverso una riduzione parziale dell'ossigeno, secondo l'equazione di Fenton (Equazione 1); quando distruggono il sistema di difesa

antiossidante delle cellule, si verifica lo stress ossidativo, che può danneggiare gli acidi nucleici e le proteine [37], [38], [39].

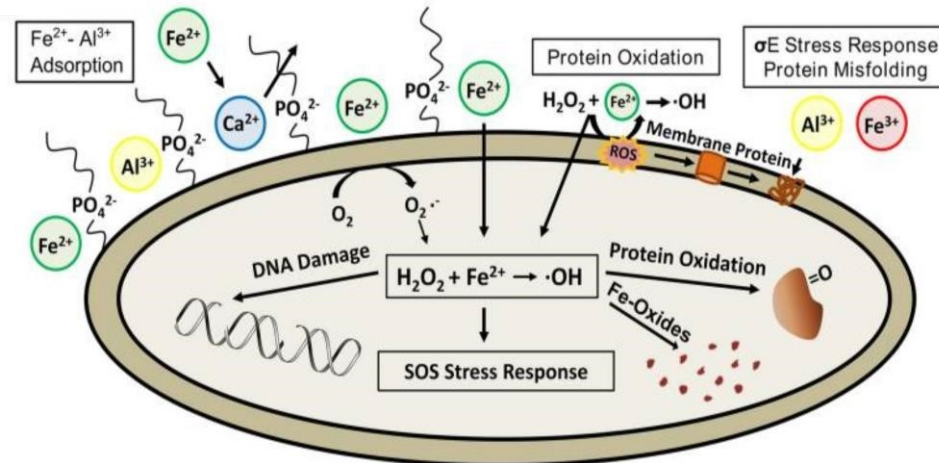
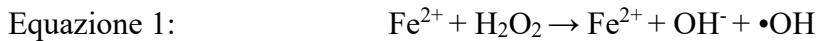


Figura 24: Meccanismi per l'induzione di stress ossidativo nei batteri.



Figura 25: L'argilla blu dell'Oregon.

In questo studio [36] è stata condotta un'analisi sull'adsorbimento, la localizzazione e lo stato redox dei metalli nei batteri *Escherichia coli*. I risultati indicano che gli ioni Fe²⁺ solubili vengono adsorbiti nell'involucro cellulare. Le immagini ottenute tramite la tecnica Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) dei batteri trattati con l'argilla mostrano la presenza di nanoparticelle nello spazio intracellulare, che si formano entro 24 ore dall'incubazione e coincidono con la morte cellulare (Figura 26). L'effetto tossico del radicale idrossile si manifesta solo quando viene generato in prossimità della cellula, poiché ha una durata molto breve di circa 10⁻⁹ secondi. Gli ioni Fe²⁺ raggiungono la membrana batterica e reagiscono con il perossido di idrogeno, che si forma al di fuori della membrana cellulare, generando così il radicale idrossile nelle vicinanze della membrana proteica. È stato, dunque,

dimostrato che l'argilla blu, a differenza di altri tipi di argilla non antibatterica, ha la capacità di assorbire ioni nei suoi siti interstiziali e di rilasciarli successivamente durante l'idratazione. Questi ioni hanno proprietà chimicamente tossiche per i batteri.

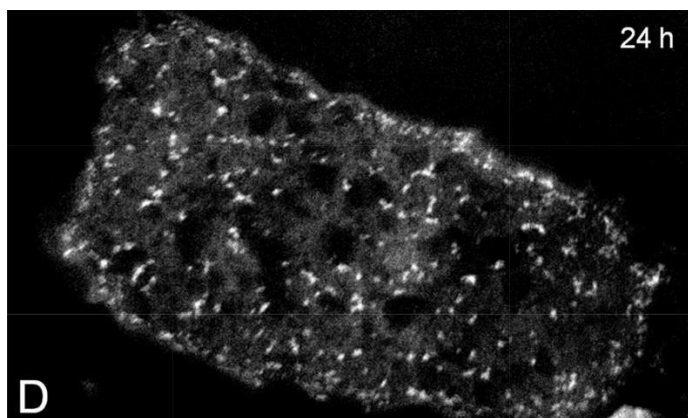


Figura 26: Immagine STEM del batterio *E.coli* trattato con argilla blu dell'Oregon: i punti bianchi mostrano le nanoparticelle intracellulari sviluppate nelle 24 ore successive all'incubazione.

Lo studio condotto da Williams et al. [40], inoltre, ha indagato gli elementi solubili assorbiti dall'*Escherichia coli* utilizzando un percolato contenente argilla blu. Per confronto, sono stati utilizzati anche una cultura batterica cresciuta in una soluzione acquosa contenente minerali argillosi privi di proprietà antibatteriche e un gruppo di controllo senza percolato.

I ricercatori hanno valutato le unità formanti colonia per ml (CFU/ml) dei tre diversi campioni dopo 24 ore di incubazione. I risultati hanno mostrato che nelle culture batteriche contenenti il percolato di argilla blu non è stato riscontrato alcun batterio sopravvissuto. In confronto, nelle culture batteriche con il percolato di argilla non antibatterica e nel gruppo di controllo, è stata riscontrata presenza batterica (rispettivamente $9,0 \pm 0,8 \cdot 10^9$ CFU/ml e $7,9 \pm 0,4 \cdot 10^9$ CFU/ml). Questi risultati evidenziano l'efficacia dell'argilla blu nell'eliminare completamente la crescita batterica, suggerendo un potenziale impiego di questo materiale per combattere le infezioni batteriche.

1.5.1 Processo biologico antibatterico

Quando i microrganismi batterici si attaccano a una superficie, formano biofilm per ancorarsi ad essa. All'interno di questo biofilm, le cellule crescono in aggregati multicellulari e sono avvolte da una matrice autoprodotta composta principalmente da sostanze polimeriche extracellulari come polisaccaridi, proteine e DNA. I biofilm difettosi non forniscono un ambiente favorevole alla crescita microbica [41]. Di conseguenza, le strategie antimicrobiche mirano a prevenire la vitalità o l'adesione dei microrganismi.

L'azione antimicrobica dei polimeri può essere classificata come "passiva" o "attiva" [42].

Un'**azione antimicrobica passiva** riduce l'assorbimento proteico sulla sua superficie, prevenendo l'adesione dei batteri al polimero. Un polimero con questa tipologia di attività antimicrobica deve presentare una carica negativa superficiale ed essere idrofilico: la maggior parte dei batteri, infatti, presentano delle membrane cariche anche esse negativamente, ed un carattere idrofobico. Pertanto, la superficie viene a svolgere un'azione repellente contro i batteri, senza ucciderli direttamente.

Un polimero con **azione antimicrobica attiva**, invece, induce una morte effettiva dei batteri dopo che questi hanno aderito alla superficie. Tale proprietà si ottiene funzionalizzando il polimero con agenti attivi, come cationi biocidi, peptidi antimicrobici od antibiotici a rilascio. In particolare, i polimeri funzionalizzati con cationi biocidi, definiscono i cosiddetti "biocidal polymers" [43]: i siti antimicrobici sono incorporati nell'intera macromolecola. I batteri generalmente hanno carica negativa sulla membrana esterna, e tali cationi possono portare ad una destabilizzazione superficiale delle cellule batteriche. I polimeri con residui cationici aderiscono prima ai gruppi delle teste lipidiche anioniche nella superficie della membrana batterica caricata negativamente tramite interazioni elettrostatiche, cui segue l'inserimento dei loro gruppi idrofobici nella membrana batterica non polare, portando così alla permeabilizzazione della membrana, alla perdita di citoplasma e alla morte batterica.

Tuttavia, la degradazione della membrana extracellulare non è l'unico meccanismo di uccisione batterica. In base a numerosi studi è stato proposto un meccanismo di azione multiplo che comprende anche produzione di ROS [44], danneggiamento di RNA e DNA, interazione con proteine e alterazione di processi enzimatici, alterazione della respirazione cellulare [45]. I batteri sono in grado di proliferare in prossimità dell'argilla presente in natura senza subire alterazioni nel loro ciclo vitale. Tuttavia, quando l'argilla viene estratta dall'ambiente naturale e idratata, i minerali si dissolvono e si ossidano, rilasciando ioni metallici che possono risultare tossici per i batteri. Ad esempio, l'argilla blu dell'Oregon rilascia principalmente ioni di ferro, alluminio e calcio. L'idratazione dell'argilla, in condizioni di pH inferiore a 4 o superiore a 10, crea condizioni favorevoli allo sviluppo di reazioni redox e alla conseguente dissoluzione del solfuro di ferro. La presenza di queste specie metalliche disciolte in soluzione svolge un ruolo cruciale nell'uccisione dei batteri, che sono potenti assorbenti di ioni metallici. Lo ione Fe^{2+} , come già accennato, induce lo stress ossidativo producendo specie reattive

(o radicali liberi) dell'ossigeno (ROS). I radicali liberi sono il prodotto di reazioni chimiche fisiologiche che utilizzano l'ossigeno. Sono molecole particolarmente reattive che contengono almeno un elettrone spaiato nel loro orbitale più esterno. Sono altamente instabili e cercano di ritornare allo stato di equilibrio sottraendo ad altri atomi vicini l'elettrone necessario per pareggiare la propria carica elettrica. Questo meccanismo dà origine ad ulteriori nuove

molecole instabili, innescando una reazione a catena che, se non mantenuta entro valori “fisiologici”, può danneggiare le strutture cellulari. L’ossidazione del ferro avviene all’interno della membrana citoplasmatica, dopo la disattivazione del sistema di regolazione dello ione Fe^{2+} presente all’interno delle cellule. Il ferro libero in eccesso è deleterio perché interagisce con l’ossigeno dando origine a tali radicali liberi, che danneggiano proteine, lipidi e DNA. Nel momento in cui la produzione di ROS supera la capacità fisiologica degli antiossidanti nei batteri, si crea una condizione di stress ossidativo, cioè una sofferenza a livello cellulare che può portare alla morte delle cellule per apoptosi e necrosi.

Un altro agente antimicrobico inorganico è l’argento (Ag^+): le nanoparticelle di argento sono le più usate nella composizione di nanocompositi ad azione biocida. Gli ioni argento possono legarsi alle proteine cellulari, causando cambiamenti strutturali nella parete cellulare (Figura 27). Il danneggiamento delle proteine prevede l’ossidazione delle catene laterali degli aminoacidi, la formazione di legami crociati fra le catene proteiche e reazioni di frammentazione a seguito della minor stabilità delle strutture polipeptidiche [46], [47]. In generale vi è una denaturazione delle proteine che perdono quindi la loro funzione. Inoltre, gli ioni Ag^+ possono interferire nella replicazione dei microrganismi, formando complessi con le basi azotate del DNA ed RNA determinandone la morte. Tuttavia, i moltissimi studi effettuati per determinare la causa dell’azione antibatterica dello ione argento hanno portato alla conclusione che non è possibile stabilire con esattezza l’origine della sua azione tossica in quanto esso può interferire con i processi biologici in svariati modi.

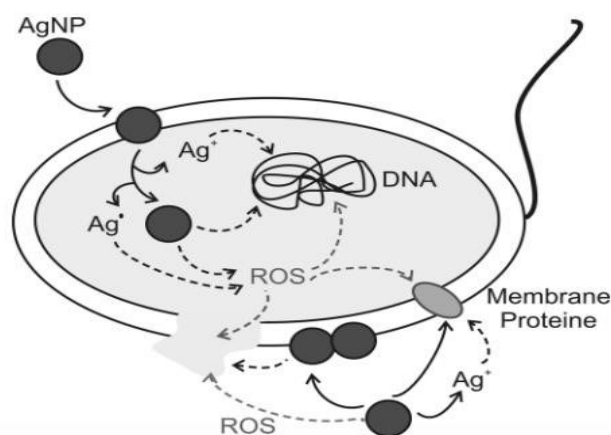


Figura 27: Attività antimicrobica delle nanoparticelle di argento (Ag).

Altri agenti inorganici di rilevanza sono lo ione alluminio (Al^{3+}), in grado di causare il “misfolding” delle proteine batteriche [48], gli ioni del rame (Cu^+ / Cu^{2+}) in grado di uccidere fino

al 99.9% di batteri dopo 4h di contatto [49], e nanoparticelle di ossido di titanio (TiO₂), generalmente usato come rivestimento delle superfici [50], [51].

È doveroso puntualizzare come questi meccanismi siano più o meno conosciuti per i microbi batterici. Il batterio è un microrganismo vivente piccolissimo, di alcuni micron di diametro, unicellulare, ovvero formato da una sola cellula dotata di una parete e una membrana esterna che la separano dall'ambiente esterno, di materiale genetico, e di tutta una serie di apparati ed enzimi che le consentono di avere un proprio metabolismo. Tuttavia, vi è una classificazione interna da considerare: i batteri *Gram-positivi* (es. *Staphylococcus aureus*) e quelli *Gram-negativi* (es. *E. Coli*) che sono due gruppi distinti di batteri che possono essere differenziati utilizzando la colorazione di Gram, una tecnica di laboratorio che si basa sulla reazione delle pareti cellulari batteriche a diversi coloranti [52]. (Figura 28)

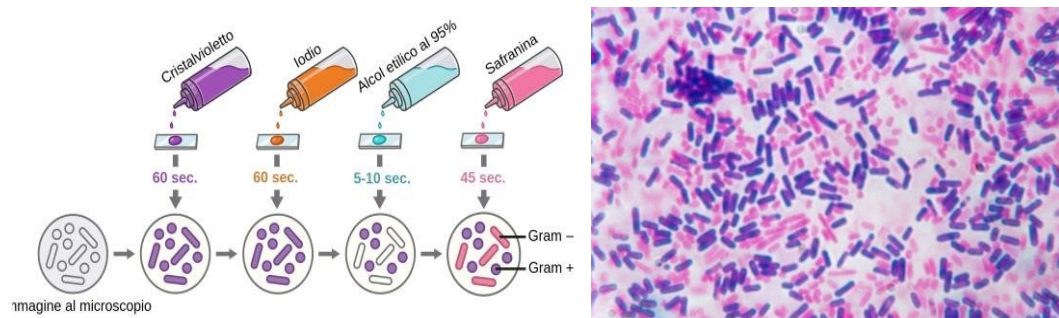


Figura 28: La colorazione di Gram per distinguere batteri Gram + (*Staphylococcus Aureus*- Rosa) da Gram - (*Escherichia Coli*-Viola) a seguito della diversa composizione chimica della superficie dei batteri.

L'ambiente interno e la membrana plasmatica è simile per entrambi i gruppi batterici, la principale differenza tra batteri *Gram-positivi* e *Gram-negativi* risiede nella struttura della loro parete cellulare e nella composizione della membrana esterna, che influisce sulla loro sensibilità agli antibiotici, patogenicità e altri aspetti della biologia batterica. In particolare, la composizione della membrana esterna dei batteri *Gram-positivi* consiste in una membrana esterna molto sottile, mentre i batteri *Gram-negativi* possiedono una doppia membrana esterna che contiene lipopolisaccaridi (LPS), come mostrato nella Figura 29, dimostrandosi più resistenti a certi tipi di antibiotici e sostanze chimiche [53].

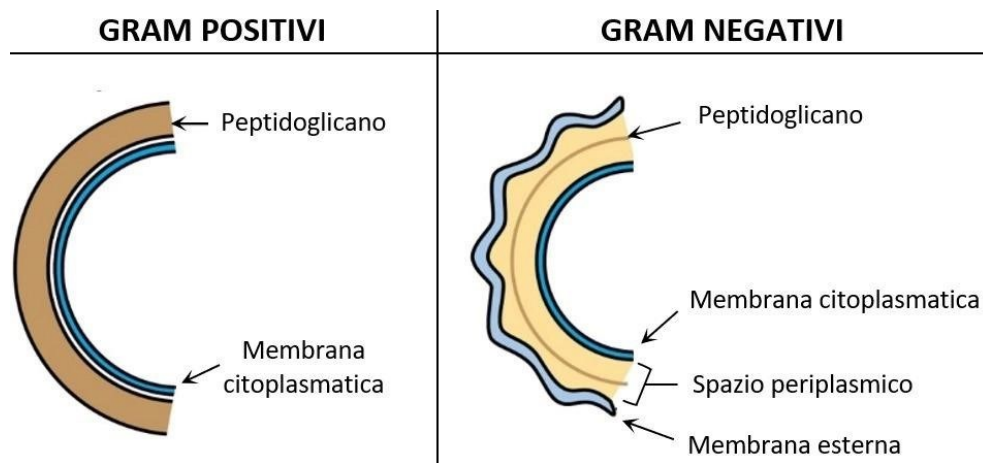


Figura 29: Differenza strutturale tra batteri Gram-positivi e batteri Gram-negativi.

1.5.2 Processo biologico antifungino

Un'altra classe di microrganismi sono i funghi (Figura 31), i quali esistono in due forme: filamentosi (muffa), e forma unicellulare o a gemmazione (lievito). Oltre al nucleo, possiedono parete cellulare derivante da batteri e virus. Differenti studi riportano l'uso di nanoparticelle per combattere la presenza di funghi, constatando la formazione di ROS anche per questi microrganismi: il meccanismo antibatterico è, dunque, simile a quello citato contro i batteri.

Lo studio condotto da F. Haghghi et al. [54] ha dimostrato l'effetto antifungino delle nanoparticelle di TiO_2 . Le cellule di lievito di *C.albicans* (Figura 30), grazie alla presenza di una parete cellulare spessa composta da glucano e chitina, sono più resistenti rispetto ai batteri. È stato riportato che le nanoparticelle di TiO_2 , producendo specie reattive dell'ossigeno intracellulari (ROS), inducono effetti distruttivi all'interno delle cellule microbiche, ossidando il *coenzima A* intracellulare e perossidando una grande quantità di lipidi, riducendo l'attività respiratoria e causando successivamente la morte cellulare. Le nanoparticelle di TiO_2 possono essere considerate come un'alternativa antifungina, sebbene altre ricerche siano necessarie per valutare la tossicità di queste particelle.

Un altro esempio è rappresentato dallo studio di Jorge A. Gutiérrez et al. [55], i cui risultati sperimentali mostrano come NPs di oro, argento e oro-argento di dimensioni inferiori a 5 nm inducano attività biologica antifungina contro cinque specie di *Candida*.

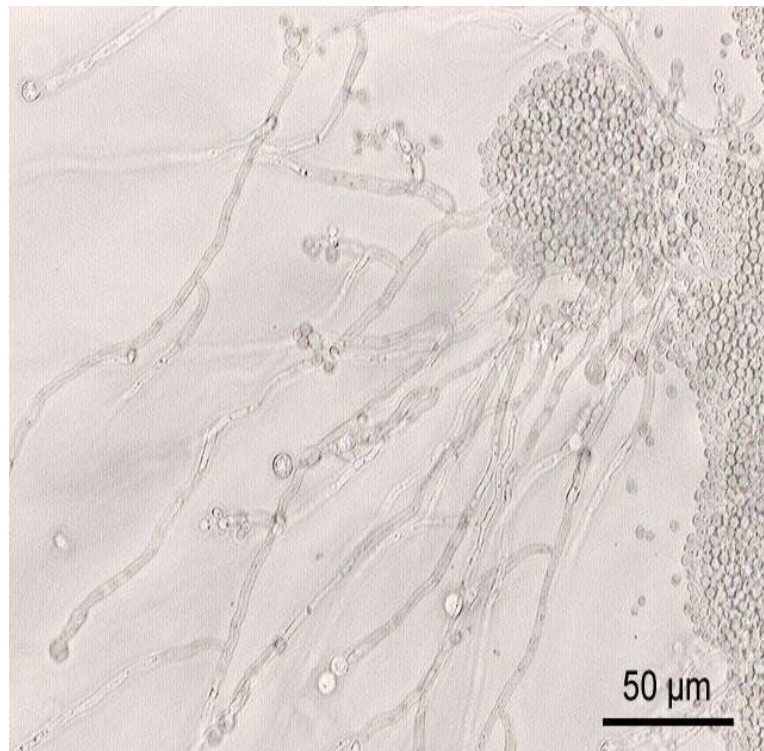


Figura 30: Immagine al microscopio di *Candida Albicans*.

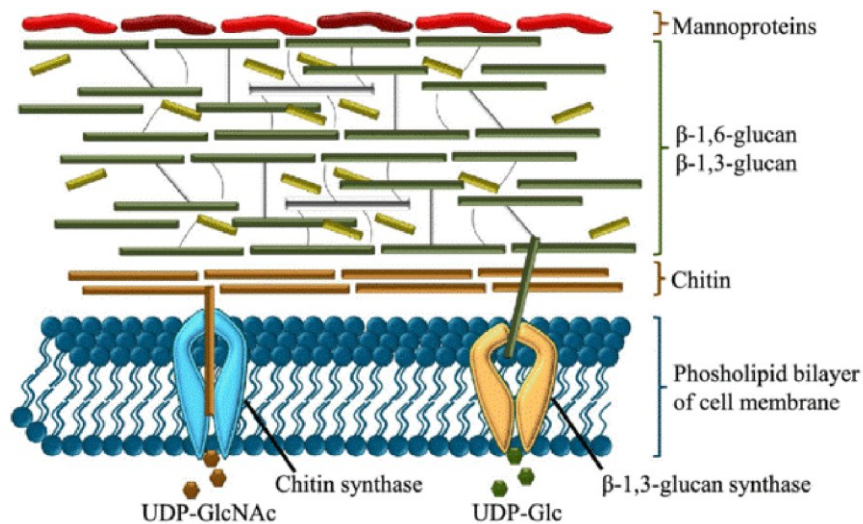


Figura 31: Immagine schematica della parete di una cellula fungina

Tutte le specie fungine presentano una membrana cellulare e una parete cellulare. La membrana è composta da fosfolipidi, mentre la parete contiene differenti proteine. Pertanto, le nanoparticelle devono interagire con tutte queste macromolecole prima di raggiungere i fosfolipidi, le proteine integrali, le proteine periferiche e i canali ionici.

L'argento è un eccellente agente antimicrobico, mentre l'oro è un ottimo materiale per legare molecole e gruppi funzionali. La superficie dell'oro reagisce con le biomolecole vicine e

attraverso la parete cellulare, e l'argento genera danni. Le nanoparticelle bimetalliche consentono un doppio effetto, fungistatico e fungicida. L'effetto fungistatico è il risultato dell'inibizione della β -glucano sintasi, e di conseguenza della parete cellulare, mentre l'effetto fungicida è causato da cambiamenti nell'integrità della parete, che perde la sua resistenza meccanica, portando alla distruzione cellulare mediante variazioni della pressione osmotica.

1.5.3 Processo biologico antivirale

A differenza delle cellule, il virus è una particella molto più piccola dei batteri e non può sopravvivere autonomamente per lungo tempo nell'ambiente: per replicarsi e proliferare, deve infettare una cellula ospite di un altro organismo, che può essere un animale, una pianta o persino un batterio [56]. La struttura del virus è notevolmente più semplice rispetto a quella di un batterio. La particella virale è composta da materiale genetico (DNA o RNA) e da un involucro protettivo chiamato "capside", costituito principalmente da proteine e talvolta da lipidi. Una volta all'interno della cellula ospite, il virus utilizza le risorse cellulari per replicare il proprio materiale genetico e produrre nuove particelle virali. Questo processo di replicazione può portare alla rottura della cellula ospite, consentendo al virus di diffondersi e infettare altre cellule. Gli antibiotici non sono efficaci contro i virus perché utilizzano le vie metaboliche delle cellule ospiti per replicarsi. Questo rende difficile eliminare i virus senza danneggiare le cellule dell'ospite. Pertanto, la medicina si è concentrata sull'uso di vaccinazioni per prevenire le malattie virali, poiché stimolano il sistema immunitario dell'ospite a produrre una risposta immunitaria contro il virus [57].

I farmaci antivirali attualmente disponibili sono limitati e agiscono in modo selettivo su specifici virus, come quelli *herpes*, i virus delle *epatiti B o C* e l'*HIV* (Figura 32). I farmaci antivirali sono composti da analoghi composti nucleosidici che simulano i nucleotidi presenti nelle cellule ospiti. Questi farmaci ingannano il virus facendolo incorporare nei suoi materiali genetici, ma senza effettivamente funzionare correttamente, bloccando così la replicazione del virus e la produzione di nuove particelle virali all'interno della cellula infetta. Altri farmaci antivirali agiscono inibendo specifici enzimi utilizzati dal virus per assemblare nuove particelle virali e rilasciarle dalla cellula ospite, oppure bloccano l'integrazione del virus nel genoma cellulare [58].

Tuttavia, come avviene con gli antibiotici nei confronti dei batteri, anche per i farmaci antivirali si verifica il fenomeno della resistenza virale nel tempo, con lo sviluppo di ceppi virali capaci di sopravvivere e replicarsi nonostante l'azione del farmaco.

Non ci sono ancora composti a base di metalli che siano stati approvati come farmaci antivirali. Tuttavia, un composto di cobalto(III) bis(2-metil-imidazolo)-[bis(acetilacetone)(etilenediimina)]

ha superato con successo uno studio clinico di fase II per il trattamento dell'*Herpes simplex* labiale e uno studio di fase I per il trattamento di due infezioni virali oculari, la cheratite erpetica oftalmica e la congiuntivite da adenovirus [59]. Studi in vitro hanno dimostrato che l'attività di questo composto contro il virus dell'*herpes simplex* di tipo 1 (*HSV-1*) deriva dalla sua capacità di impedire all'*HSV-1* di entrare nelle cellule, inibendo i processi di fusione tra la membrana virale e la membrana cellulare. Questa azione potrebbe essere correlata al legame covalente dei complessi di Co(III)-(acac-en) con le istidine presenti nel dominio degli zinc-finger, impedendo alla proteina di legarsi alla sequenza di DNA tipicamente riconosciuta.

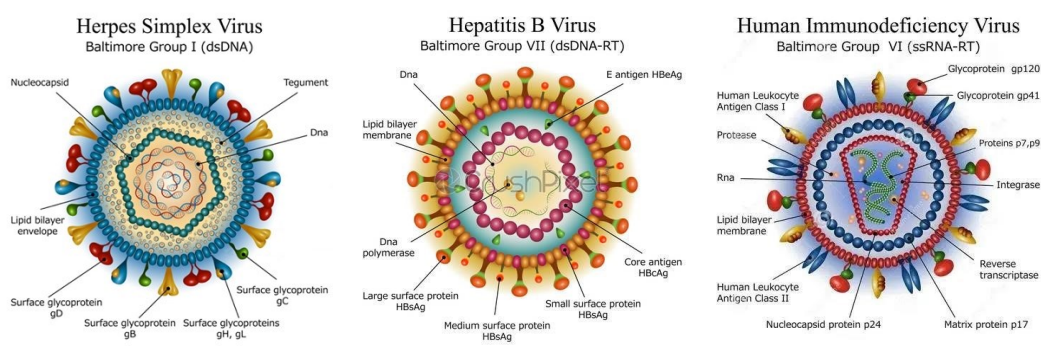


Figura 32: Immagini schematiche di virus molto diffusi.

Recentemente, sono stati studiati rivestimenti di fotocatalizzatori basati su semiconduttori come il TiO_2 sulle superfici per la loro azione antibatterica e antivirale. Questi rivestimenti sono stati valutati per la loro capacità di decomporre vari microrganismi come batteri, funghi e virus. La decomposizione dei microrganismi è principalmente dovuta alla capacità di assorbimento della luce del TiO_2 . L'efficacia del TiO_2 come agente antimicrobico dipende da diversi fattori, tra cui la dimensione e la forma delle nanoparticelle di TiO_2 , la loro stabilità, la riduzione della ricombinazione dei portatori di carica e l'assorbimento esteso nella regione visibile. Hajkova et al. [60] hanno riportato attività antibatterica (contro *E. coli*) e antivirale (contro il virus *HSV-1*) utilizzando un film di TiO_2 depositato mediante deposizione chimica da vapore su substrati di vetro. Il film di TiO_2 ha mostrato un'efficacia del 100% contro batteri e virus sotto illuminazione UV per 6 ore.

Inoltre, le nanoparticelle di argento (AgNPs) hanno dimostrato un notevole potenziale come agenti antivirali contro vari virus. Secondo un recente articolo di Sarkar [61], il possibile meccanismo antivirale delle AgNPs coinvolge il loro legame alle glicoproteine di superficie dei virus a RNA, che impedisce la fusione del virus con la cellula ospite. In un altro studio condotto da Dung et al. [62], le AgNPs hanno dimostrato efficacia contro il virus della *peste suina africana* (*ASFV*), con una significativa riduzione della contaminazione virale dopo

l'applicazione di AgNPs. Sharma et al. [63] hanno prodotto AgNPs da piante medicinali (*Andrographis paniculata*, *Phyllanthus niruri* e *Tinospora cordifolia*) tramite un metodo ecologico e ne hanno valutato le proprietà antivirali contro il virus *chikungunya*. I risultati del test MTT hanno mostrato che le AgNPs derivanti da *A. paniculata* hanno manifestato la maggiore capacità di inibizione dell'attività virale. Orłowski et al. [64] hanno preparato AgNPs modificate con acido tannico, le quali hanno mostrato attività antivirale contro l'infezione da virus dell'*herpes simplex* di tipo 2 (*HSV-2*). Utilizzando AgNPs di diverse dimensioni, 13, 33 e 46 nm, hanno rilevato una significativa riduzione dell'infettività di *HSV-2* sia *in vitro* che *in vivo*. Le AgNPs più piccole hanno stimolato la produzione di citochine e chemochine, importanti per la risposta antivirale, suggerendo che le AgNPs modificate con acido tannico possano essere promettenti come agenti antimicrobici per la cura delle infezioni da *herpesvirus*. E' difficile sviluppare superfici funzionalizzate per eliminare i virus, a causa soprattutto del continuo e rapido cambiamento che i virus stessi sono in grado di condurre.

In generale, l'azione virucida comprende diverse strategie come l'inibizione dell'ingresso virale grazie ad alcuni materiali funzionali che possono prevenire l'entrata del virus nelle cellule ospiti, impedendo la fusione delle membrane virali con quelle cellulari; altri materiali inducono l'inattivazione virale, cioè sono in grado di interferire coi processi vitali direttamente all'interno del virus, rendendolo incapace di replicarsi o infettare altre cellule; oppure il blocco dell'integrazione virale: alcune sostanze possono impedire il virus di integrarsi nel DNA dell'ospite, ostacolando così la sua capacità di replicarsi e diffondersi (Figura 33).

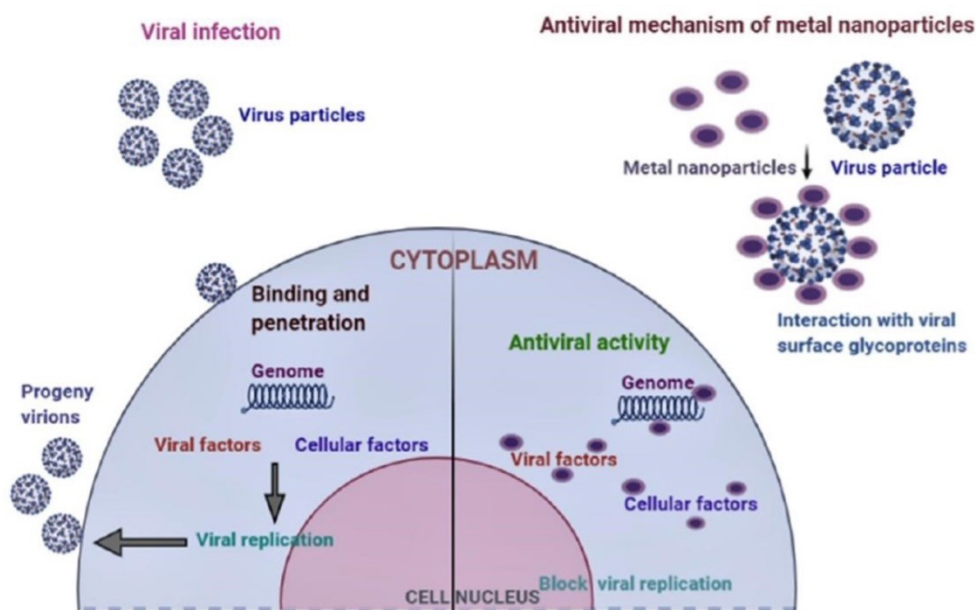


Figura 33: Differenti meccanismi di interazione tra nanoparticelle metalliche e virus.

CAP. 2 - SCOPO DELLA TESI

Il lavoro che si intende svolgere in questa tesi si inserisce in un progetto di ricerca che vede il Dipartimento di Ingegneria Industriale e INAIL impegnati nello studio di materiali polimerici utilizzati o da proporre in istituti nosocomiali (per affrontare il problema della diffusione di infezioni correlate all'assistenza-ICA) che mostrino attività antimicrobica, ma che abbiano anche proprietà meccaniche adatte all'uso.

Tra i materiali polimerici più diffusi per la realizzazione di superfici ci sono le resine epossidiche.

Allo scopo si prenderanno in considerazione due resine epossidiche commerciali di largo uso delle quali verranno studiate le proprietà antimicrobiche (sia antibatteriche che antivirali) e le proprietà meccaniche (eseguendo prove di trazione e di propagazione della cricca).

Poiché recentemente sono apparsi nella letteratura scientifica alcuni studi che hanno evidenziato come alcune argille abbiano attività antimicrobica, ed essendo noto che gli ioni ammonio hanno attività biocida, si prepareranno dei nanocompositi con una argilla commerciale modificata con ioni ammonio contenenti lunghe catene alifatiche atte a migliorare la compatibilità con una matrice polimerica nella realizzazione di nanocompositi (Cloisite 15A). Di tali nanocompositi verranno studiate le proprietà meccaniche e soprattutto le proprietà antimicrobiche, in vista della realizzazione di oggetti da porre in istituti nosocomiali per studiarne il comportamento in situazioni reali.

L'importanza di questo studio risiede da un lato nel tentativo di ridurre l'uso di disinfettanti che si è esponenzialmente esteso durante la recente pandemia con l'obiettivo di individuare nuovi materiali che ne possano limitare l'uso e dall'altro nella individuazione di nuovi agenti antimicrobici che possano superare la resistenza agli antibiotici sempre più diffusa a causa dell'adattamento cui i batteri vanno incontro.

La sfida nella ricerca di questi materiali consiste nell'individuare in particolare nuovi nanocompositi a base polimerica contenenti argille che siano in grado di inibire la crescita dei microrganismi, ma con buone proprietà meccaniche.

CAP. 3 - PARTE SPERIMENTALE

3.1 Preparazione resine epossidiche

3.1.1 Preparazione resina EC157

La preparazione dei campioni è stata effettuata mediante la miscelazione di soluzioni di prepolimero (DGEBA Elan-tech EC157, Figura 34) e ammine cicloalifatiche (Elan-tech W 152, Figura 35) in un rapporto in peso di 100:40. Tale soluzione è stata poi sottoposta a un ciclo di agitazione meccanica a temperatura ambiente per un periodo di 10 minuti. In seguito, al fine di eliminare l'aria intrappolata all'interno della miscela, il composto è stato degassificato per 20 minuti. Successivamente, il composto ottenuto è stato colato in stampi di silicone. Il procedimento è stato completato con un processo di polimerizzazione dei campioni per 48 ore a temperatura ambiente, seguito da un post-curing a 60°C per la durata di 6 ore.

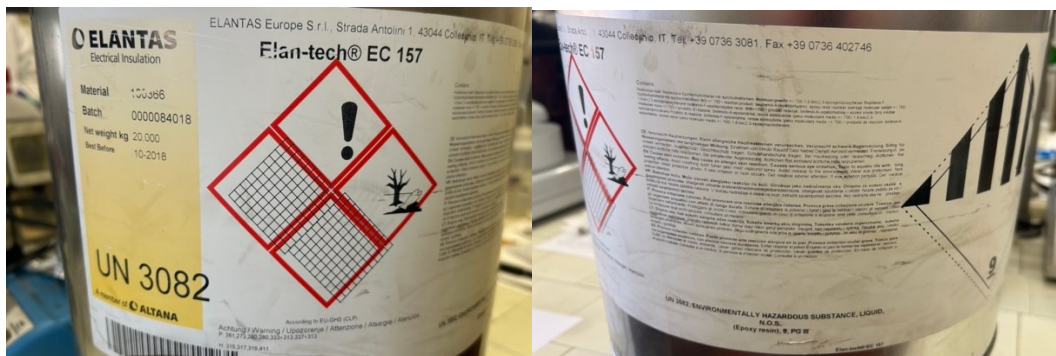


Figura 34: Recipiente del prepolimero.

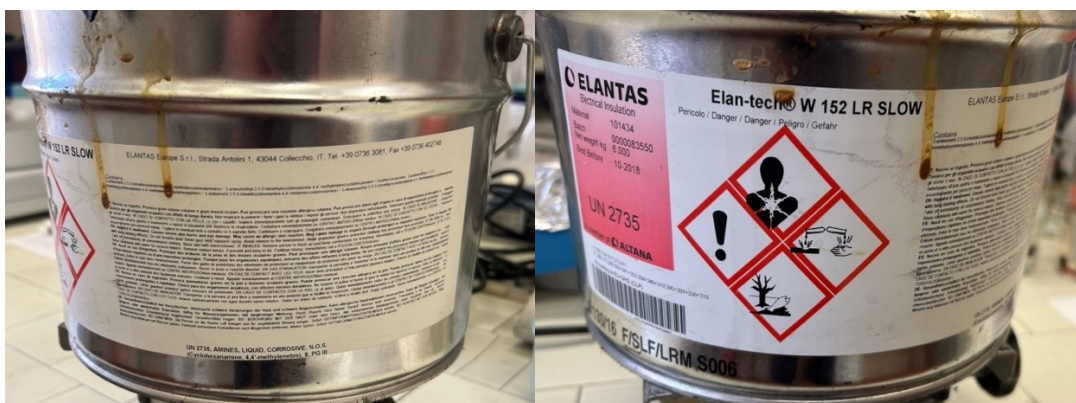


Figura 35: Recipiente dell'indurente.

3.1.2 Preparazione resina Epikote™ MGS

La preparazione dei campioni è stata effettuata mediante la miscelazione di soluzioni di prepolimero (Epikote™ Resin MGS, Figura 36) e ammine cicloalifatiche (Epikure RIMH, Figura 36) in un rapporto di 100:34. Tale soluzione è stata poi sottoposta a un ciclo di agitazione meccanica a temperatura ambiente per un periodo di 10 minuti. In seguito, al fine di eliminare l'aria intrappolata all'interno della miscela, il composto è stato degassificato per 20 minuti. Successivamente, il composto ottenuto è stato colato in stampi di silicone. Il procedimento è stato completato con un processo di polimerizzazione dei campioni per 48 ore a temperatura ambiente, seguito da un post-curing a 60°C per la durata di 6 ore.



Figura 36: Prepolimero (EPIKOTE RIMR 235) ed indurente per la resina (RIMH 235).

3.1.3 Preparazione nanocomposito EC157/Cloisite 15A

La sintesi dei nanocompositi è stata realizzata mediante la miscelazione di bisfenolo A diglicidil etere (DGEBA) con l'argilla, utilizzando un pallone di vetro come recipiente di reazione e assicurando una dispersione efficace attraverso agitazione meccanica per circa 60 minuti a circa 40°C fino al conseguimento di una distribuzione omogenea dell'argilla all'interno della matrice EC157. All'interno di questa matrice, sono state introdotte proporzioni variabili (1%, 3% e 5% in peso) di argilla Cloisite 15A, rispetto al peso totale della formulazione del nanocomposito. Successivamente, alla sospensione omogenea ottenuta è stata aggiunta una miscela di ammine cicloalifatiche, agendo in qualità di agente

indurente, sotto costante agitazione magnetica. Il rapporto di miscelazione dell'indurente, seguendo le specifiche fornite dal produttore dei precursori polimerici, è stato stabilito in un rapporto di 3:1 (EC157: ammine) in peso. Le quantità esatte utilizzate per le diverse formulazioni sono state di 120 grammi di EC157 e 40 grammi di indurente, a cui si sono aggiunti, rispettivamente, 1,6 grammi, 4,8 grammi e 8 grammi di argilla per le proporzioni del 1%, 3% e 5%. Dopo la completa miscelazione, la sospensione è stata sottoposta a degassaggio per 20 minuti per eliminare eventuali bolle d'aria intrappolate, incrementando così l'integrità strutturale del nanocomposito. Infine, il composto è stato colato in stampi di silicone. Il processo di indurimento del nanocomposito è stato innanzitutto condotto a temperatura ambiente per un periodo di 48 ore, per poi procedere con un ulteriore trattamento termico a 60°C per 6 ore, al fine di ottimizzare le proprietà meccaniche del materiale finale completando la polimerizzazione.

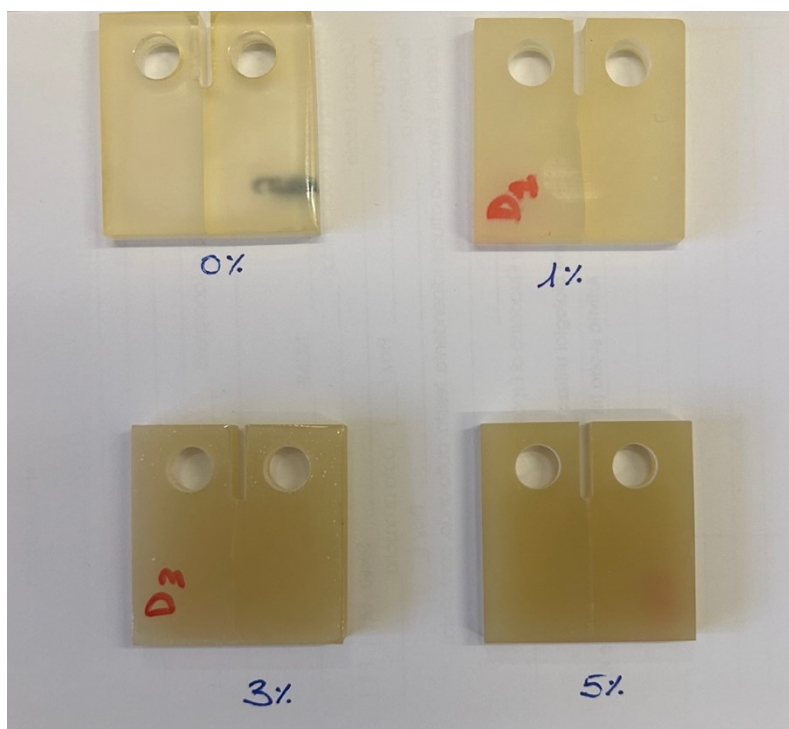


Figura 37: Provini CT del nanocomposito EC157/Cloisite 15A a differenti percentuali di argilla.

3.2 Tecniche di caratterizzazione

3.2.1 Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) è una tecnica analitica utilizzata per studiare le proprietà chimiche e molecolari dei materiali attraverso l'interazione con la radiazione infrarossa. Questa tecnica sfrutta il fatto che le molecole assorbono l'energia infrarossa a frequenze specifiche, causando variazioni nelle loro vibrazioni molecolari. Il principio di base della spettroscopia FT-IR coinvolge l'emissione di radiazione infrarossa da una sorgente, il passaggio attraverso il campione in esame e la misurazione della radiazione infrarossa trasmessa o assorbita. Questa radiazione è poi suddivisa in componenti a diverse frequenze tramite una trasformata di Fourier, che consente di ottenere uno spettro infrarosso dettagliato [65].

Nella spettroscopia FT-IR, un fascio di luce proveniente da una sorgente infrarossa viene diviso in due parti da un dispositivo chiamato partitore ottico o beamsplitter (Figura 37). Una metà del fascio viene riflesso da uno specchio fisso, mantenendo una traiettoria costante, mentre l'altra metà viene riflessa da uno specchio mobile a velocità costante, variando così la sua traiettoria nel tempo. I due fasci risultanti vengono quindi ricombinati dallo stesso partitore ottico: circa metà del fascio ritorna alla sorgente, mentre l'altra metà raggiunge un rivelatore, dopo essere passata attraverso un campione che assorbe la radiazione infrarossa. L'interazione del fascio di luce con il campione assorbente modifica la sua intensità e composizione spettrale, consentendo di ottenere informazioni sulle molecole presenti nel campione. Durante la ricombinazione dei due fasci nel partitore ottico, lo specchio mobile introduce una differenza di percorso tra i due fasci, creando una differenza di fase. Questa differenza di fase produce un modello di interferenza quando i due fasci si sovrappongono, generando un segnale che può essere misurato e analizzato per ottenere lo spettro infrarosso del campione. Il segnale analogico del fascio di luce, modificato dal campione e rilevato dal detector, viene convertito in un segnale digitale tramite un convertitore analogico-digitale (ADC). Questo segnale digitale viene quindi inviato a un computer dove viene elaborato utilizzando l'algoritmo della trasformata di Fourier: è un'operazione matematica che consente di convertire il segnale dal dominio del tempo, dove il segnale è rappresentato come una funzione delle variazioni temporali, al dominio delle frequenze, dove il segnale è rappresentato come una combinazione di componenti di frequenza. Questo processo consente di ottenere lo spettro infrarosso del campione, mostrando le frequenze specifiche delle vibrazioni molecolari che caratterizzano le sue componenti chimiche. Per ricostruire uno spettro IR completo, non è sufficiente un solo

ciclo di specchi in movimento, ma sono necessari diversi cicli per ottenere un interferogramma completo. Tuttavia, l'uso dell'algoritmo della trasformata di Fourier veloce consente di elaborare rapidamente l'interferogramma e ottenere lo spettro IR del campione. L'algoritmo calcola l'interferogramma, che rappresenta lo spettro del campione in funzione del ritardo tra i due fasci nell'interferometro. Vengono eseguiti poi degli scanner aggiuntivi per acquisire ulteriori interferogrammi, al fine di migliorare la qualità dello spettro infrarosso. Infine, viene calcolato l'interferogramma medio, ottenuto dalla combinazione di tutti gli interferogrammi acquisiti, per produrre uno spettro infrarosso finale più accurato.

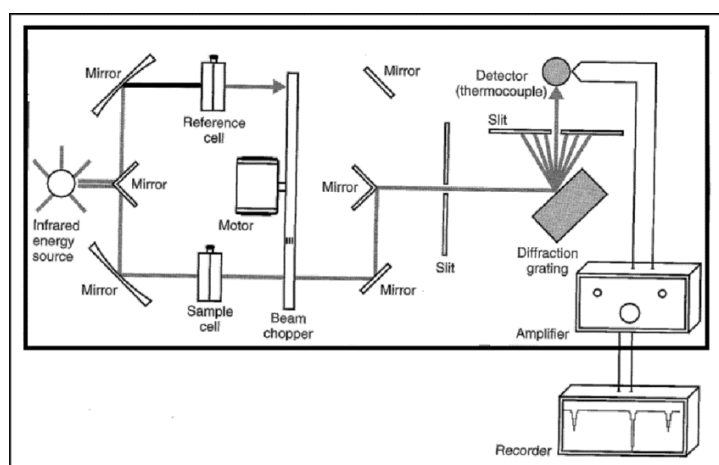


Figura 38: Schema a blocchi di uno spettrofotometro FTIR.

L'analisi degli spettri IR fornisce informazioni dettagliate sulle molecole presenti nel campione, permettendo di identificare i gruppi funzionali e i legami molecolari presenti. Quando le molecole del campione vengono esposte alla radiazione infrarossa, esse assorbono selettivamente le radiazioni di lunghezze d'onda specifiche che causano un cambiamento nel momento di dipolo delle molecole. Questo porta a un trasferimento di energia vibrazionale dalle molecole nello stato fondamentale a quelle nello stato eccitato.

Nella regione del medio infrarosso ($4.000-1.000\text{ cm}^{-1}$), si osservano principalmente due tipi di vibrazioni: le vibrazioni lungo i legami chimici, chiamate vibrazioni di stiramento, che coinvolgono cambiamenti nella lunghezza del legame; e le vibrazioni che coinvolgono cambiamenti negli angoli di legame, in particolare le vibrazioni di piegamento.

Le vibrazioni di stiramento (*stretching*) possono essere modellate utilizzando il modello dell'oscillatore armonico, in cui un legame chimico è rappresentato da due masse puntiformi collegate da una molla (Figura 38). La forza del legame (o campo di forze molecolari) è la

tensione della molla k e le masse puntiformi (m_1 e m_2) rappresentano le masse degli atomi o dei gruppi chimici coinvolti nel legame.

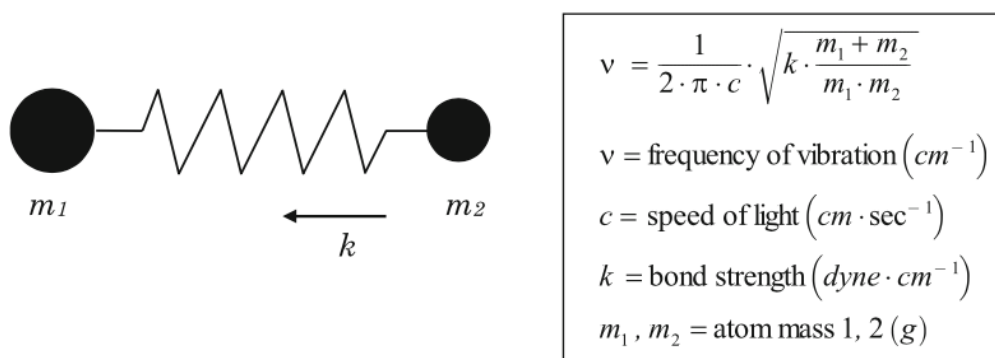


Figura 39: Modello dell'oscillatore armonico e relazione per tra la forza del legame e la frequenza di vibrazione

Quando i due fasci riflessi dagli specchi si ricombinano, hanno percorso distanze diverse e quindi la ricombinazione porta a interferenze costruttive e distruttive. Il modello risultante è chiamato interferogramma. Quello che viene registrato dal rivelatore dopo che il fascio ricombinato ha attraversato il campione è la trasformata di Fourier dello spettro IR del campione. I dati registrati dall'apparecchiatura vengono quindi elaborati da un computer che esegue una trasformata di Fourier aggiuntiva per retrotrasformare l'interferogramma in uno spettro IR. Sull'asse delle ascisse è rappresentato il numero d'onda del fotone infrarosso incidente sul campione, mentre sull'asse delle ordinate è rappresentata l'assorbanza o la trasmittanza. I parametri che caratterizzano la banda di assorbimento sono l'intensità (che indica l'altezza del picco di assorbimento), la posizione e la forma (acuta o ampia) della banda. La frequenza del picco di assorbimento è determinata dal gap di energia vibrazionale tra i due stati. Il numero di picchi di assorbimento è correlato al numero di modi di vibrazione molecolare. L'intensità dei picchi di assorbimento dipende dalla variazione del momento di dipolo e dalla probabilità di transizione dei livelli di energia. Le frequenze di vibrazione di un dato gruppo chimico sono previste in regioni specifiche che dipendono dal tipo di atomi coinvolti e dal tipo di legami chimici.

Normalmente nello spettro FT-IR si possono identificare quattro diversi tipi di regioni corrispondenti a diversi tipi di legami (Figura 40):

- nella prima regione sono presenti le bande di assorbimento dei legami singoli (intervallo tra 4000 e 2500 cm^{-1});
- nella seconda regione, sono presenti le bande di assorbimento dei legami tripli (intervallo tra 2500 e 2000 cm^{-1});

- nella terza regione, sono presenti le bande di assorbimento dei legami doppi (intervallo tra 2000 e 1500 cm^{-1});
- quarta regione, detta “fingerprint region”, è compresa tra 1500 e 650 cm^{-1} . Essa rappresenta uno schema complesso di vibrazioni che descrive l’energia vibrazionale della molecola nel suo complesso e può essere usata per la sua identificazione poiché è diversa per ogni composto.

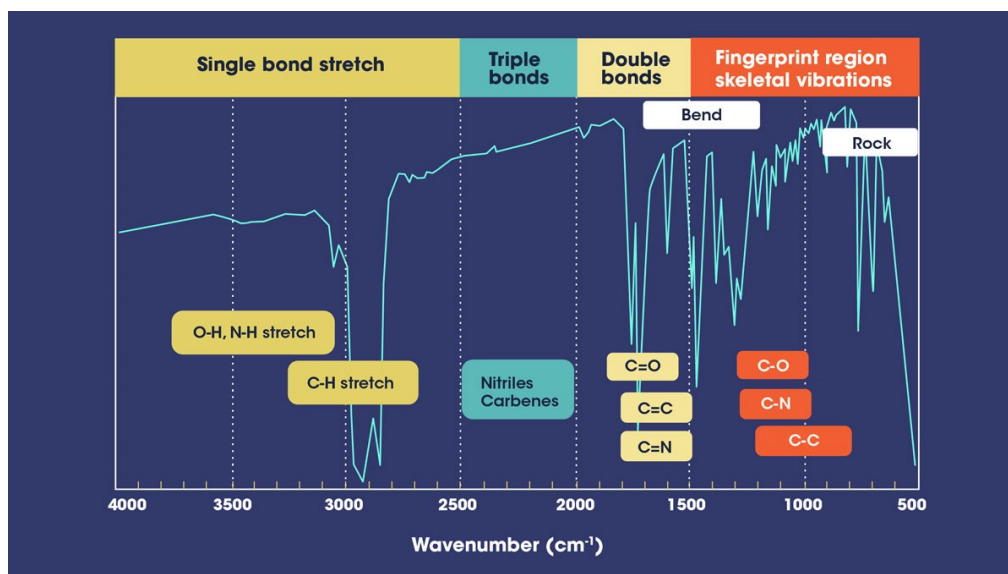


Figura 40: Esempio di spettro FTIR.

Negli strumenti FTIR viene utilizzato un laser per controllare la velocità dello specchio mobile. Questo laser viene anche utilizzato come riferimento per la calibrazione della lunghezza d'onda che rende superfluo l'uso di standard di calibrazione esterni.

Un'alternativa alla spettroscopia di trasmissione è l'uso della riflettanza totale attenuata (ATR). Per l'ATR, il fascio IR viene fatto passare attraverso un cristallo di un materiale con un alto indice di rifrazione (alta densità ottica) ad un angolo maggiore del cosiddetto angolo critico che porta alla riflessione totale interna del fascio sulla superficie del cristallo che è a contatto con il campione. Spesso questo materiale è diamante, ZnSe o Ge. Questa riflessione provoca un'onda evanescente che si estende oltre i confini del cristallo e penetra nel campione con una profondità tipicamente nell'intervallo da 0,5 a 5 mm. La radiazione IR che viene assorbita dal campione provoca l'attenuazione dell'onda evanescente riflessa. Dopo una o più riflessioni nel cristallo, il fascio IR lascia il cristallo e viene registrato dal rivelatore. La combinazione di ATR con FT-IR porta a strumenti che utilizzano la riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR) consentendo una migliore riproducibilità da campione a campione e una minore variazione spettrale da utente a utente (Figura 41).

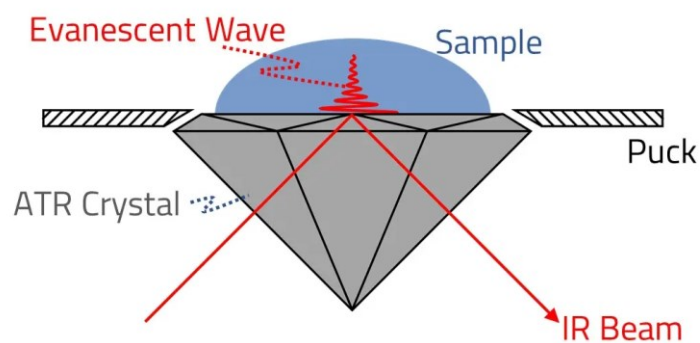


Figura 41: Schema del funzionamento della tecnica ATR.



Figura 42: Strumento ATR.

3.2.2 Diffrazione a raggi-X (XRD)

La diffrazione a raggi X è una tecnica di analisi utilizzata per studiare la struttura cristallina dei materiali. Questa tecnica sfrutta la capacità dei raggi X (lunghezza d'onda compresi tra 0.1 e 100 Å) di interagire con gli atomi presenti nei cristalli, producendo un modello dettagliato della disposizione atomica all'interno di un cristallo.

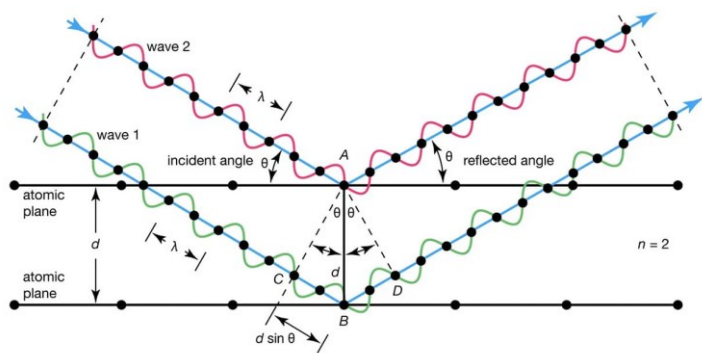
Il campione da analizzare viene preparato in forma cristallina e montato sulla superficie di un supporto. I raggi X vengono inviati sul campione in modo controllato utilizzando un generatore di raggi X (Figura 45). Gli atomi presenti nel campione interagiscono con i raggi X, generando il fenomeno di diffrazione [66]. Il fenomeno della diffrazione prevede lo scattering dei raggi-X

da parte degli atomi di un cristallo: gli elettroni ad alta velocità trasferiscono energia agli elettroni degli atomi bersaglio. Questo trasferimento provoca un aumento dei livelli energetici negli atomi coinvolti. D'altra parte, gli elettroni del fascio di raggi X, dopo aver interagito con gli atomi del cristallo, passano da uno stato energetico superiore ad uno stato energetico inferiore. Questo cambiamento di energia degli elettroni del fascio comporta l'emissione di un quanto di energia sotto forma di fotone a raggi X. La lunghezza d'onda dei fotoni a raggi X emessi dipende dalla differenza energetica dei due livelli coinvolti nella transizione. Quando un fascio di raggi X con lunghezza d'onda (λ) colpisce un cristallo, parte dei raggi penetra all'interno del cristallo e viene diffratta dai piani atomici successivi. Ad una certa distanza interplanare (d), esiste un angolo critico (θ) per cui i raggi diffratti dai piani atomici sono in fase mentre lasciano il cristallo. L'angolo tra la normale al fronte d'onda emergente e i piani atomici è uguale all'angolo tra la normale al fronte d'onda primario e i piani atomici. Il massimo di diffrazione è generato dalla diffrazione di una successione di piani reticolari equidistanti e possiede un'intensità sufficiente per essere registrato da un sensore.

La diffrazione dei raggi X segue la legge di Bragg, che stabilisce che la diffrazione avviene quando la differenza di cammino ottico tra i raggi X riflessi da piani cristallini adiacenti è un multiplo intero (n) della lunghezza d'onda dei raggi X. Questa legge è espressa dall'equazione:

$$\text{Legge di Bragg : } n\lambda = 2d \sin\theta$$

dove λ è la lunghezza d'onda dei raggi X, d è la distanza interplanare tra i piani cristallini, θ è l'angolo di incidenza dei raggi X e n è un numero intero che rappresenta l'ordine della diffrazione. I raggi X diffusi dal campione vengono raccolti da un rivelatore, che misura l'intensità e l'angolo di diffrazione dei raggi X (Figura 43).



© Encyclopædia Britannica, Inc.

Figura 43: Rappresentazione grafica della Legge di Bragg.

(interferenza costruttiva: i raggi riflessi sono in fase).

I dati raccolti vengono elaborati per determinare la disposizione atomica all'interno del cristallo. Questa analisi può essere effettuata utilizzando tecniche matematiche e software specializzati. Poiché ogni minerale ha una diversa distanza tra i piani cristallini, l'angolo nel quale si verifica la diffrazione può essere usato per distinguere quel particolare minerale (Figura 44).

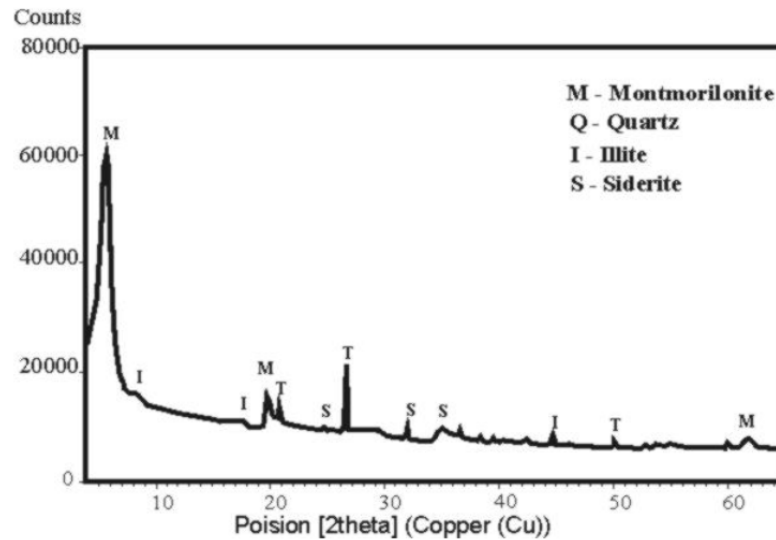


Figura 44: Esempio di spettro XRD di una bentonite.



Figura 45: Strumento per analisi XRD.

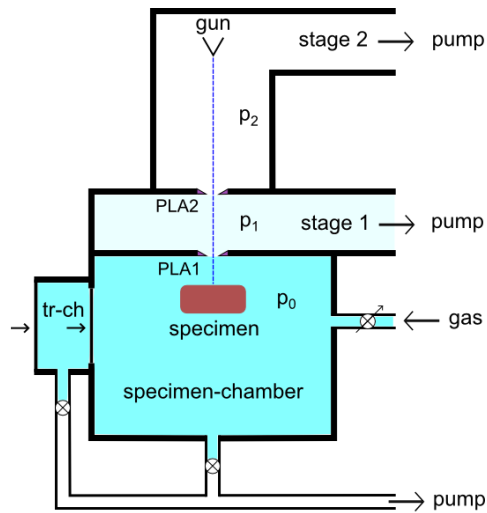
3.2.3 Microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM ed XRF)

La Microscopia Elettronica a Scansione Ambientale (ESEM) è una tecnica avanzata di microscopia elettronica che consente l'osservazione morfologica e topografica di campioni in un ambiente umido o gassoso, senza la necessità di preparazioni complesse come la criofrattura o il desiccamento del campione o la ricopertura con materiale conduttivo (oro o grafite). Questa tecnica è estremamente utile per l'analisi di campioni biologici, materiali sensibili all'umidità e campioni in condizioni ambientali particolari.

L'ESEM utilizza un fascio di elettroni per generare immagini ad alta risoluzione del campione. Tuttavia, a differenza della microscopia elettronica convenzionale (SEM), l'ESEM permette anche l'osservazione dei campioni in un ambiente controllato, mantenendo una pressione e una composizione di gas specifiche all'interno della camera di osservazione.

Il funzionamento dell'ESEM si basa sull'uso di una camera ambientale che circonda il campione. Questa camera è dotata di una finestra sottile che permette al fascio di elettroni di penetrare e interagire con il campione, mentre mantiene l'ambiente interno isolato dall'ambiente esterno.

L'ESEM si contraddistingue per una camera in cui sono inseriti i campioni, gassosa a pressione relativamente alta, solitamente vapore acqueo, ed una regione di ottica elettronica ad alto vuoto connessa alla prima regione per permettere il trasferimento del fascio di elettroni. Le due regioni sono separate da una cavità intermedia. I tre ambienti sono collegati da due aperture sufficientemente piccole da garantire le cadute di pressione tra le diverse regioni. La prima apertura separa la regione ad alto vuoto del cannone elettronico da una cavità intermedia. La regione ad alto vuoto viene utilizzata per la generazione e la focalizzazione del fascio di elettroni. La seconda apertura separa la cavità intermedia dalla camera dei campioni ad alta pressione. La perdita di gas dalla camera dei campioni attraverso l'apertura della cavità intermedia è ripristinata da un sistema di pompaggio. Analogamente, un altro sistema di pompaggio rimuove la presenza di gas nella regione di alto vuoto dell'ottica elettronica, per mantenere il vuoto richiesto [67]. (Figura 46)



Basic ESEM gas pressure stages

Figura 46: Rappresentazione schematica di un ESEM.

Nel SEM convenzionale una carica negativa viene accumulata sulla superficie del campione mentre il fascio di elettroni incide su di esso. L'accumulo di carica tende a deflettere il fascio dal punto di scansione provocando degli artefatti di carica che disturbano le immagini e l'analisi elementare. Questo problema viene superato rivestendo i campioni con un sottile strato di oro, grafite, platino, ecc... prima dell'analisi elementare. Invece nell'ESEM il gas usato è elettricamente conduttivo grazie alla ionizzazione: gli ioni caricati positivamente generati dall'interazione del fascio con il gas circostante aiutano a neutralizzare l'accumulo di cariche formatosi sul provino. Grazie a questa tecnica il rivestimento dei campioni, che potrebbe portare ad un'analisi superficiale errata, non risulta più necessario. All'interno della camera del campione, è presente un sistema di controllo della pressione e della composizione del gas, che consente di regolare l'atmosfera intorno al campione.

Durante l'acquisizione delle immagini, il fascio di elettroni viene focalizzato sul campione, utilizzando delle lenti elettromagnetiche per direzionare il fascio, e scandisce la superficie mediante uno schema a "raster" (la griglia ortogonale di punti che costituisce un'immagine). Gli elettroni interagiscono con il campione, producendo segnali primari come elettroni retrodiffusi (Backscattered Electrons, BSE), che vanno incontro a molteplici collisioni e ritornano nella direzione da cui sono arrivati, ed elettroni secondari (Secondary Electrons, SE), generati come prodotto della ionizzazione (Figura 47). Questi segnali vengono rilevati da appositi rilevatori e convertiti in immagini ad alta risoluzione del campione. Il fascio primario di elettroni è molto energetico e penetra il vapore acqueo con poco scattering apparente, scandendo la superficie del campione. Gli elettroni secondari vengono rilasciati dalla superficie del campione, come avviene normalmente nell' ESEM, ma incontrano le molecole di vapore

acqueo una volta usciti dalla superficie. Le molecole di vapore acqueo, quando colpite dagli elettroni secondari, producono essi stessi elettroni secondari, che a loro volta producono elettroni secondari dalle molecole di vapore acqueo adiacenti. Quindi il vapore acqueo ha una duplice funzione: lavora da amplificatore a cascata, amplificando il segnale originale degli elettroni secondari provenienti dal campione, oltre a neutralizzare l'accumulo di cariche negative superficiale del campione. Il segnale amplificato degli elettroni secondari viene raccolto da un GSED ("Gaseous Secondary Electron Detector"), con la sua carica positiva locale di 300-550 V. Il foro al centro del GSED funge da apertura finale attraverso cui passa il fascio primario di elettroni e la dimensione del foro determina quanto scarsa può essere la pressione nella camera del campione. Se il GSED ha un foro da 500 micron, si può aumentare la pressione nella camera fino a 10 Torr.

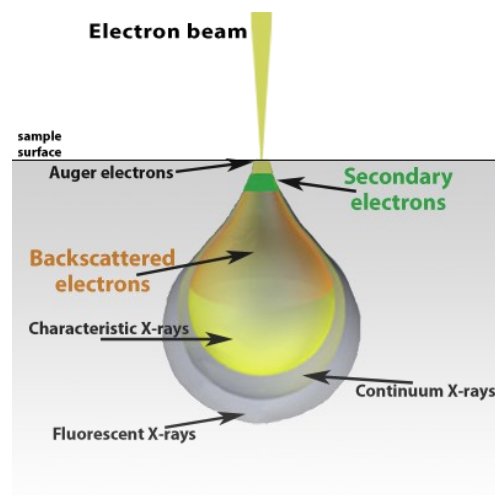


Figura 47: Effetto dell'interazione degli elettroni in un microscopio elettronico con la materia.

Le principali caratteristiche e vantaggi dell'ESEM includono la possibilità di osservare campioni in condizioni di umidità elevata, la possibilità di analizzare campioni sensibili all'umidità senza la necessità di trattamenti speciali e la capacità di eseguire analisi in situ su campioni in condizioni ambientali specifiche. Il vantaggio nell'utilizzare l'ESEM in modalità umida è che non è necessario rendere i campioni conduttivi se non lo sono. I campioni di materiale non devono essere disseccati e rivestiti, e quindi le loro caratteristiche originali possono essere conservate per ulteriori test o manipolazioni. Lo sviluppo di questo strumento significa che intere nuove classi di materiali possono essere analizzate nel loro stato naturale. Vari gas come protossido d'azoto, biossido di carbonio, elio, argon, azoto e vapore acqueo possono essere introdotti nella camera del campione tramite una pompa a vuoto dedicata separata che può controllare la pressione della camera con grande precisione. Il vapore acqueo

è il gas più comune utilizzato nell'ESEM sia per la sua efficienza amplificatrice che per le utili proprietà termodinamiche.

Durante l'imaging è importante garantire che non si verifichino né evaporazione né condensazione dell'acqua. Questo obiettivo viene raggiunto utilizzando un'atmosfera alla pressione di vapore saturata (SVP) dell'acqua. Tuttavia, ciò comporta una difficoltà aggiuntiva nell'imaging di campioni a temperatura ambiente, poiché la SVP dell'acqua è relativamente alta a questa temperatura rispetto alle pressioni modeste di alcuni Torr che sono accettabili nella camera del campione. Si può superare questo problema utilizzando un sistema di celle Peltier per abbassare la temperatura a 3-5°C in modo che la SVP sia facilmente mantenuta senza una perdita eccessiva di qualità e risoluzione dell'immagine. L'ESEM permette quindi di controllare la percentuale di umidità presente nella camera dei campioni, regolando opportunamente i valori di pressione e temperatura.

L'ESEM utilizzato per la caratterizzazione dei campioni di questa tesi è integrato con un sistema XRF (Figura 48), consentendo l'analisi combinata della morfologia superficiale del campione mediante microscopia elettronica e la sua composizione elementare tramite fluorescenza a raggi X.



Figura 48: Strumento ESEM.

La tecnica XRF coinvolge l'eccitazione degli atomi del campione con raggi X ad alta energia, seguita dall'analisi della fluorescenza dei raggi X emessi dagli atomi eccitati. Ogni elemento nel campione emette raggi X a energie specifiche, consentendo l'identificazione e la quantificazione degli elementi presenti [68].

3.2.4 Risonanza Magnetica Nucleare (FT-NMR)

La Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), o Nuclear Magnetic Resonance, è una tecnica di rilevamento utilizzata principalmente in chimica, biochimica e fisica per studiare la struttura e le dinamiche molecolari degli atomi di nuclei magnetici, come idrogeno, carbonio, fosforo e azoto. Si basa sull'analisi del comportamento degli spin dei nuclei in presenza di un forte campo magnetico. Nella spettroscopia NMR, in presenza di un campo magnetico esterno stazionario e di un campo magnetico variabile, nel campione si determina l'assorbimento di ben precise radiofrequenze da parte di alcuni specifici nuclei. L'energia assorbita promuove una transizione di spin dei nuclei, che viene poi riemessa, rilevata e riportata su uno spettro NMR.

Tra le diverse utilità di questa tecnica, è possibile determinare la struttura molecolare: la NMR, infatti, fornisce informazioni sulla struttura tridimensionale delle molecole, incluso l'ambiente chimico di ciascun atomo. Inoltre, può essere utilizzata per determinare la composizione e la struttura di molecole organiche e inorganiche, inclusi farmaci, polimeri, materiali, metaboliti, ecc. L'NMR è utile anche per lo studio delle dinamiche molecolari, ovvero si possono ricavare informazioni sul movimento molecolare, incluso lo studio di legami chimici, rotazioni e conformazioni molecolari.

La presenza di un magnete, o sorgente radiofrequenza (RF), genera un forte campo magnetico, essenziale per l'allineamento dei nuclei atomici. L'interazione del campo magnetico con gli atomi di nuclei magnetici del campione posto in esame, come l'idrogeno (protoni) o il carbonio-13, i quali hanno uno spin nucleare preciso, genera un momento magnetico intrinseco. Se il campione viene irradiato con una radiazione elettromagnetica di frequenza uguale alla frequenza di Larmor [69], si ha un'interazione della componente magnetica della radiazione con i momenti magnetici nucleari (anche questi oscillanti alla frequenza di Larmor). Quando questi nuclei vengono posti in un campo magnetico esterno, essi si allineano con o contro la direzione del campo, risultando in due stati di energia differenti. Alcuni nuclei, quando vengono posti in un campo magnetico esterno, assumono uno dei due stati: parallelo, noto come allineato con lo spin; o antiparallelo, noto come opposto allo spin. Se tali nuclei assorbono un'energia sufficiente, possono passare dallo stato parallelo a quello antiparallelo. Questa energia è chiamata frequenza di risonanza magnetica ed è l'energia necessaria a un nucleo per passare dallo stato parallelo a quello antiparallelo in un campo magnetico esterno. Applicando una radiazione elettromagnetica a una frequenza specifica, si possono indurre transizioni tra questi due stati di energia. Quando la frequenza della radiazione corrisponde alla differenza di energia tra gli stati, avviene l'assorbimento di energia e i nuclei passano ad uno stato eccitato.

Rilasciando energia, i nuclei ritornano allo stato di equilibrio emettendo un segnale rilevabile. Il segnale viene rilevato tramite una bobina di rilevamento, che cattura il segnale emesso dai nuclei quando ritornano allo stato di equilibrio. Il sistema di rivelazione e acquisizione dati converte il segnale rilevato in un formato digitale e lo elabora per produrre uno spettro NMR. Nella NMR classica, i segnali NMR vengono acquisiti uno alla volta, variando il campo magnetico applicato per ottenere segnali da diverse frequenze di risonanza. Nella FT-NMR, invece, tutti i segnali NMR vengono acquisiti contemporaneamente, in un singolo esperimento. Dopo l'acquisizione dei segnali, viene applicata la trasformata di Fourier per convertire i dati temporali (dominio del tempo) in uno spettro di frequenza (dominio della frequenza), come accennato per l'FT-IR. Questo consente di separare e analizzare i contributi di ciascun nucleo magnetico presenti nel campione. (Figura 49)

The Pulse FT NMR Experiment

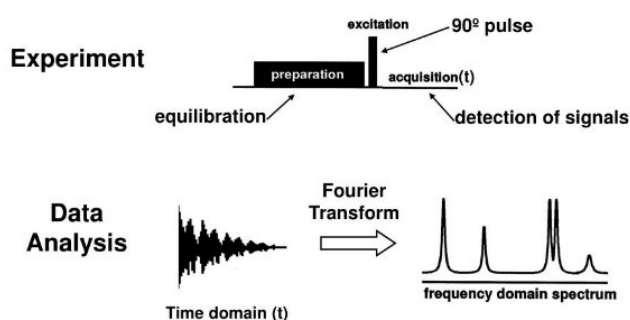


Figura 49: Rappresentazione schematica di un esperimento FT NMR.

Il rivelatore produce uno spettro che mostra l'energia assorbita rispetto a una proprietà chiamata chemical shift, una proprietà legata alla frequenza di risonanza magnetica. Il chemical shift si misura in parti per milione, o ppm. L'intorno chimico di un atomo è costituito da diversi gruppi chimici ad esso legati. Nuclei identici dello stesso elemento possono avere frequenze di risonanza magnetica e valori di spostamento chimico (chemical shift) diversi se sono legati a gruppi diversi, perché si trovano in ambienti diversi. Questo è il concetto fondamentale alla base della spettroscopia NMR. La spettroscopia NMR produce dei grafici chiamati spettri, che riportano l'energia assorbita dal campione in funzione del chemical shift. I grafici mostrano una

serie di picchi diversi. I nuclei di atomi identici producono picchi con valori di chemical shift diversi a seconda degli altri atomi o gruppi di atomi ad essi legati. Infatti, se lo spettro presenta due picchi chiari, il campione deve contenere nuclei in due diversi ambienti chimici. È quindi possibile confrontare il valore dello spostamento chimico (chemical shift) dei picchi con i valori riportati in un database, indicando in quale tipo di ambiente si trovano i nuclei e i diversi gruppi funzionali ad essi collegati. Nello spettro del protone il picco a 0 ppm è dato dal tetrametilsilano (TMS), una molecola di riferimento, comunemente usata come standard di riferimento nella spettroscopia ^1H NMR.

Non tutti i nuclei possono essere utilizzati nella spettroscopia NMR. La maggior parte non è influenzata da un campo magnetico esterno e non può essere quindi rilevata con questa tecnica analitica. I nuclei che producono risultati nella spettroscopia NMR sono i nuclei di ^{13}C ; ^1H , ^{19}F e ^{31}P (Figura 50).



Figura 50: Magnete dello strumento NMR.

3.3 Strumentazione per le prove meccaniche

3.3.1 Prove di trazione monoassiale

Le prove di trazione sono state eseguite utilizzando provini con geometria a forma di osso di cane ("dog-bone", DB) come mostrato nella Figura 51.



Figura 51: Provini DB delle resine EC157 e Epikote™ MGS prima e dopo la prova.

I test sono stati condotti mediante l'uso di una macchina servo-idraulica MTS809 equipaggiata con una cella di carico da 2,5 kN, operando a una velocità trasversale di 2 mm/min e con l'utilizzo di un estensimetro MTS 632.29F-30 (Figura 52). Le dimensioni dei provini sono state selezionate in conformità con la normativa ISO 527-2: "Plastics - Determination of tensile properties. Part 2: Test conditions for moulding and extrusion plastics" [70]. Sono stati testati almeno cinque provini per ogni tipo di materiale, al fine di ottenere risultati statistici rappresentativi. Dalle prove di trazione sono state ricavate informazioni riguardanti la tensione di rottura (σ_R), il modulo elastico (E) e la deformazione a rottura (ϵ_R). In tutti i test eseguiti, la rottura è avvenuta nella lunghezza di calibrazione del campione.



Figura 52: Macchina servo-idraulica MTS809 equipaggiata con una cella di carico da 2,5 kN.

3.3.2 Prova di propagazione della cricca (CT)

I test di propagazione della cricca sono stati condotti su campioni a tensione compatta (CT) conformi alle specifiche dell'ASTM D5045-14 [71] per quanto riguarda geometria e dimensioni. Il termine "compact tension" (CT) si riferisce a provini utilizzati comunemente nei test di meccanica della frattura, caratterizzati da una geometria specifica che include una crepa centrale (Figura 53). Il provino CT è costituito da una lastra rettangolare con una crepa centrale che attraversa completamente lo spessore del materiale, solitamente lavorata con precisione. Durante il test, il provino CT è sottoposto a un carico di trazione, causando la propagazione della cricca, utilizzando la medesima macchina servo-idraulica delle prove con i DB, con due supporti e un naso di carico. La tacca serve a creare una concentrazione di stress, facilitando la propagazione della cricca.



Figura 53: Provini CT delle resine EC157 e Epikote MGS prima e dopo la prova.

Per ciascun tipo di materiale, sono stati testati cinque campioni. I risultati sperimentali sono stati analizzati e per ogni test è stato calcolato il valore del fattore di intensità di stress (KIC) utilizzando la lunghezza della crepa e il carico di frattura, seguendo le linee guida dell'ASTM D5045-14. La KIC è il valore critico in cui avviene la propagazione della crepa, utilizzato per quantificare la resistenza del materiale alla frattura. Il fattore di intensità dello stress critico (KIC) viene determinato in base al carico al quale la crepa inizia a propagarsi e alla geometria del provino (Figura 54).



Figura 54: Provino CT posizionato con due supporti per la prova di frattura.

3.4 Prove antimicrobiche

3.4.1 Saggio sulle proprietà antibatteriche

L'analisi dell'attività antibatterica delle resine epossidiche e dei nanocompositi, incorporanti resina epossidica e argilla Cloisite 15A, è stata condotta mediante la quantificazione della resistenza delle cellule batteriche, espressa in Unità Formanti Colonia per centimetro quadrato (CFU/cm²), seguendo le linee guida stabilite dalla normativa ISO 22196:2011, denominata "Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces" [72].

Gli esperimenti in vitro sono stati eseguiti utilizzando provini con un'area superficiale definita di 2.5x2.5 e 2x2 cm². (Figura 55)

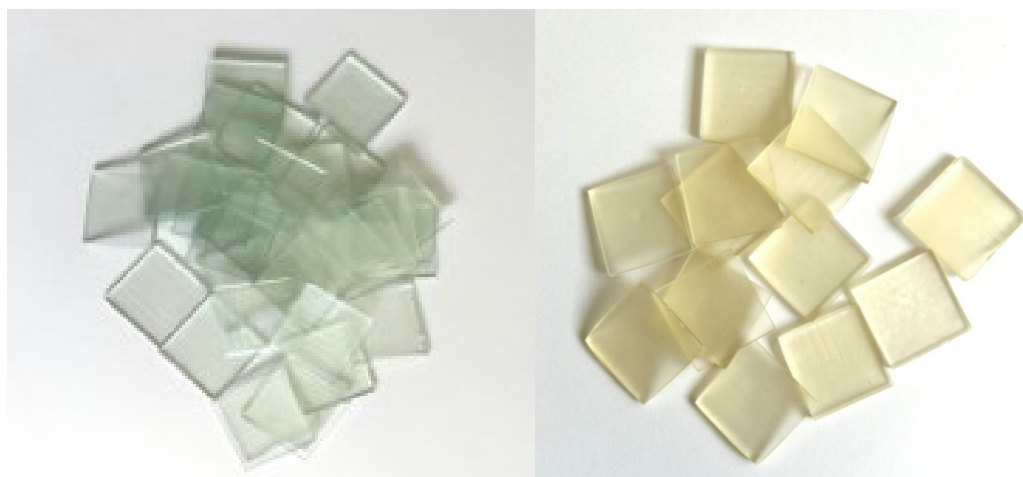


Figura 55: Provini usati per le prove antibatteriche.

L'indagine ha incluso l'uso di ceppi batterici rappresentativi di batteri Gram-negativi, nello specifico *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC® 8739), e di Gram-positivi, ovvero *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC® 6538P). L'efficacia antibatterica dei nanocompositi è stata valutata comparando la sopravvivenza batterica a contatto sia con le resine epossidiche non modificate, con il polipropilene, utilizzato come controllo, rispetto ai nanocompositi contenenti l'argilla Cloisite 15A. A questo fine, ciascun campione è stato sterilizzato mediante irraggiamento con raggi UV e posto su piastre separate prima dell'immersione in un brodo di cultura batterica, con una densità di inoculo compresa tra 10^5 e 10^8 cellule/mL. L'incubazione è stata effettuata per 24 ore a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in una camera a umidità relativa superiore al 90%. Successivamente, la soluzione contenente i batteri è stata sottoposta a diluizioni successive per l'estrazione, e le diluizioni ottenute sono state seminate su piastre di Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd.). Tale processo di semina è stato replicato in triplo per ogni diluizione. Le piastre inoculate sono state poi incubate a 35°C per ulteriori 24 ore. I dati risultanti dall'analisi dell'attività antibatterica sono stati espressi in CFU/cm² e confrontati con i valori rilevati per i campioni di controllo.

In questo progetto di tesi, la valutazione dell'efficacia antibatterica dei materiali è stata eseguita anche seguendo un metodo innovativo, in grado di simulare più fedelmente le condizioni ambientali di crescita batterica, e dunque di fornire un'analisi più efficace. Di seguito sono descritte le differenze chiave tra la normativa ISO 22196 e questa nuova metodologia (Figura 56):

- **Concentrazione dell'inoculo:** Entrambe le metodologie impiegano una concentrazione ottimale dell'inoculo che varia da $2,5 \times 10^5$ a 1×10^6 (CFU/ml), mantenendo quindi una carica batterica comparabile per la valutazione dell'efficacia antibatterica.
- **Dimensioni del coupon:** La normativa ISO 22196 utilizza coupon di dimensioni di 5x5 cm, mentre il nuovo metodo riduce la dimensione a 2.5x2.5 cm. Questa variazione

potrebbe avere un impatto sulla superficie disponibile per l'interazione tra batteri e materiale e potrebbe influenzare l'esito dei test.

- **Volume dell'Inoculo per superficie del coupon:** La normativa ISO 22196 prevede l'utilizzo di un volume di inoculo di 0,4 ml/16 cm², in netto contrasto con il nuovo metodo che prevede un volume significativamente inferiore di 0,02 ml/1cm², suggerendo un approccio più concentrato che potrebbe rivelarsi più sensibile nel rilevare l'attività antibatterica.
- **Condizioni Ambientali:** La normativa ISO 22196 richiede condizioni di incubazione a 36°C con un'umidità relativa del 95-99%, condizioni ottimali per la crescita batterica. Il nuovo metodo, invece, opera a temperatura ambiente (20-22°C con 30-40% HR), potenzialmente rallentando la crescita batterica ma più vicino alle condizioni di uso reale.
- **Neutralizzante:** Per quanto riguarda la neutralizzazione post-esposizione, entrambi i metodi utilizzano il neutralizzante D/E, ma in volumi differenti (10 ml per ISO 22196 contro i 20 ml per il nuovo metodo), il che potrebbe incidere sulla quantità di batteri che vengono recuperati dopo l'esposizione.
- **Efficacia dell'Azione Antibatterica:** L'ISO 22196 considera un'efficacia antibatterica adeguata quando si ha una riduzione ≥ 2 Log unità (riduzione della carica batterica) entro 24 ore di contatto. Il nuovo metodo propone invece una riduzione di 2 Log unità in un intervallo di tempo significativamente ridotto, da 1 a 2 ore, indicando una potenziale maggiore rapidità nell'azione antibatterica.

In conclusione, il nuovo metodo mira a fornire una valutazione più rapida dell'attività antibatterica dei materiali, con un potenziale incremento della sensibilità e una maggiore aderenza alle condizioni ambientali reali. Queste differenze possono avere implicazioni significative per i test di routine e per l'applicazione pratica dei risultati, sebbene sia necessaria un'ulteriore validazione per confermare l'efficacia del nuovo metodo rispetto allo standard ISO.

	ISO 22196	NEW METHOD
Inoculo ottimale (UFC/ml)	2,5x10 ⁵ - 1x10 ⁶	2,5x10 ⁵ - 1x10 ⁶
Dimensioni coupon	5x5 cm	2,5x2,5 cm
Vol. inoculo/superficie coupon	0,4 ml/16 cm ²	0,02 ml/1cm ²
Temperatura e Umidità relativa	36°C - 99,9%	RT (20-22°C 30-40% RH) Registrare valori medi di T e UR durante il test di 1 ora
Neutralizzante	D/E (10 ml)	D/E (20 ml)
Efficacia azione antibatterica (riduzione batteri vitali rispetto al controllo senza antibatterico)	Riduzione ≥ 2 Log entro un periodo di contatto di 24 ore	Riduzione ≥ 2 Log entro un periodo di contatto di 1-2 ore

Figura 56: Differenze di metodologia tra la normativa ISO 22196 ed il nuovo metodo sviluppato.

3.4.2 Saggio sull'attività antivirale

Nel presente studio in vitro, è stata valutata l'efficacia virucida di campioni di resina epossidica e di vari nanocompositi integrati con argilla nei confronti di tre virus (Figura 57): il Betacoronavirus HCoV-OC43, utilizzato come surrogato del SARS-CoV-2, l'Herpesvirus HSV-1 e l'Adenovirus AdV-5. La valutazione dell'attività virucida è stata condotta impiegando test biologici su colture cellulari, specificamente la linea cellulare VERO per HSV-1 e AdV-5, e una linea primaria di fibroblasti umani per HCoV-OC43. Questo metodo, sebbene possa essere considerato meno sensibile rispetto a tecniche molecolari quali la RT-PCR, è idoneo per determinare l'infettività della carica virale residua.

Gli esperimenti sono stati strutturati per testare sette diversi campioni a due distinti intervalli temporali post-contaminazione virale:

- T1: 24 ore dopo l'esposizione virale
- T2: 48 ore dopo l'esposizione virale

Le metodologie seguite hanno compreso le seguenti fasi (Figura 58):

- a) Campioni di resina epossidica e nanocompositi, di dimensioni 2cm x 1cm, sono stati disposti sul fondo di piastre a 6 pozzetti e sterilizzati mediante esposizione ai raggi UV per 15 minuti per lato.
- b) Sulla superficie di ogni campione è stata applicata una sospensione virale di 100 μ L fino a ricoprire completamente l'area. Le piastre sono state quindi incubate a temperatura ambiente per i periodi temporali predeterminati.
- c) Per recuperare il virus residuo da ciascun campione contaminato, questi sono stati trasferiti in vials contenenti 1 mL di terreno di coltura cellulare.
- d) I vials sono stati agitati vigorosamente utilizzando un vortex per 1 minuto alla massima velocità.
- e) La titolazione virale dei campioni è stata determinata attraverso il metodo della diluizione limite: diluizioni seriali decimale di ciascun campione sono state inoculate, in duplicato, su colture cellulari preparate 24 ore prima in piastre da 96 pozzetti. Dopo l'inoculazione, le colture sono state monitorate quotidianamente al microscopio ottico a luce invertita per identificare i segni caratteristici di danno cellulare indotto dal virus, quali cellule arrotondate e distaccate dal monolayer. Il titolo virale è stato definito come la più alta diluizione del virus in grado di produrre effetto virucida.

La differenza tra il titolo virale del campione di controllo e quello dei campioni di resine epossidiche e dei nanocompositi, espressa in logaritmo base 10, è stata utilizzata per quantificare la riduzione della carica virale attribuibile all'efficacia virucida dei materiali testati.



Figura 57: Campioni di resina EPIKOTE-RIMH per le prove antivirali.

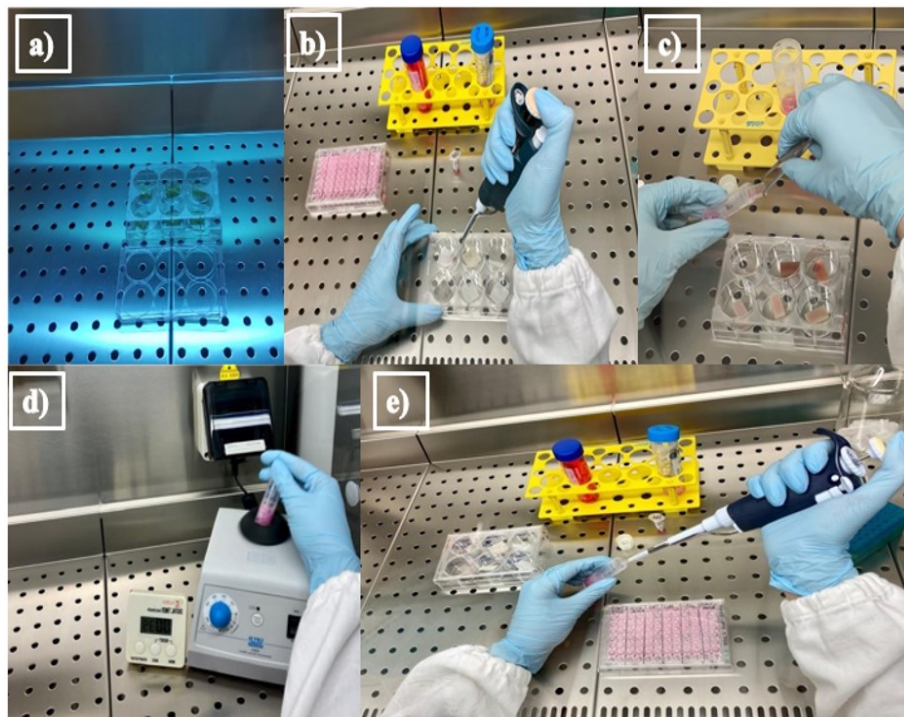


Figura 58: Fasi dell'esecuzione del saggio di attività antivirale : Sterilizzazione dei campioni (a); Contaminazione dei campioni di resina epossidica e dei nanocompositi (b); Raccolta della sospensione virale (c); Miscelazione del campione con vortex (d); Titolazione per diluizione limite (e).

CAP. 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Caratterizzazione componenti EC157 e Indurente

4.1.1 Caratterizzazione FTIR prepolimero

Lo spettro FTIR del prepolimero epossidico EC157 (Figura 59) mostra la presenza di un segnale poco intenso a 3492 cm^{-1} dovuto allo stretching OH; sono inoltre presenti segnali a 3057, 3034 e 2998 cm^{-1} degli stretching C-H aromatici, a 2965, 2929 e 2865 cm^{-1} degli stretching C-H alifatici, a 1799 cm^{-1} overtone dei C-H aromatici; a 1606 cm^{-1} dello stretching C=C degli anelli aromatici e a 1510 cm^{-1} degli stretching C-C degli aromatici; a 1240 e a 1032 cm^{-1} dello stretching dei gruppi C-O-C; a 831 cm^{-1} dello stretching del gruppo C-O-C del gruppo epossidico e a 755 cm^{-1} del rocking dei gruppi CH_2 .

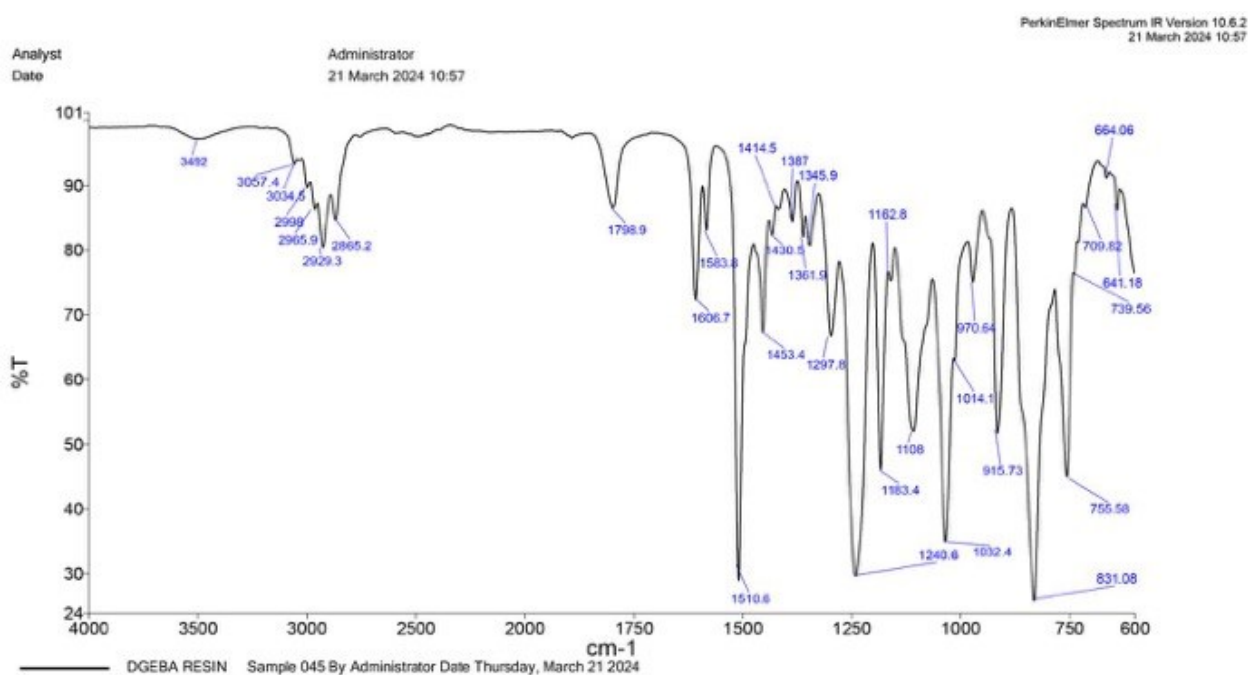


Figura 59: Spettro FTIR della componente prepolimerica della resina epossidica Elan Tech EC157.

4.1.2 Caratterizzazione ^1H NMR prepolimero

Lo spettro ^1H NMR (figura 60) mostra la presenza dei segnali del bis-fenolo A (i gruppi CH_3 con un singoletto a 1.55 ppm, e il sistema AA'BB' a 7.16 e 6.64 dei gruppi fenilici), del bis-fenolo F (il gruppo CH_2 con un singoletto a 3.94 ppm, e il sistema AA'BB' a 7.10 e 6.70 dei gruppi fenilici) e dell'epicloridrina a 2.76, 2.90, 3.20 e 3.35 ppm. Sono poi presenti altri segnali, non identificati dovuti ad altri componenti presenti alla complessa miscela industriale e non identificati.

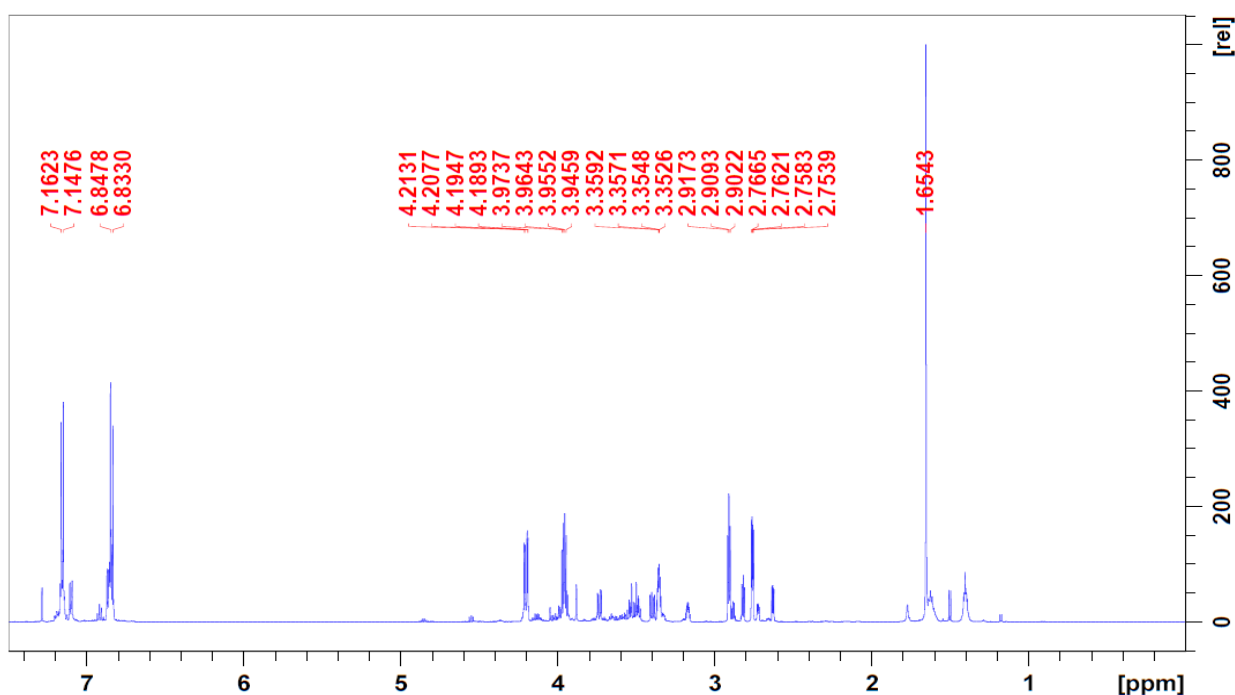
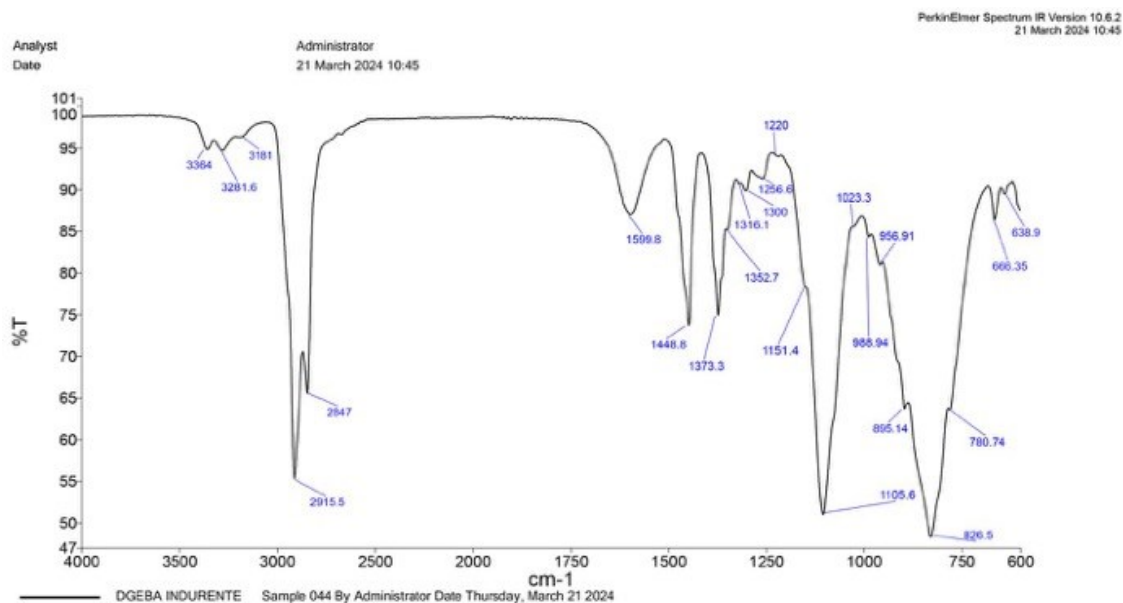


Figura 60: Spettro ^1H NMR del prepolimero epossidico Elan Tech EC157.

4.1.3 Caratterizzazione FTIR Indurente

Lo spettro FTIR dell'indurente della resina DGEBA (Figura 61) mostra la presenza dei seguenti segnali: a 3364, 3281 e 3181 cm^{-1} dovuti agli stretchings NH_2 caratteristici delle ammine primarie alifatiche; a 2915 e 2847 cm^{-1} degli stretching alifatici; a 1600 cm^{-1} dei bending del gruppo N-H; a 1448 e 1373 cm^{-1} dei bending dei gruppi C-H alifatici; a 1105 cm^{-1} dello stretching dei gruppi C-N delle ammine alifatiche; a 826 cm^{-1} del wagging dei gruppi N-H.



Page 1

Figura 61: Spettro FTIR della componente indurente Elan-TechW 152LR.

4.1.4 Caratterizzazione ^1H NMR Indurente

Lo spettro ^1H NMR mostra, come atteso, trattarsi di una miscela di soli composti alifatici. In particolare sono presenti vari segnali allargati originati dalle strutture cicloesiliche. Nell'intervallo 2.5-3.5 ppm sono presenti additivi di componenti contenuti nella miscela, non identificati.

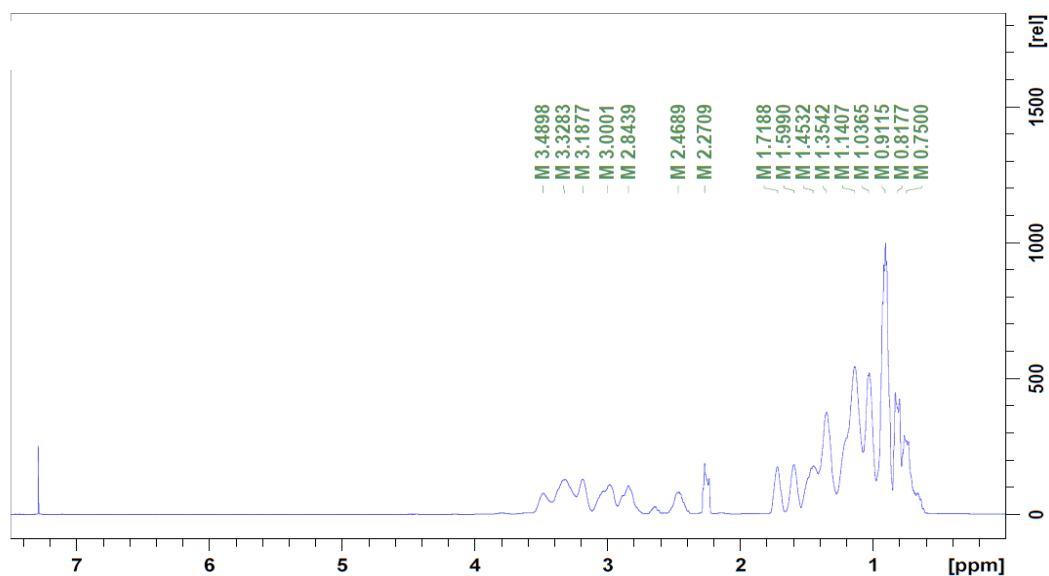


Figura 62: Spettro ^1H NMR dell'indurente Elan-TechW 152LR.

4.2 Caratterizzazione dei componenti EPIKOTE MGS e Indurente

4.2.1 Caratterizzazione FTIR prepolimero

Lo spettro FTIR del prepolimero epossidico della resina Epikote MGS (Figura 63) è molto simile a quello della resina precedente e mostra la presenza di un segnale poco intenso a 3501 cm^{-1} dovuto allo stretching OH; sono inoltre presenti segnali a 3062, 3034 e 2998 cm^{-1} degli stretching C-H aromatici, a 2965, 2929 e 2874 cm^{-1} degli stretching C-H alifatici; a 1606 cm^{-1} dello stretching C=C degli anelli aromatici e a 1508 cm^{-1} degli stretching C-C degli aromatici; a 1240 e a 1032 cm^{-1} dello stretching dei gruppi C-O-C; a 828 cm^{-1} dello stretching del gruppo C-O-C del gruppo epossidico e a 755 cm^{-1} del rocking dei gruppi CH_2 .

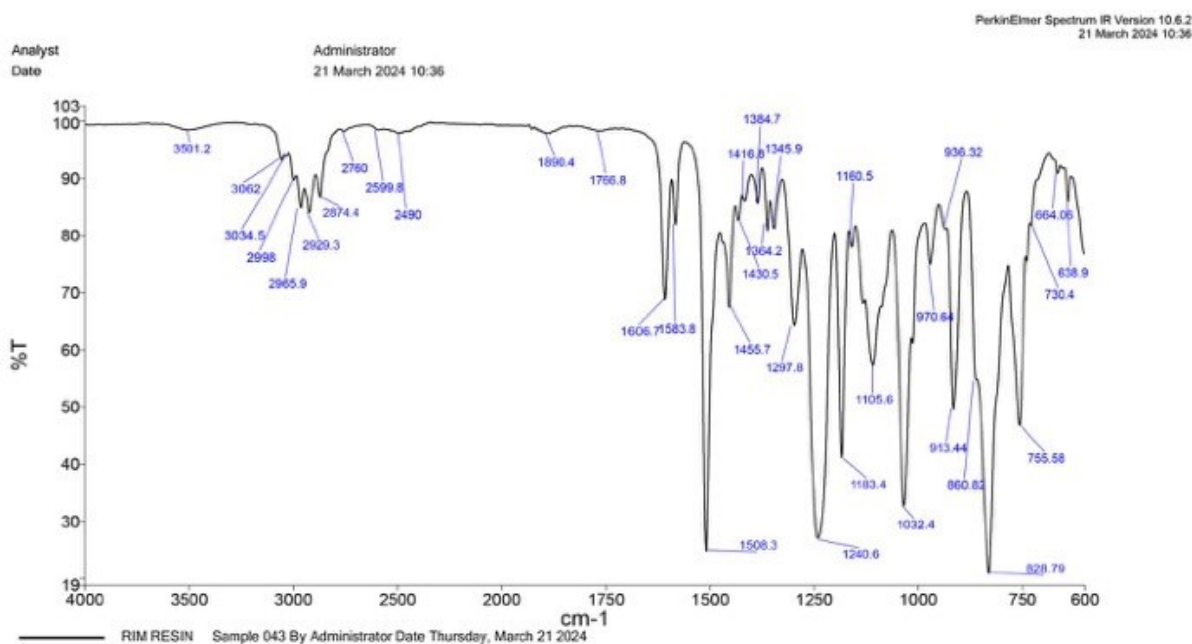


Figura 63: Spettro FTIR della componente prepolimerica della resina epossidica EPIKOTETM Resin MGS®.

4.2.2 Caratterizzazione ¹H NMR prepolimero

Lo spettro, molto simile a quello del prepolimero precedente ¹H NMR mostra la presenza dei segnali del bis-fenolo A (i gruppi CH_3 con un singoletto a 1.65 ppm, e il sistema AA'BB' a 7.16 e 6.84 dei gruppi fenilici), del bis-fenolo F (il gruppo CH_2 con un singoletto a 3.95 ppm, e il sistema AA'BB' a 7.10 e 6.70 dei gruppi fenilici) e dell'epicloridrina a 2.76, 2.90, 3.20 e 3.35 ppm.

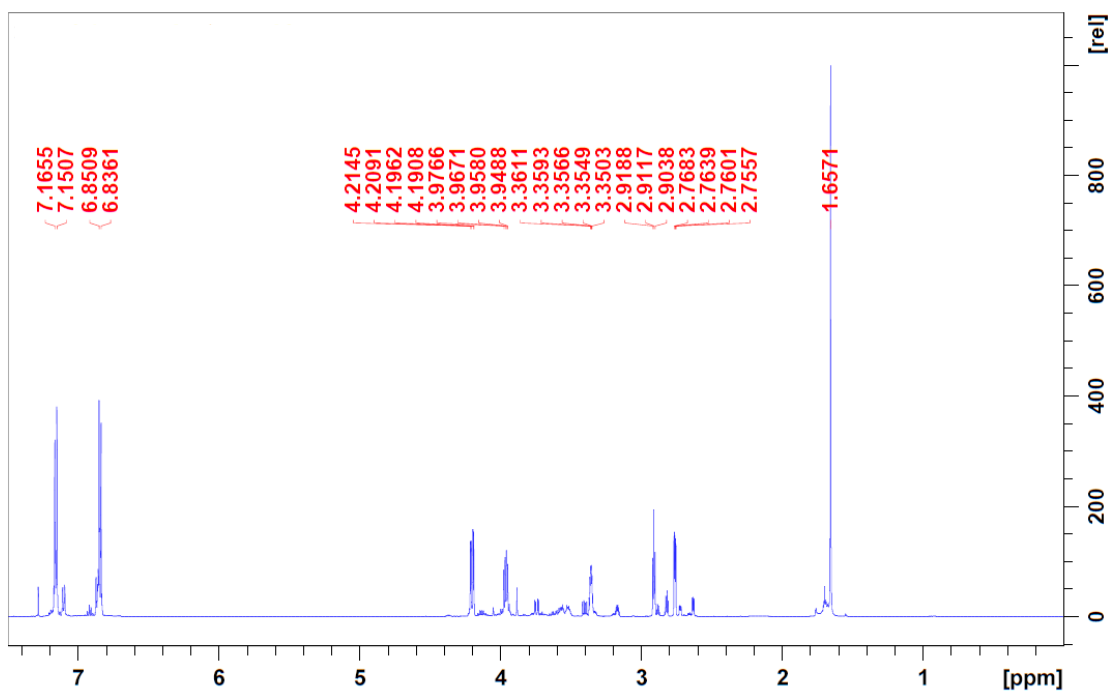


Figura 64: Spettro ^1H NMR del prepolimero epossidico EPIKOTE™ Resin MGS®.

4.2.3 Caratterizzazione FTIR indurente

Anche lo spettro FTIR dell'indurente della resina Epikote MGS (Figura 65) è molto simile a quello dell'altro indurente e mostra la presenza dei seguenti segnali: a 3364 , 3285 e 3181 cm^{-1} dovuti agli stretchings NH_2 caratteristici delle ammine primarie alifatiche; a 2899 e 2873 cm^{-1} degli stretching alifatici; a 1594 cm^{-1} dei bending del gruppo N-H; a 1456 e 1373 cm^{-1} dei bending dei gruppi C-H alifatici; a 1103 cm^{-1} dello stretching dei gruppi C-N delle ammine alifatiche; a 825 cm^{-1} del wagging dei gruppi N-H.

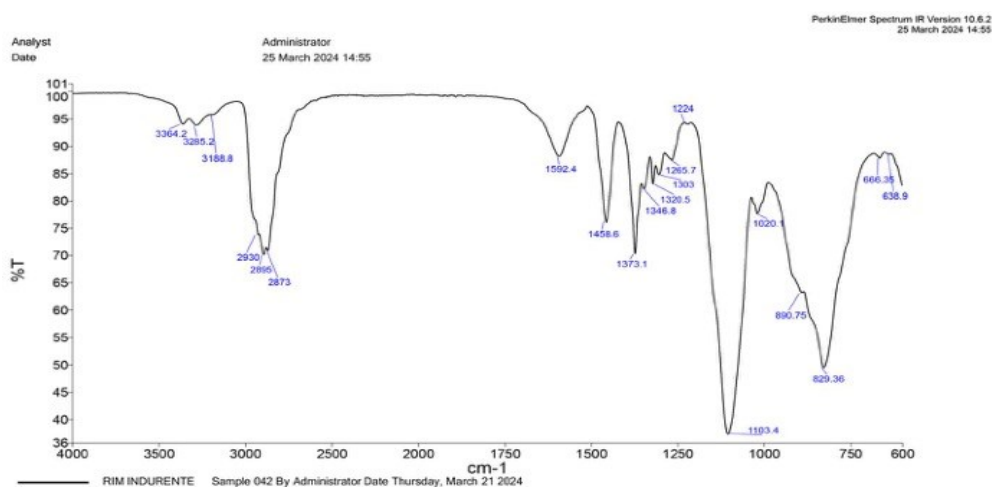


Figura 65: Spettro FTIR della componente indurente EPIKURE™ RIMH.

4.2.4 Caratterizzazione ^1H NMR indurente

Lo spettro ^1H NMR mostra, come atteso, trattarsi di una miscela di soli composti alifatici. In particolare sono presenti vari segnali allargati originati dalle strutture cicloesiliche. Nell'intervallo 2.5-3.5 ppm sono presenti additivi di componenti contenuti nella miscela, non identificati, ragionevolmente diversi o presenti in quantità maggiore rispetto al caso precedente.

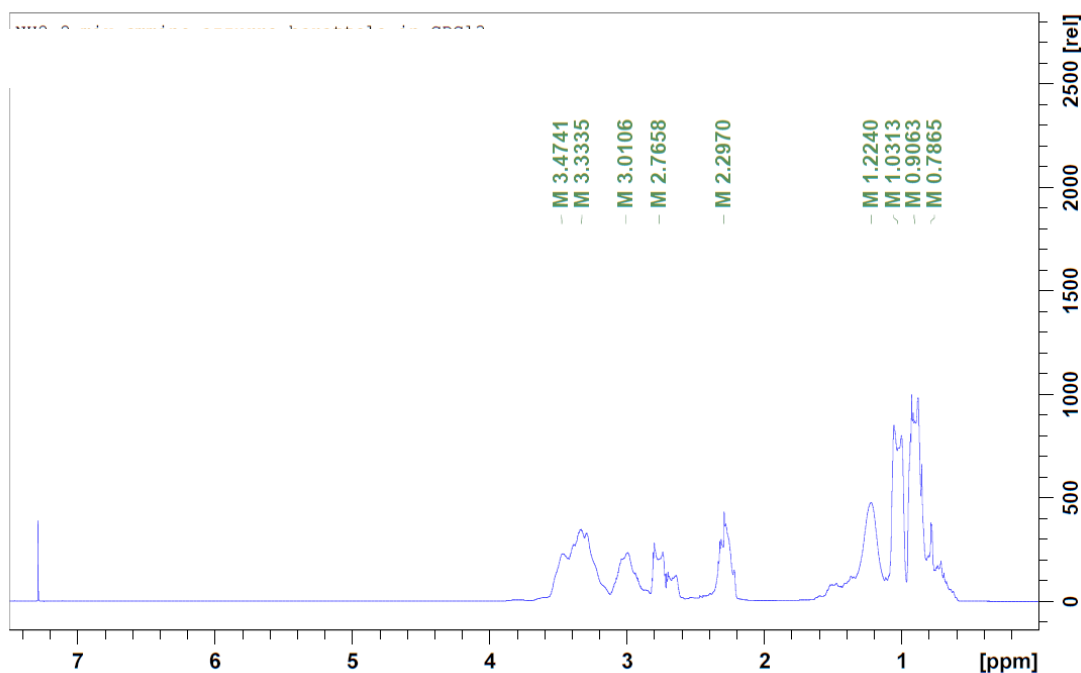


Figura 66: ^1H NMR dell'indurente EPIKURE™ RIMH.

4.3 Caratterizzazione della Cloisite 15A

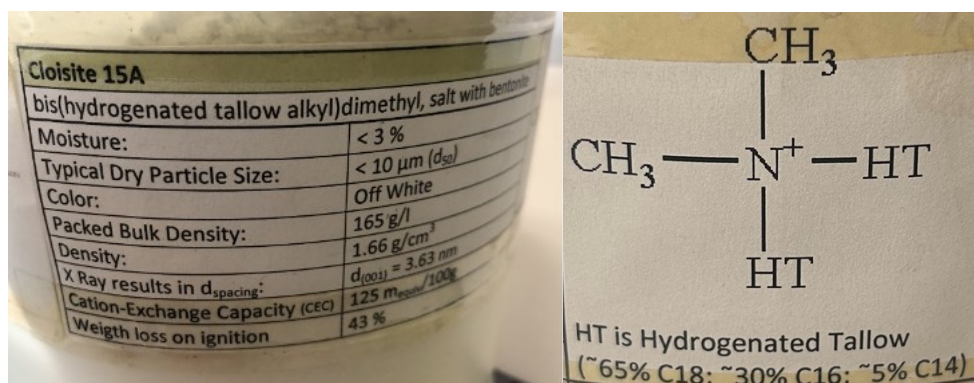


Figura 67: Nome e caratteristiche del batch di argilla Cloisite 15A utilizzato in questo progetto (a); formula del gruppo ammonio utilizzato per la modifica della cloisite 15A (b).

4.3.1 Analisi FTIR

Nello spettro della **Cloisite 15A** sono bene evidenti i segnali a 2921, 2963 e 1453 cm^{-1} delle catene alchiliche del gruppo ammonio e i segnali a 3628 cm^{-1} dei gruppi OH e a circa 1000 cm^{-1} del gruppo Si-O.

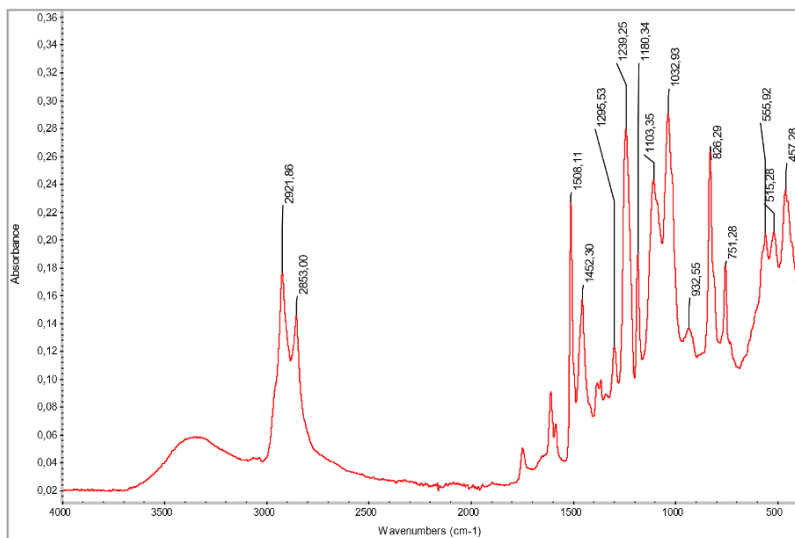


Figura 68: Spettro FTIR della Cloisite 15A.

4.3.2 Analisi ESEM e XRF

L'analisi XRF indica la presenza di un alto contenuto di carbonio dovuto al gruppo ammonio con cui la **Cloisite 15A** è stata modificata.

La **Cloisite 15A** possiede un valore di d-spacing uguale 3.63 nm, ricavato dall'analisi XRD.

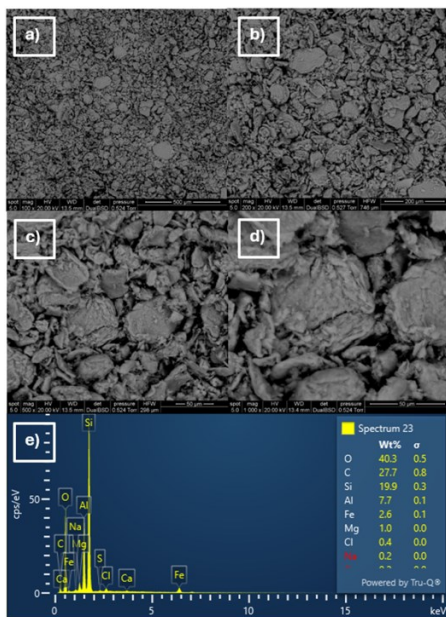
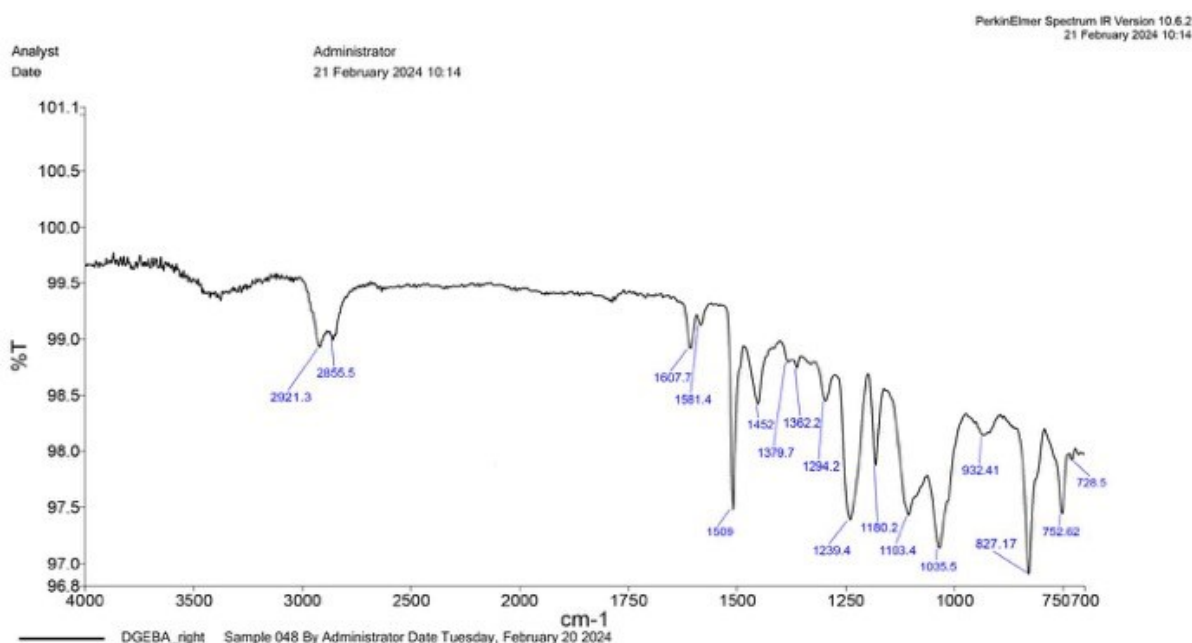


Figura 69: Immagini ESEM e XRF del campione di Cloisite 15A. Ingrandimento ESEM 100x (a), 200x (b), 500x (c), 1000 (d); Analisi XRF del campione (e).

4.4 Caratterizzazione delle resine epossidiche

4.4.1 Caratterizzazione FTIR resina EC157

Lo spettro FTIR della resina epossidica EC157 polimerizzata (Figura 70) mostra la presenza di un segnale poco intenso a 3500 cm^{-1} dovuto allo stretching dei gruppi OH; sono inoltre presenti segnali a 2921 e 2855 cm^{-1} degli stretching C-H alifatici; a 1607 cm^{-1} dello stretching C=C degli anelli aromatici e a 1509 cm^{-1} degli stretching C-C degli aromatici; a 1239 e a 1035 cm^{-1} dello stretching dei gruppi C-O-C; a 827 cm^{-1} dello stretching del gruppo C-O-C del gruppo epossidico e a 753 cm^{-1} del rocking dei gruppi CH_2 .



Page 1

Figura 70: Spettro FTIR della resina EC157 al termine del processo di postcuring.

4.4.2 Caratterizzazione ESEM resina EC157

L'immagine ESEM mostra trattarsi di un materiale omogeneo caratterizzato dalla presenza dell'80% p/p di carbonio, 17.5 di ossigeno e circa 1.8 % di azoto, assieme a tracce di cloro.

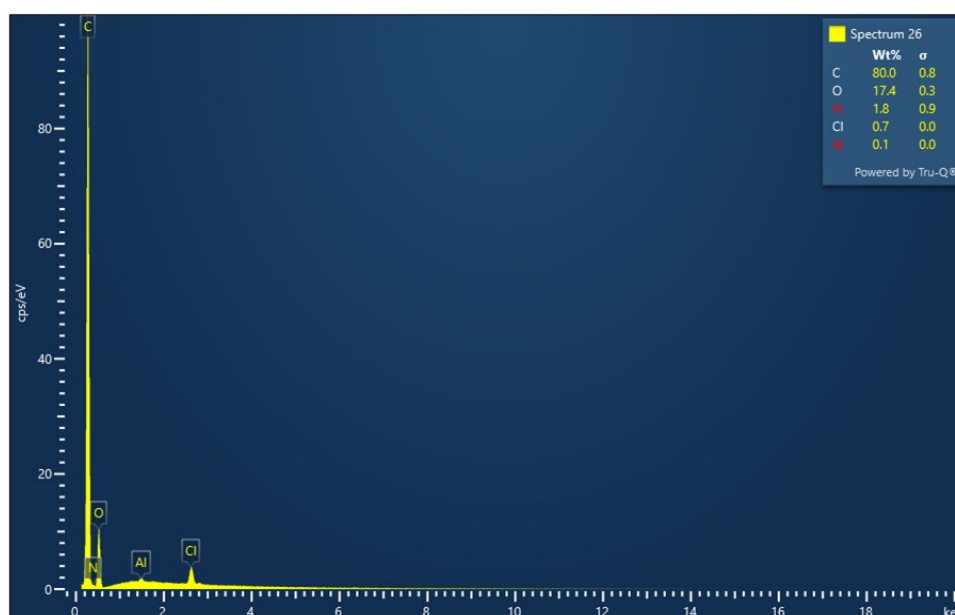
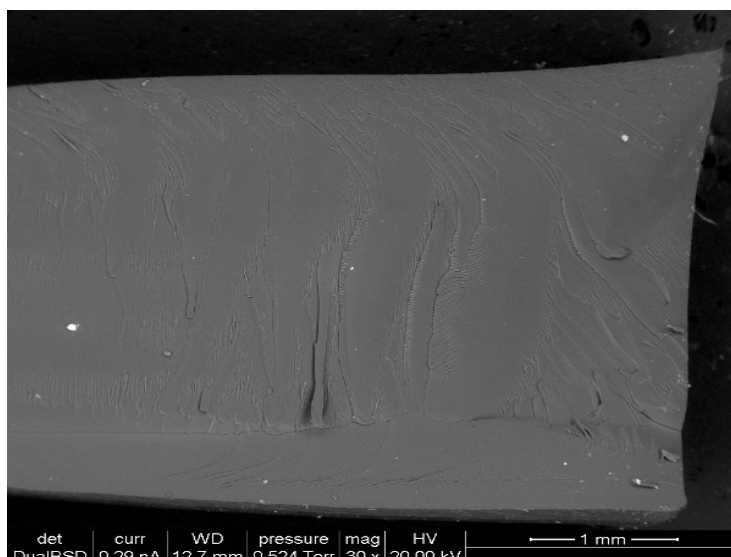


Figura 71: Analisi ESEM ed XRF della resina epossidica EC157.

4.4.3 Caratterizzazione FTIR resina EPIKOTE MGS

Lo spettro FTIR della resina Epikote MGS epossidica polimerizzata (Figura 72) è molto simile a quello della resina precedente e mostra la presenza di un segnale poco intenso a 3500 cm^{-1} dovuto allo stretching dei gruppi OH; sono inoltre presenti segnali a 2960 , 2917 e 2868 cm^{-1} degli stretching C-H alifatici; a 1605 cm^{-1} dello stretching C=C degli anelli aromatici e a 1509 cm^{-1} degli stretching C-C degli aromatici; a 1241 e a 1033 cm^{-1} dello stretching dei gruppi C-O-C; a 827 cm^{-1} dello stretching del gruppo C-O-C del gruppo epossidico e a 752 cm^{-1} del rocking dei gruppi CH_2 .

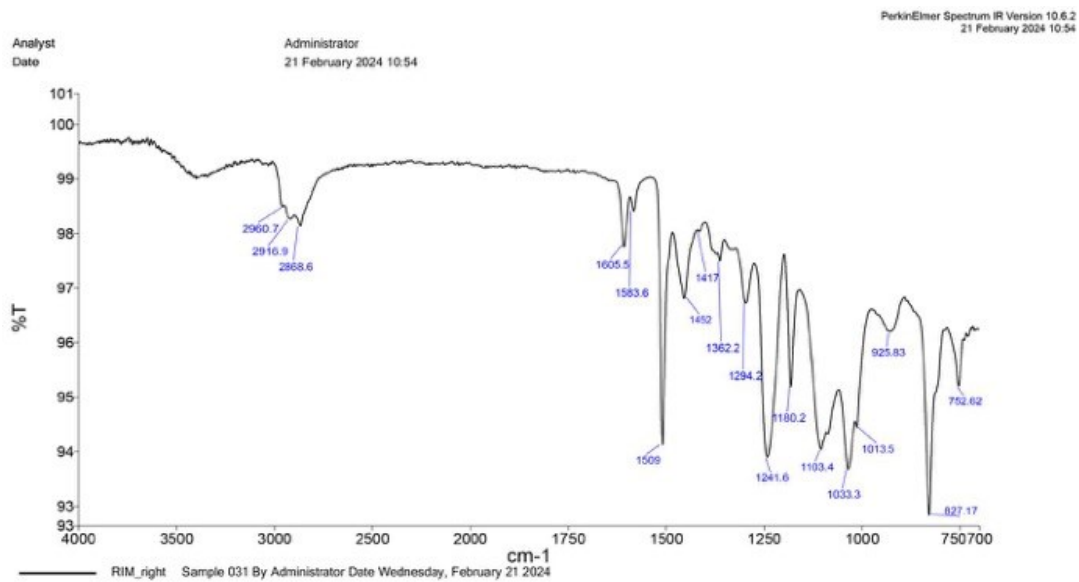
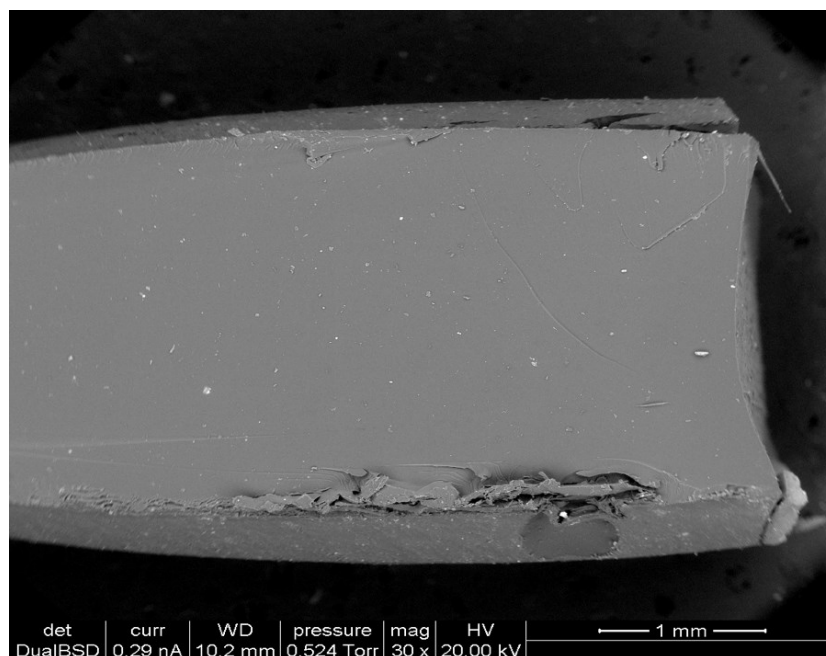


Figura 72: Spettro FTIR della resina Epikote MGS al termine del processo di postcuring.

4.4.4 Caratterizzazione ESEM della resina EPIKOTE MGS

L'immagine ESEM mostra trattarsi di un materiale omogeneo caratterizzato dalla presenza dell'77% p/p di carbonio, 18.7.5 di ossigeno e circa 2.3 % di azoto, assieme a tracce di cloro.



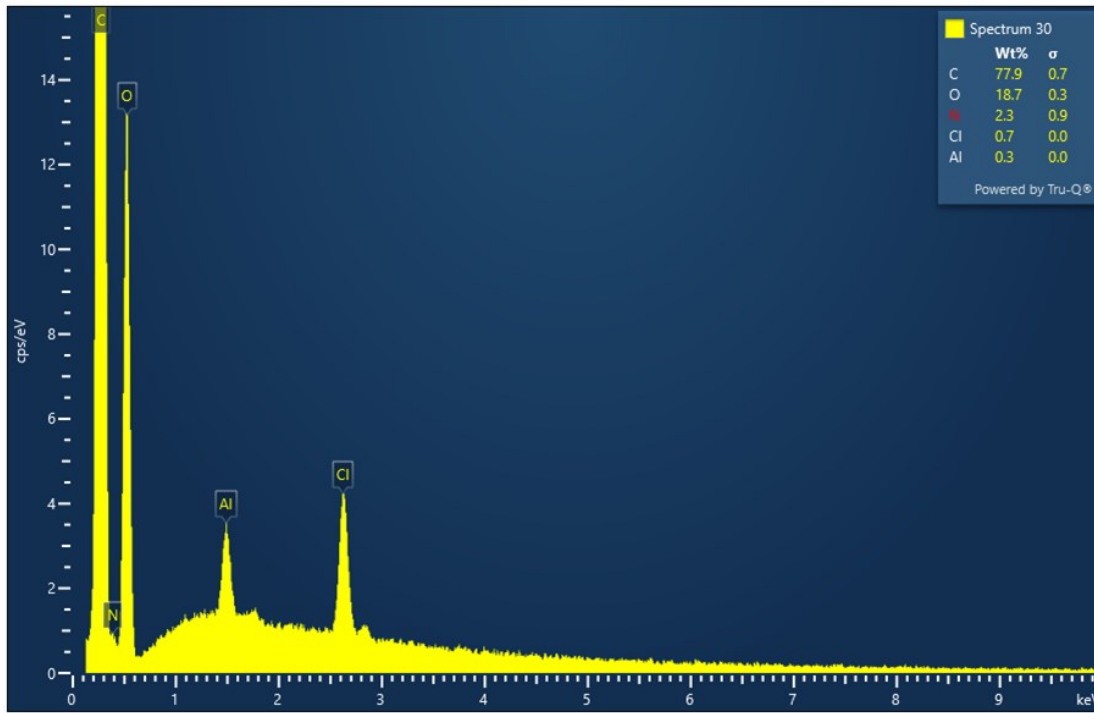


Figura 73: Analisi ESEM ed XRF della resina epossidica Epikote MGS.

4.4.5 Studio delle proprietà meccaniche delle resine epossidiche

Tensione a rottura

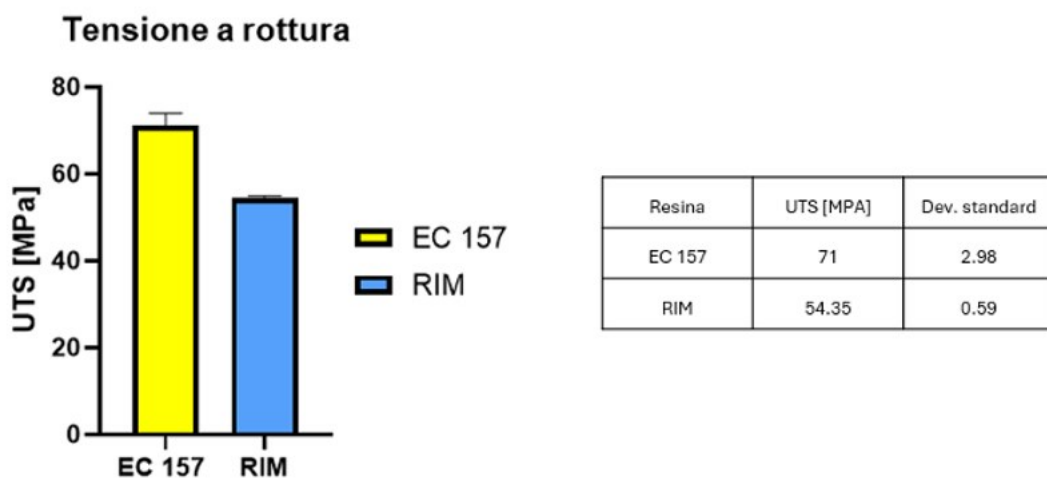


Figura 74: Grafici e valori numerici della tensione a rottura dei campioni di resina EC157 e RIM.

Modulo di Young

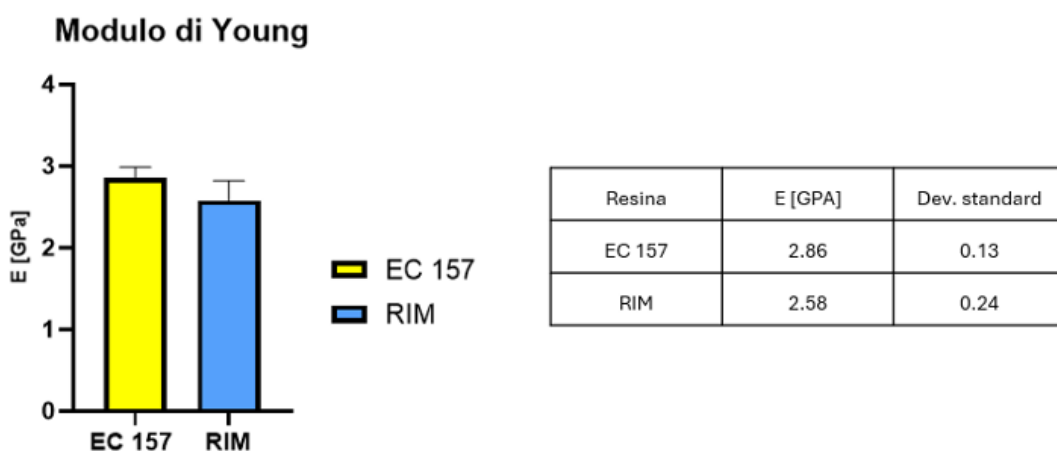


Figura 75: Grafici e valori numerici del modulo di Young dei campioni di resina EC157 e RIM.

Tenacità a frattura

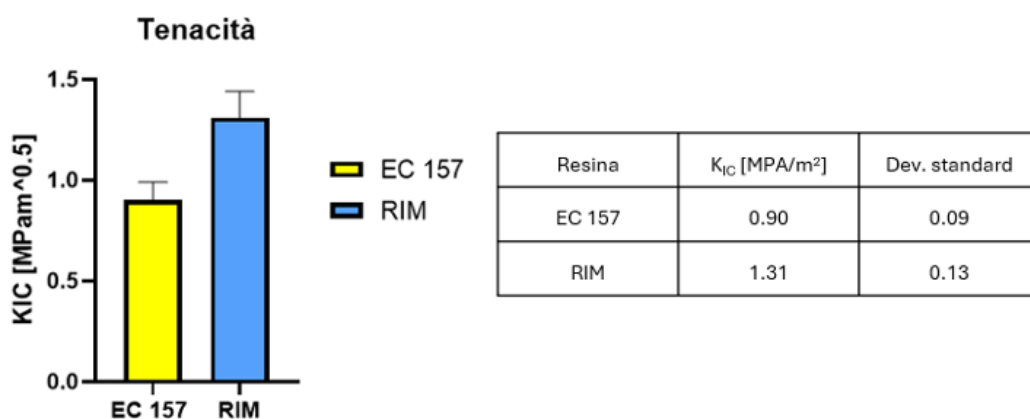


Figura 76: Grafici e valori numerici della tenacità a frattura dei campioni di resina EC157 e RIM.

I valori relativi alle proprietà meccaniche delle resine EC157 e Epikote MGS sono in accordo con quelli riportati nelle schede tecniche e rappresentano la media tra i valori ottenuti da test eseguiti su più provini.

4.5 Caratterizzazione dei nanocompositi

4.5.1 Spettroscopia FTIR

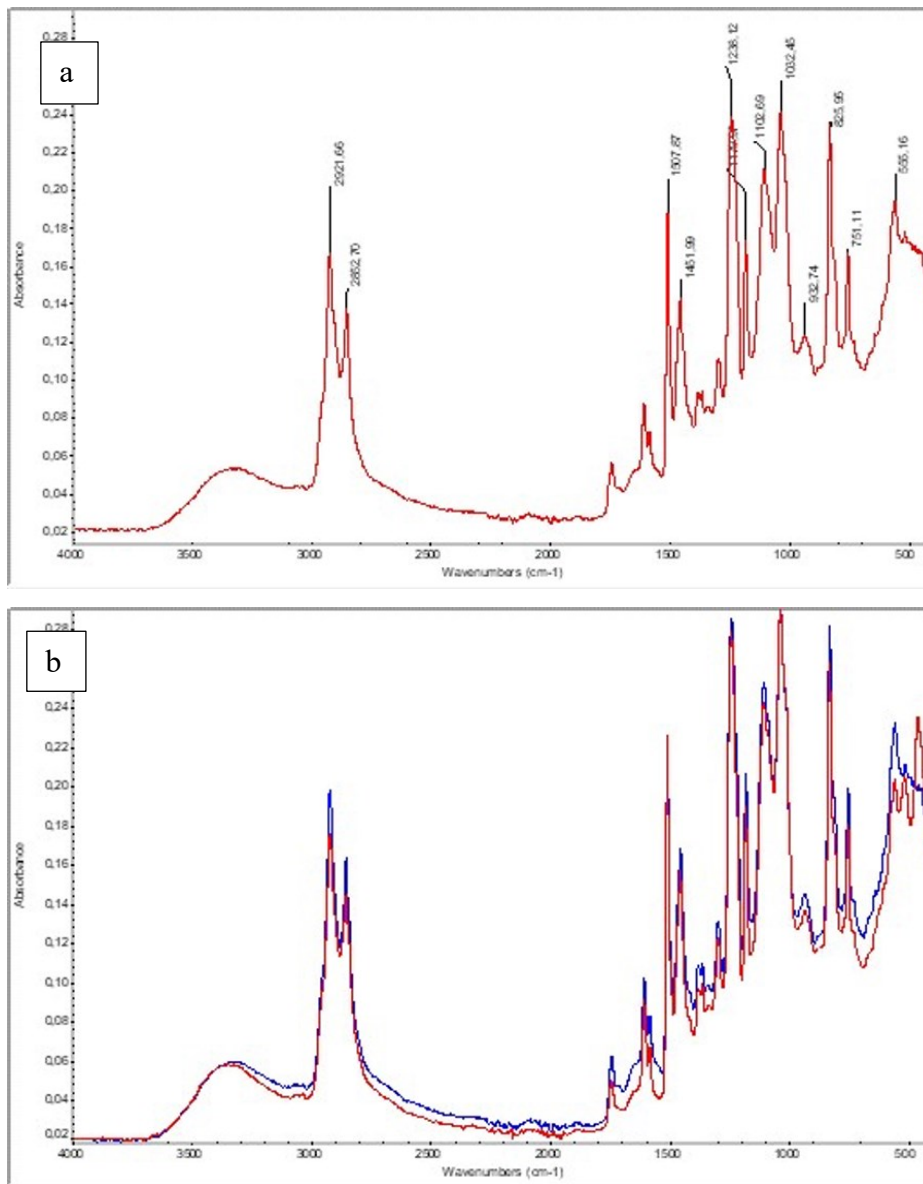


Figura 77: (a) Spettro della resina epossidica EC157. (b) Spettro FTIR della resina epossidica pura (blu); e della resina epossidica contenente la **Cloisite 15A** al 5% p/p (rosso).

4.5.2 Proprietà meccaniche dei nanocompositi con Cloisite15A

In Tabella 1 e in Figura 78 sono raccolti i valori della tensione di rottura, σ_R , dei nanocompositi arricchiti con l'argilla sintetica Cloisite 15A, correlati a variazioni nella percentuale di argilla incorporata (1%, 3% e 5% in peso). L'analisi del grafico rivela che l'introduzione dell'argilla determina un abbassamento dei valori di σ_R . Specificatamente, la resina epossidica non modificata registra una tensione di rottura di $73,24 \pm 3,02$ MPa. Si osserva che all'aumentare

del contenuto di argilla la tensione a rottura diminuisce. Questi risultati derivano dalla media delle tensioni di rottura misurate su cinque campioni di ciascun nanocomposito. La variabilità osservata nei dati può essere attribuita a disomogeneità strutturali nei campioni, risultanti da differenze nella distribuzione dell'argilla durante il processo di fabbricazione. La riduzione della tensione di rottura, osservata con l'incremento della percentuale di argilla al 5% in peso, concorda con i dati riportati nella letteratura scientifica. In questo contesto, le particelle di argilla, essendo disperse all'interno della matrice di resina epossidica, introducono eterogeneità strutturali che fungono da precursori per l'innesco di fratture.

La Figura 79 riporta l'effetto dell'aggiunta di argilla sui valori del modulo di Young (o modulo elastico), E , dei nanocompositi. L'inserimento dell'argilla ha manifestato un impatto generalmente negativo sul modulo elastico, ma un aumento nel caso di concentrazione del 3% in peso di argilla Cloisite 15A che ha migliorato il valore di E rispetto alle concentrazioni dell'1% e del 5% in peso. La resina epossidica allo stato puro presenta un modulo elastico di $3,50 \pm 0,55$ GPa, evidenziando così le complesse dinamiche che governano l'interazione tra le particelle di argilla e la matrice polimerica.

Nanoclay content wt [%]	E [GPa]	Diff. %	σ_R [MPa]	Diff.%
0	$3,50 \pm 0,55$	-	$73,24 \pm 3,02$	-
1	$3,35 \pm 0,70$	4,29	$62,35 \pm 7,17$	14,87
3	$3,47 \pm 0,79$	0,875	$54,90 \pm 5,72$	25,04
5	$3,27 \pm 0,72$	6,57	$56,30 \pm 4,32$	23,13

Tabella 1: Modulo di Young, E , e tensione a rottura, σ_R , dei campioni di resina epossidica pura e dei campioni di nanocompositi a base di resina epossidica e argilla Cloisite 15A all'1%, 3% ed al 5% p/p.

Tensione a rottura

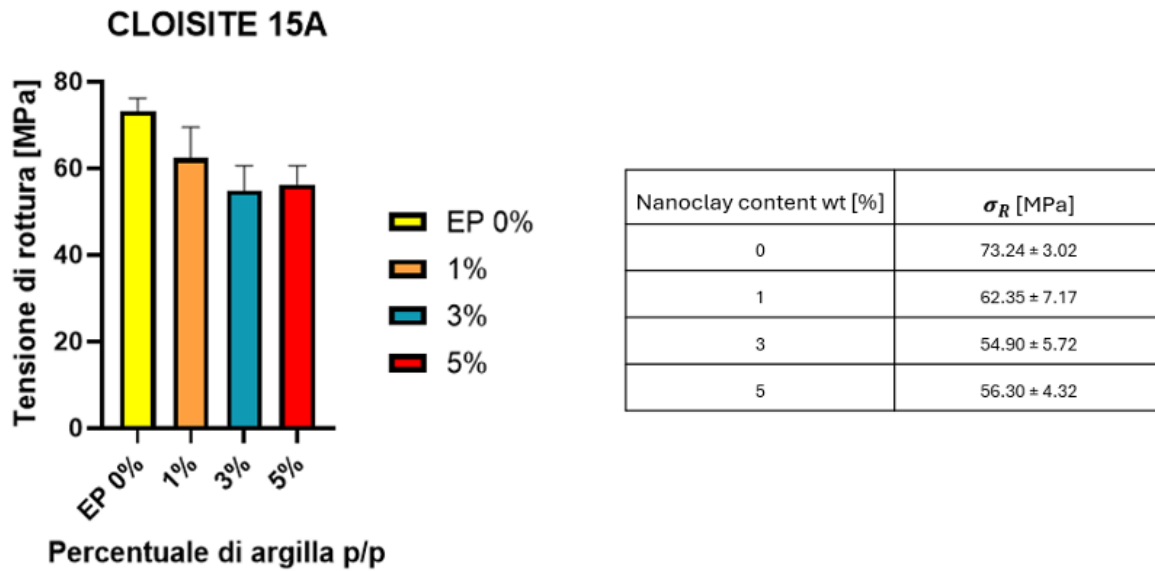


Figura 78: Tensione a rottura, σ_R , dei campioni di controllo e dei campioni dei nanocompositi a base di resina epossidica e argilla Cloisite 15A all'1%, 3% ed al 5% p/p.

Modulo di Young

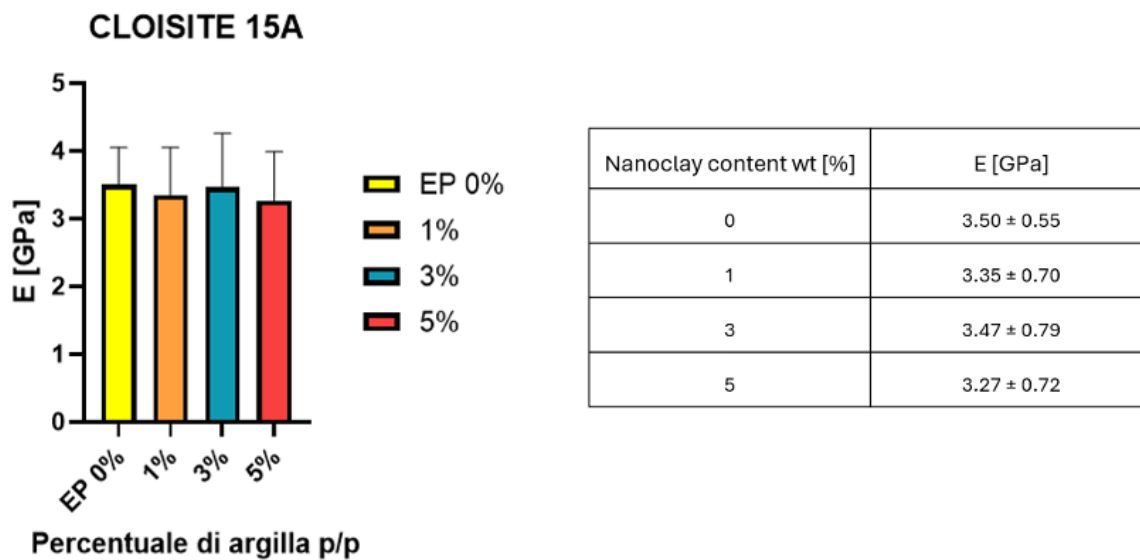


Figura 79: Modulo di Young, E, dei campioni di controllo e dei campioni dei nanocompositi a base di resina epossidica e argilla **Cloisite 15A** all'1%, 3% ed al 5% p/p.

4.6 Proprietà antimicrobiche dei materiali preparati

4.6.1 Proprietà antibatteriche delle resine epossidiche

Staphylococcus aureus – Metodo ISO 22196:2011

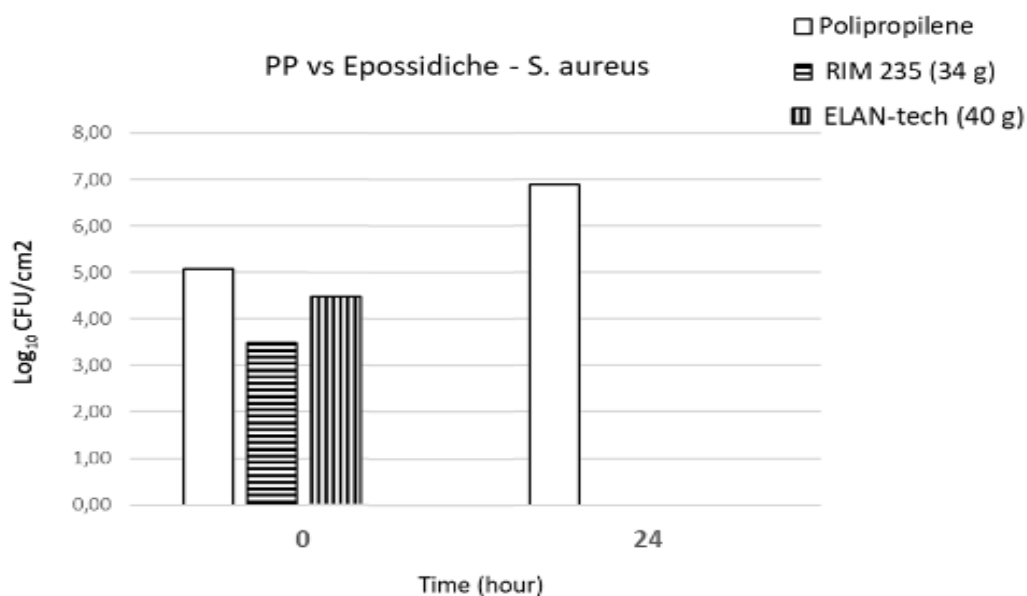


Figura 80: Azione antibatterica delle resine EC157 (ELAN-tech) e Epikote MGS (RIM 235) nei confronti di *S.aureus*.

EPIKOTETM MGS® + RIM 235		DGEBA (120 g) + ELAN-tech E157	
24h		24h	
R	% riduzione	R	% riduzione
6.89	99.9999	6.89	99.9999

Tabella 2: Riduzione logaritmica (R) e percentuale di riduzione delle colonie batteriche poste a contatto con le resine.

Escherichia coli– Metodo ISO 22196:2011

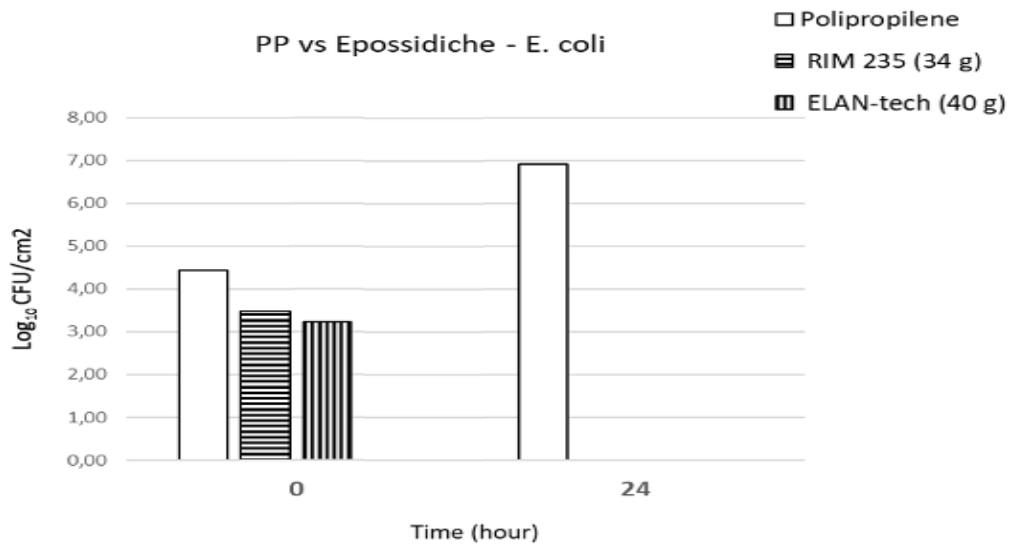


Figura 81: Azione antibatterica delle resine EC157 (ELAN-tech) e Epikote MGS (RIM 235) nei confronti di *E.coli*.

EPIKOTETM MGS® + RIM 235 (34 g)		DGEBA (120 g) + ELAN-tech E157 (40 g)	
24h		24h	
R	% riduzione	R	% riduzione
6.92	99.9999	6.92	99.9999

Tabella 3: Riduzione logaritmica (R) e percentuale di riduzione delle colonie batteriche poste a contatto con le resine.

Staphylococcus aureus – Nuovo metodo, resina Epikote MGS

0h		2h		6h		24h		48h		72h		96h	
R	rid%	R	% rid	R	% rid	R	% rid	R	% rid	R	% rid	R	% rid
0.09	17.8	0.22	39.68	1.02	90.6	0.55	72.41	0.62	76.04	0.38	58.35	0.76	82.76

Tabella 4: Valori di riduzione logaritmica (R) e percentuale di riduzione della crescita batterica di *S. aureus* a contatto con i campioni in resina epossidica Epikote MGS.

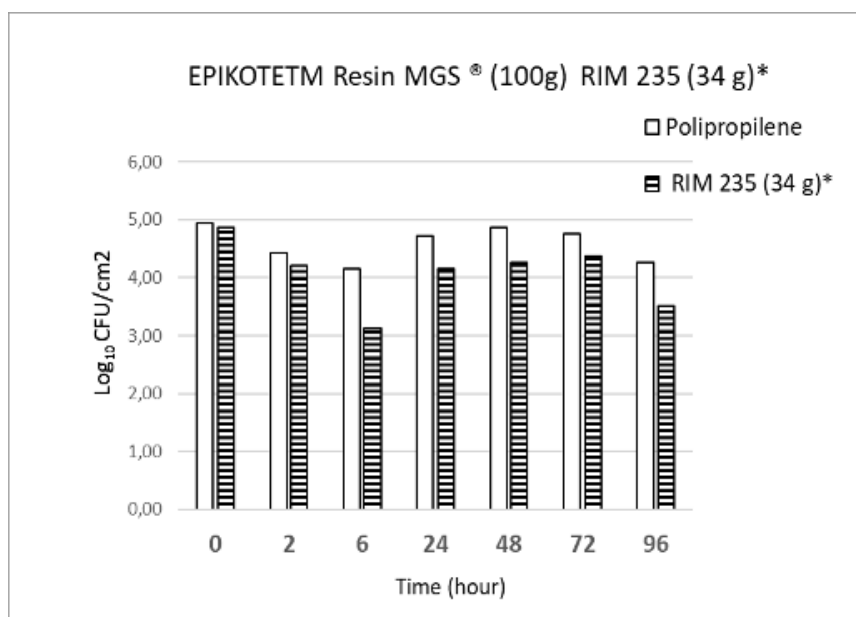


Figura 82: Azione antibatterica della resina epossidica Epikote MGS (RIM 235) contro *S. aureus*.

Escherichia coli – Nuovo metodo, resina Epikote MGS

0h		2h		6h		24h		48h		72h		96h	
R	% rid	R	% rid	R	% rid	R	% rid	R	% rid	R	% rid	R	% rid
0.01	8.9	0.09	18.35	0.13	66.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabella 5: Valori di riduzione logaritmica (R) e percentuale di riduzione della crescita batterica di *E. coli* a contatto con i campioni di resina epossidica Epikote MGS.

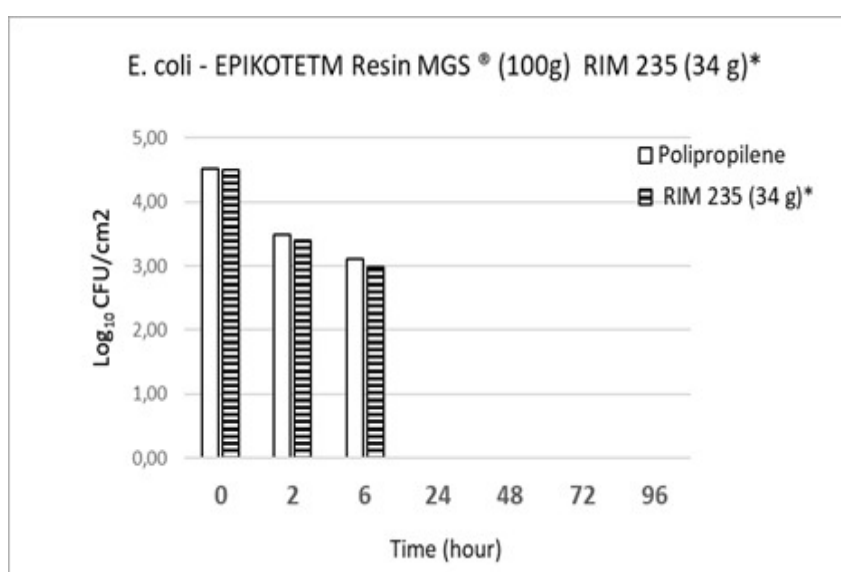


Figura 83: Azione antibatterica della resina epossidica Epikote MGS (RIM 235) verso *E. Coli*.

4.6.2 Proprietà antivirali delle resine epossidiche

Test contro AdV-5

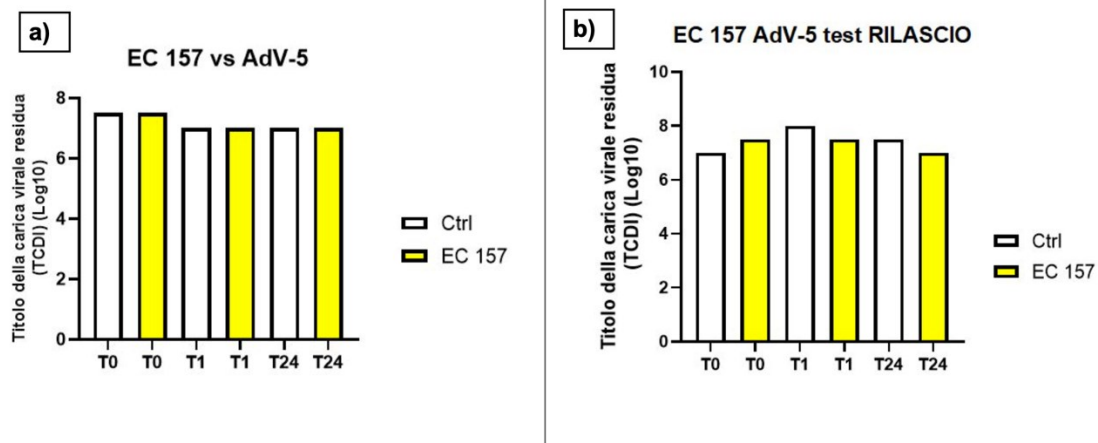


Figura 84: Risultati test antivirale di contatto (a) e di rilascio (b) della resina EC157 (DGEBA) contro AdV-5; controllo eseguito su lastra di vetro.

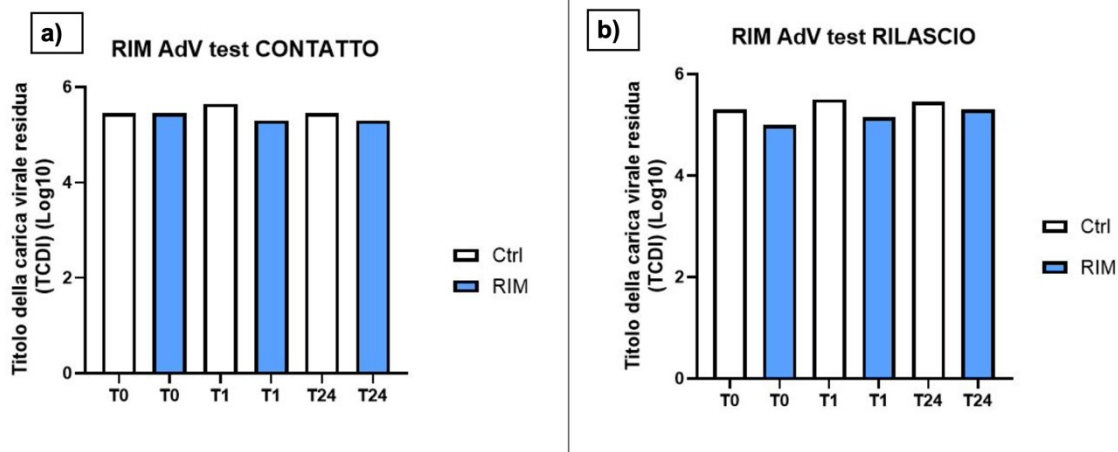


Figura 85: Risultati test antivirale di contatto (a) e di rilascio (b) della resina EPIKOTE MGS (RIM) contro AdV-5; controllo eseguito su lastra di vetro.

Test contro HSV-1

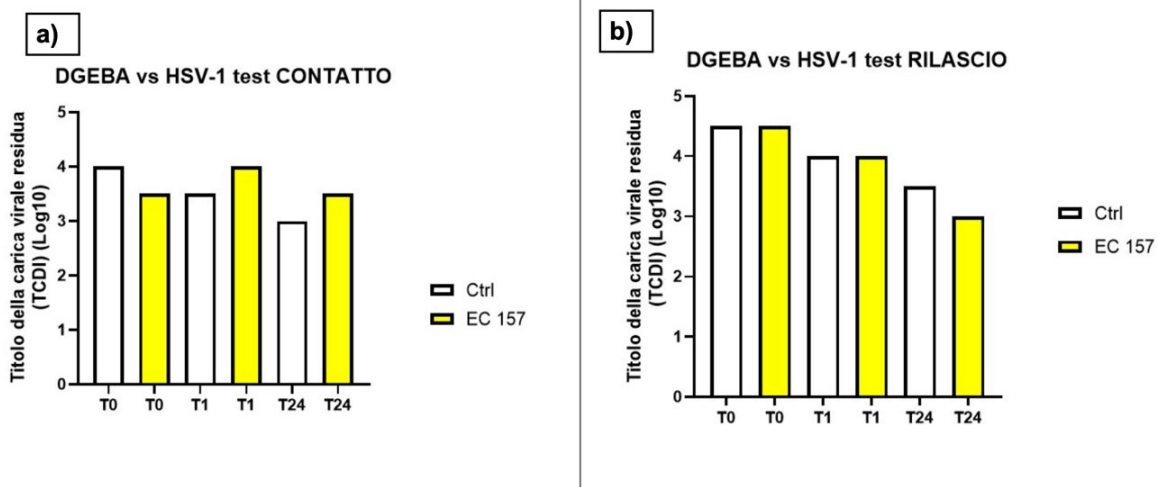


Figura 86: Risultati test antivirale di contatto (a) e di rilascio (b) della resina EC157 (DGEBA) contro HSV-1; controllo eseguito su lastra di vetro.

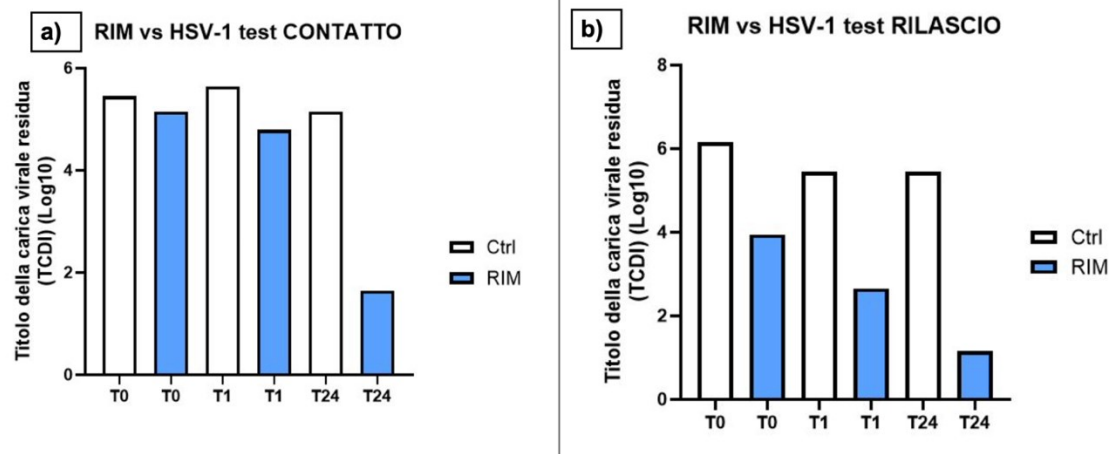


Figura 87: Risultati test antivirale di contatto (a) e di rilascio (b) della resina EPIKOTE MGS (RIM) contro HSV-1; controllo eseguito su lastra di vetro.

Test contro HCoV-OC43

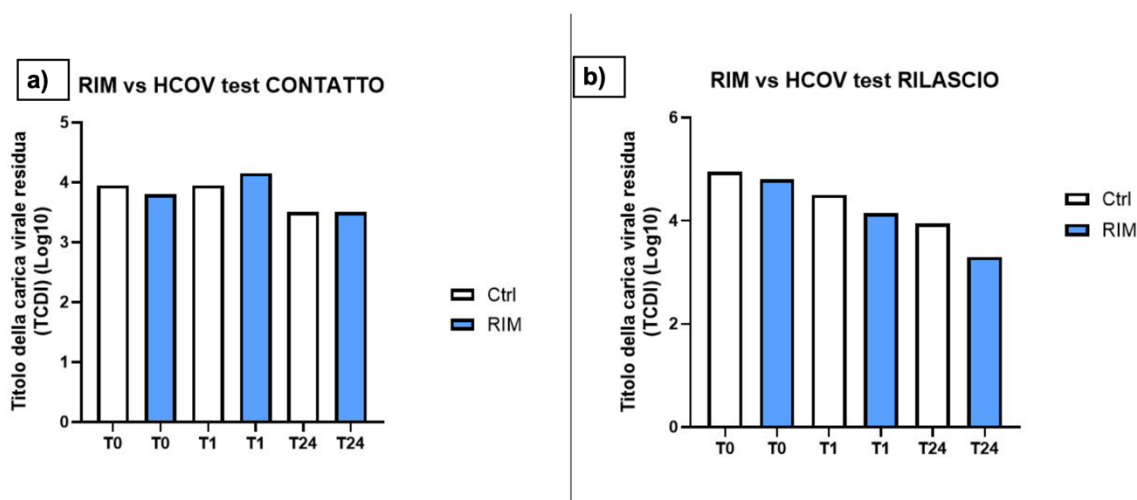


Figura 88: Risultati test antivirale di contatto (a) e di rilascio (b) della resina EPIKOTE MGS (RIM) contro HCoV-OC43; controllo eseguito su lastra di vetro.

Le prove sono state eseguite con due metodi indicati come “contatto” e “rilascio”. Entrambi gli esperimenti prevedono di lasciare la resina immersa in 4 ml di terreno in leggera agitazione per 24 ore in modo che rilasci tutti i componenti virucidi presenti in essa.

Per l'esperimento fatto per rilascio il virus viene aggiunto solamente dopo la rimozione della resina dal medium, mentre per l'esperimento fatto per contatto il virus viene aggiunto quando la resina è ancora presente nel medium. Entrambi gli esperimenti prevedono poi di testare l'effetto virucida di essa dopo 1 ora e dopo 24 ore dal contatto del virus indicato con le componenti presenti nel medium e la resina se presente.

4.6.3 Proprietà antibatteriche dei nanocompositi

Anche l'efficacia antibatterica dei nanocompositi preparati con resina epossidica EC157 e Cloisite 15A è stata testata nei confronti di due tipologie di batteri: Escherichia coli, modello dei batteri Gram-negativi, e Staphylococcus aureus, modello di batteri Gram-positivi.

I test sono stati eseguiti seguendo la metodologia descritta dalla normativa ISO 22196, già menzionata in precedenza, che prevede la valutazione dell'efficacia antibatterica attraverso la misurazione dell'inibizione della crescita batterica. I batteri sono stati inoculati in un terreno di coltura e posti in contatto con i campioni di nanocompositi a confronto con quella osservata in presenza di campioni di resina epossidica EC157 non modificata. La percentuale di inibizione della crescita batterica è stata determinata applicando le formule previste dallo standard ASTM

E2149-01. In particolare, è stata calcolata la differenza percentuale nel numero di Unità Formanti Colonia per centimetro quadrato (CFU/cm²) tra i campioni posti a contatto coi nanocompositi (NC) e quelli a base di resina epossidica pura (RP), secondo l'equazione seguente:

$$\text{Diff.\%} = [\text{CFU/cm}^2(\text{NC}) - \text{CFU/cm}^2(\text{RP})] / \text{CFU/cm}^2(\text{RP})$$

I batteri Gram-positivi, caratterizzati da una struttura cellulare meno complessa rispetto ai loro omologhi Gram-negativi, mostrano una maggiore suscettibilità agli agenti antibatterici.

L'effetto antibatterico dei nanocompositi può essere attribuito a diversi meccanismi di interazione con i batteri.

I nanocompositi offrono una superficie favorevole all'adesione batterica, migliorando così il contatto tra le cellule batteriche e l'argilla. Questo fenomeno potrebbe fornire una spiegazione al riscontro, ottenuto da studi precedenti, secondo cui i nanocompositi esibiscono una maggiore attività antibatterica rispetto alle polveri di argilla. Le nanoparticelle costituenti i minerali argillosi interagiscono con le cellule batteriche attraverso meccanismi quali interazioni elettrostatiche, forze di Van der Waals e legami idrofobici, portando alla distruzione delle cellule. Data l'elevata area superficiale rispetto al volume, le nanoparticelle di argilla facilitano l'adesione dei microrganismi e la loro successiva penetrazione nelle cellule, ostacolando la crescita batterica mediante l'ingresso delle nanoparticelle o di ioni argillosi nella parete cellulare, che induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dannose per DNA, proteine ed enzimi batterici.

L'azione antibatterica delle nanoparticelle è efficace sia contro i batteri Gram-negativi che Gram-positivi: (i) la parete dei batteri Gram-negativi, composta da uno strato sottile di peptidoglicani e una doppia membrana esterna arricchita di lipopolissaccaridi all'esterno e fosfolipidi all'interno, presenta una dimensione e una carica che facilitano l'interazione con le nanoparticelle, promuovendo la generazione di ROS e lo stress ossidativo che conduce alla morte cellulare; (ii) la parete dei Gram-positivi, principalmente costituita da spessi strati di peptidoglicani e acidi teicoici, non ha una membrana esterna lipopolissaccaride, il che rende questi batteri più suscettibili all'azione delle nanoparticelle. L'assenza di una doppia membrana nei Gram-positivi permette una maggiore permeabilità ai composti idrofobici, e la loro parete cellulare, più negativamente caricata a causa dell'abbondanza di peptidoglicani, attrae più fortemente le nanoparticelle, solitamente cariche positivamente. Ricordiamo che la Cloisite 15A è inoltre modificata con un catione fosfonio. L'azione antibatterica si può spiegare la disgregazione fisica della membrana cellulare, la perturbazione del potenziale di membrana, la solubilizzazione dei fosfolipidi di membrana e

alterazioni delle proprietà di trasporto della membrana, che comportano modifiche ai processi metabolici, inclusi i cicli redox.

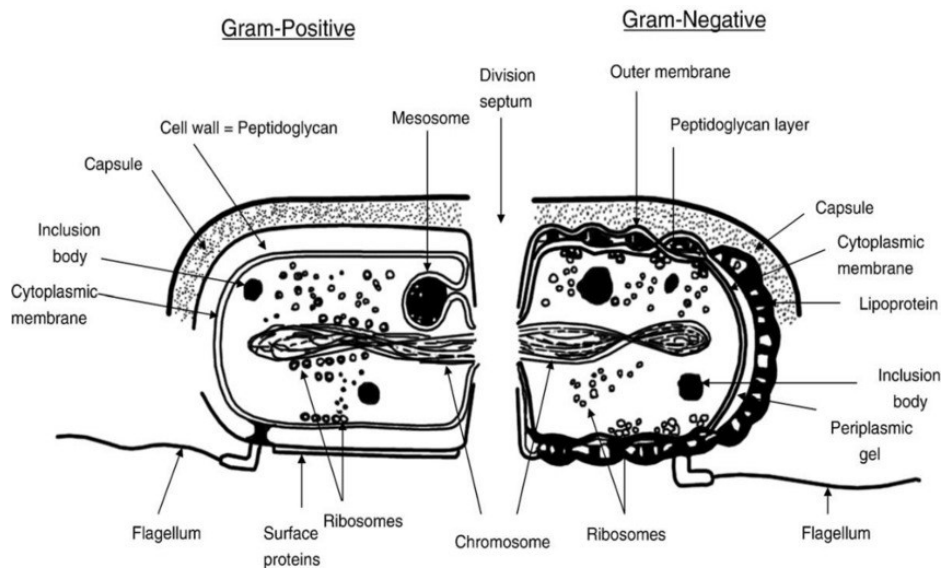


Figura 89: Membrana cellulare dei batteri Gram-positivi a sinistra e dei batteri Gram-negativi a destra.

In Figura 90 sono illustrati i dati relativi all'effetto antibatterico esercitato dai nanocompositi contenenti Cloisite 15A al 5% in peso (p/p) sugli Escherichia coli: in ordinata il logaritmo del numero di CFU per centimetro quadrato rilevato immediatamente dopo il posizionamento dei campioni a contatto con i batteri (tempo 0) e dopo 24 ore di esposizione.

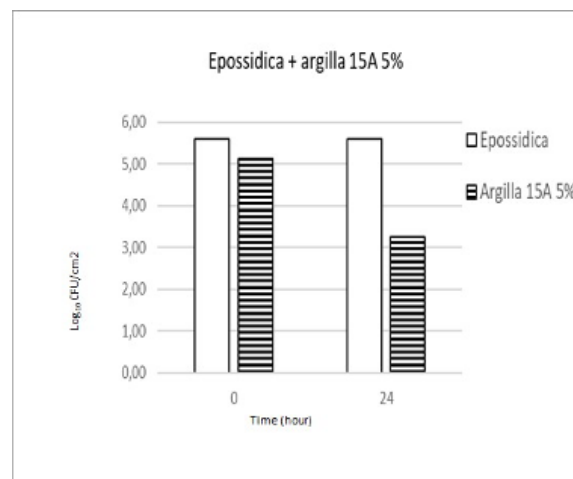


Figura 90: L'attività antibatterica dei nanocompositi a base di argilla Cloisite 15A (5% p/p).

L'efficacia antimicrobica è stata quantificata tramite il calcolo del valore medio di riduzione logaritmica (Log Rid) e della percentuale di differenza (% differenza) nel conteggio delle colonie batteriche, secondo la formula:

$$\text{Log Rid} = \text{Log CFU/cm}^2(\text{NC}) - \text{Log CFU/cm}^2(\text{RP})$$

I campioni di nanocompositi con argilla 15A al 5% in peso (p/p) hanno mostrato una notevole efficacia antibatterica contro *Escherichia coli*, registrando un valore di riduzione logaritmica R di 2,36 e una percentuale di differenza pari al 99,99%.

Ceppo batterico	Nanocomposito con Cloisite 15A (5% p/p)	
<i>E.coli</i> (ATCC 8739)	Log Rid	differenza %
	2,36	99,99

Tabella 6: Attività antibatterica del nanocomposito a base di resina epossidica e Cloisite 15A al 5% p/p nei confronti dei batteri *E. coli*.

La Figura 91 illustra le diluizioni seriali effettuate sulle colonie di *Escherichia coli*, inoculate su terreni di Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd.) in tre replicati (diluizioni realizzate a seguito di un'esposizione di 24 ore tra i batteri e campioni di nanocompositi).

Si osserva in particolare l'assenza di colonie batteriche sulla piastra di sinistra, dopo l'ultima diluizione, evidenzia l'eccezionale attività antibatterica posseduta dal nanocomposito a base di Cloisite 15A, mentre a destra, in cui sono riportate le diluizioni dopo contatto con la resina pure si ha una attività molto minore, ma diversa da zero, come evidenziato ai paragrafi precedenti.

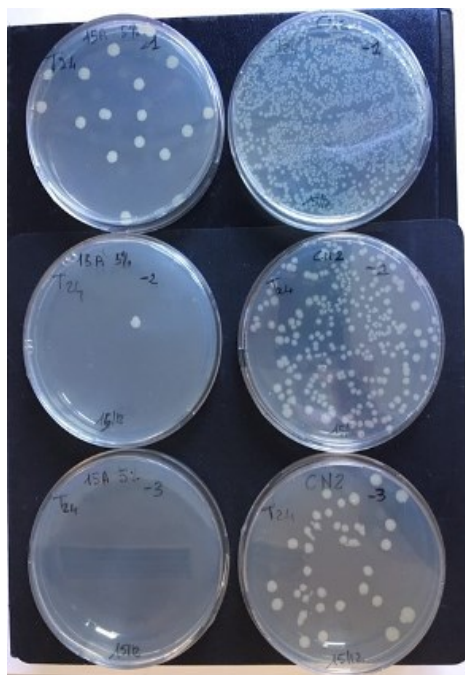


Figura 91: Diluizioni delle colonie batteriche di *Escherichia Coli* eseguite in seguito ad un contatto di 24 ore con i provini di resina epossidica pura (EP), a destra, e di nanocompositi a base di argilla Cloisite 15A in frazione 5% p/p a sinistra.

4.6.4 Proprietà antivirali dei nanocompositi

La Tabella 7 presenta i dati relativi all'efficacia virucida di campioni di resina epossidica non modificata (usata come controllo) e di nanocompositi contenenti Cloisite 15A nelle proporzioni del 3% e 5% in peso. L'analisi dell'attività virucida è stata condotta su tre differenti virus: l'Herpesvirus (HSV-1), il Betacoronavirus HCoV-OC43 (come modello per il SARS-CoV-2) e l'Adenovirus (Adv-5), misurando l'effetto a 24 e 48 ore dopo la contaminazione dei campioni. Gli studi sono stati effettuati presso il Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze dell'Università di Modena.

Il livello di carica virale per ogni campione è stato determinato considerando la diluizione più elevata del virus che causava effetti citotossici osservabili sulle colture cellulari. La differenza nei titoli virali tra il campione di controllo e quelli dei nanocompositi (espressa in Log₁₀) è stata utilizzata per quantificare la riduzione della carica virale, indicata nella Tabella 7 come Log. Rid. I valori riportati rappresentano la media ottenuta da più test di attività virucida su campioni dello stesso tipo.

Si conferma l'efficacia virucida della resina epossidica da sola contro tutti e tre i tipi di virus testati, con un'efficacia particolarmente marcata contro il Betacoronavirus. Al contrario, i

nanocompositi contenenti argilla mostrano, in media, un'efficacia virucida inferiore rispetto alla resina epossidica pura: questo effetto potrebbe essere attribuito alle differenti proprietà superficiali dei nanocompositi rispetto alla resina pura, inclusa la variazione della densità di carica superficiale e della morfologia, legata alla distribuzione delle nanoparticelle di argilla all'interno della matrice di resina epossidica. Si nota un'efficacia virucida particolarmente elevata dei nanocompositi contro il Betacoronavirus, mentre risulta essere minore nei confronti dell'Adenovirus.

I dati ottenuti sono la media dei risultati di test ripetuti su campioni differenti dello stesso materiale. A causa della variazione nella dispersione dell'argilla nella resina durante il processo di produzione, la superficie dei campioni di nanocompositi varia tra i diversi esemplari utilizzati nei test, introducendo un fattore di variabilità negli esperimenti che può influenzare i risultati individuali. Sulla base delle informazioni raccolte fino a questo momento, non è pertanto possibile stabilire una correlazione diretta tra il grado di attività virucida dei nanocompositi e la percentuale di argilla incorporata nella resina.

Campione	Valore	Virus					
		HSV-1		HCoV-OC43		Adv-5	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
Ctrl stock	Media	6,8		3,7		7,3	
Epossidica (Ctrl)	Media	3,3	2,8	2,0	1,0	6,5	6,7
E15A (3%)	Media	3,8	3,5	2,0	1,0	6,2	6,5
	Log. Rid	-0,5	-0,7	0,0	0,0	-0,3	-0,2
E15A (5%)	Media	4,3	4,3	1,5	1,7	6,0	6,7
	Log. Rid	-1,0	-1,5	-0,5	+0,7	-0,5	0,0

Tabella 7: Attività virucida della resina epossidica pura e dei nanocompositi a base di resina epossidica e di argilla artificiale Cloisite 15A (3% e 5% p/p) nei confronti dei virus *Herpesvirus* (HSV-1), *Betacoronavirus* (HCoVOC43) e *Adenovirus* (Adv-5) dopo 24 e 48 ore di contatto.

CAP. 5 - CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il lavoro svolto nell'ambito della presente tesi è parte di un ambizioso progetto di ricerca cofinanziato da INAIL che mira a progettare, realizzare, caratterizzare e testare nuovi nanocompositi multifunzionali a base polimerica contenenti argille (naturali e/o modificate in laboratorio) che esibiscano buone proprietà meccaniche, ma contemporaneamente possiedano attività antimicrobiche.

Il progetto trae origine da alcune recenti pubblicazioni scientifiche nelle quali viene descritto il meccanismo attraverso cui alcune argille mostrano proprietà antimicrobiche a seguito del rilascio di elementi metallici (soprattutto Fe, Al e Ca) in grado di interagire pesantemente con la membrana cellulare e il metabolismo di alcuni batteri. Di particolare interesse è l'osservazione che apparentemente il meccanismo d'azione è tale per cui i batteri non sviluppano resistenza: essendo i batteri a contatto con le argille da moltissimo tempo, eventuali modifiche a livello genetico tali da sviluppare resistenza, sarebbero già state sviluppate.

Il lavoro descritto in questa tesi rappresenta il proseguimento di esperimenti svolti in precedenza e il consolidamento di alcuni risultati.

Le prove di attività antimicrobica sono state eseguite dal Laboratorio Rischio Biologico dell'Inail (Roma) confermando i risultati precedenti e soprattutto offrendo numerosi altri stimoli e suggerimenti su come efficacemente proseguire nel lavoro. Un aspetto assolutamente innovativo affrontato nella presente tesi ha riguardato test di attività virucida eseguiti su alcuni nanocompositi preparati, che sono stati condotti presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Sezione di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia.

Di seguito vengono descritte in breve le attività svolte durante il periodo di tesi e i principali risultati ottenuti.

A. PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI RESINE EPOSSIDICHE COMMERCIALI E STUDIO DELLA LORO ATTIVITÀ ANTIMICROBICA. Durante studi precedenti relativamente alla attività antimicrobica di nanocompositi a base polimerica contenenti argille ci si era accorti che, contrariamente alle attese, le resine polimeriche tal quali esibivano di per sé attività antimicrobica, che quindi si è ritenuto utile indagare. Sono state prese in considerazione due resine epossidiche commerciali di largo uso (EC 157 e EPIKOTE RIM). Entrambe hanno mostrato una elevatissima attività antimicrobica nei confronti di *E.coli* e *S.aureus* quando i test sono stati eseguiti secondo la norma ISO 22196, ma esibendo attività inferiore quando i test sono stati eseguiti secondo una nuova modalità (condivisa tra i laboratori di

analisi che eseguono questi test) che simula meglio, in termini di umidità relativa e temperatura, le condizioni reali. I risultati sono in ogni caso di interesse.

Di particolare rilievo sono stati gli studi sulla attività antivirale eseguiti ponendo i materiali a contatto con tre tipologie di virus: si è osservato che la resina EPIKOTE RIM ha una notevole attività virucida in particolare nei confronti di HSV-1; entrambe le resine esplicano attività virucida nei confronti di HSV-1 e HCOV.

I test sono stati condotti secondo due modalità: per contatto con i materiali solidi e per contatto con il terreno di coltura in cui i materiali solidi sono stati immersi in precedenza (prove di rilascio). In quest'ultima condizione i risultati sono stati addirittura superiori. Questo dato però apre vari quesiti: si dovrà capire innanzitutto qual è la sostanza che viene rilasciata in particolare dal materiale EPIKOTE RIM che in apparenza vede prepolimero e indurente quasi identici rispetto alla resina EC157 (se ci si basa sulle schede di sicurezza). Per questa ragione si sono iniziati a studiare le miscele commerciali osservando che mentre lo spettro $^1\text{HNMR}$ dei due prepolimeri epossidici sono quasi identici, maggiori differenze si osservano negli spettri degli indurenti. Sono in corso analisi mediante HPLC-MS per identificare i componenti.

L'osservazione che l'attività virucida si espliciti soprattutto nei test da rilascio induce da un lato anche a valutare se anche l'attività antibatterica possa risultare implementata in queste condizioni e dall'altro apre il problema della permanenza dell'attività nel tempo, anche in presenza di pulizia delle superfici con prodotti disinfettanti.

Si eseguiranno prove in tal senso.

B. PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOCOMPOSITI CONTENENTI ARGILLE COMMERCIALI ORGANO-MODIFICATE. A partire dall'interesse per l'attività antimicrobica delle argille, si è individuata una argilla commerciale, Cloisite 15A, che è modificata con ioni ammonio contenenti lunghe catene alifatiche per avere compatibilizzazione con una matrice polimerica quando tale argilla è utilizzata come filler. Poiché è nota l'attività antimicrobica di ioni ammonio si è pensato di preparare nanocompositi a base epossidica contenenti 1%, 3% e 5% in peso di tale argilla e di testarne sia le proprietà meccaniche che quelle antimicrobiche. Si è osservato che le proprietà meccaniche vengono modificate dalla presenza di argilla, e in genere tendono a peggiorare perché le singole particelle di argille fungono da siti di innesco della cricca. Si potrebbe ovviare, almeno in parte a questo problema, peraltro noto nella letteratura scientifica, riuscendo a realizzare nanocompositi esfoliati e non solo intercalati. L'attività antibatterica dei nanocompositi risulta molto buona con una totale eliminazione di *E.coli* dopo 24 ore di contatto. Più complessi, anche se promettenti sono i risultati per quanto riguarda l'attività antivirale. Infatti si è osservata una

notevole attività nei confronti di HSV-1 e invece una grande variabilità, tra le diverse misure eseguite per gli altri virus testati. Questo ragionevolmente è legato alla natura della superficie dei nanocompositi, variabile qualora la dispersione dell'argilla non sia omogenea. Ci si ripromette quindi di ripreparare nuovamente i campioni prestando particolare attenzione alla dispersione dell'argilla sia per testare più accuratamente le proprietà meccaniche che quelle antimicrobiche, in particolare usando la resina EPIKOTE RIM, che di per sé si è dimostrata con maggiore attività antimicrobica.

Per quanto riguarda le proprietà meccaniche si fa osservare che tra i test eseguiti ci sono quelli che valutano le modalità di propagazione delle cricche (misure CT), che forniscono dati importanti in vista delle applicazioni pratiche di questi materiali.

Lo sviluppo futuro di questo progetto di ricerca prevede da un lato di realizzare opportune modifiche su argille con agenti ad attività antimicrobica e dall'altro di ottimizzare la quantità di argilla da introdurre nei nanocompositi per trovare il giusto compromesso con le proprietà meccaniche cercando di migliorare la dispersione e se possibile realizzare, almeno parzialmente, l'esfoliazione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Roy R., Roy R. A., and Roy D. M., Alternative perspectives on ‘quasi-crystallinity’: nonuniformity and nanocomposites, *Mater. Lett.*, 4 (8), 323–328, **1986**.
- [2] Chen Q., Beyond Snowflakes: Heterogeneity in Nanomaterials, *Nano Letters*, 22 (1), 3-5, **2022**.
- [3] H. Porwal, R. Sagar, Ceramic Matrix Nanocomposites, Comprehensive Composite Materials II, *Elsevier*, 138-161, **2018**.
- [4] Pan S., Wang T., Jin K. et al., Understanding and designing metal matrix nanocomposites with high electrical conductivity: a review. *J Mater Sci*, 57, 6487–6523, **2022**.
- [5] Nielsen L. E., Models for the Permeability of Filled Polymer Systems, *J. Macromol. Sci. Part - Chem.*, 1, 5929–942, **1967**.
- [6] Usuki A., Kojima Y., Kawasumi M., Okada A., Fukushima Y., Kurauchi T., et al. Synthesis of nylon 6– clay hybrid., *J. Mater. Res.*, 8.5, 1179-1184, **1993**.
- [7] Das P., Manna S., Behera A.K., Shee M., Basak P., Sharma A.K., Current synthesis and characterization techniques for clay-based polymer nano-composites and its biomedical applications: A review. *Environ Res.*, 212(Pt E):113534, **2022**.
- [8] Sahin O., Magonov S., Su C. et al. An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces. *Nature Nanotech*, 2, 507–514, **2007**.
- [9] Griffiths P., Fourier Transform Infrared Spectrometry, *Science*, 222.4621, 297-302, **1983**.
- [10] Baidurah S. Methods of Analyses for Biodegradable Polymers: A Review. *Polymers (Basel)*, 14(22), 4928, **2022**.
- [11] Whittig L. D., Allardice W. R., Methods of Soil Analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods. *Second Edition. Agronomy (USA)*, 291-32, **1986**.
- [12] Velde B., Composition and mineralogy of clay minerals. In: Origin and Mineralogy of Clays, *Springer-Verlag*, 8–42, **1995**.

- [13] R.A. Schoonheydt, C.T. Johnston, F. Bergaya, Clay minerals and their surfaces, In: Developments in Clay Science, *Elsevier*, 9, 1–21, **2018**.
- [14] Bergaya F., Theng B.K.G., Lagaly G. Handbook of Clay Science Developments in Clay Science, *Elsevier*, 1, 1-18, **2006**.
- [15] Pavón E., Alba M.D., Swelling layered minerals applications: A solid state NMR overview. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 124, 99-128, **2021**.
- [16] Schoonheydt R.A., Johnston C.T., Bergaya F., Clay minerals and their surfaces, In: Developments in Clay Science, *Elsevier*, 9, 1–21, **2018**.
- [17] Chamley H., Clay Minerals. In: Clay Sedimentology, *Springer*, 3–20, **1989**.
- [18] Wilson B.K., Prud'homme R.K., Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles, *J Colloid Interface Sci*, 604:208-220, **2021**.
- [19] Kaufhold S, Dohrmann R., Klinkenberg M., Siegesmund S., Ufer K., N(2)-BET specific surface area of bentonites, *J Colloid Interface Sci*, 349(1), 275-282 **2010**.
- [20] Hodgkinson P., Wimperis S., Solid-state NMR spectroscopy, *Phys Chem Chem Phys*, 11(32), 6875, **2009**.
- [21] Karlsson I., Ponting D.J., Ortega M.A., Niklasson I.B., Ndreu L., Stéen E.J.L., Seifert T., Luthman K., Karlberg A.T., Nature-Derived Epoxy Resin Monomers with Reduced Sensitizing Capacity—Isosorbide-Based Bis-Epoxydes, *Chem Res Toxicol.*, 36(2), 281-290, **2023**.
- [22] Mai Y. W., Yu Z. Z., Polymer Nanocomposites, *Woodhead-Publishing Limited*, 3-56, **2006**.
- [23] Mittal V., Optimization of Polymer Nanocomposite Properties, *John Wiley & Sons*, 1-20, **2009**.
- [24] Prolongo M.G., Martínez-Casado F.J., Masegosa R.M., Salom C., Curing and dynamic mechanical thermal properties of epoxy/clay nanocomposites, *J Nanosci Nanotechnol*, 10(4), 2870-2879 **2010**.

- [25] Alexandre M., Dubois P., Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials, *Mater. Sci. Eng. R.*, 28.1-2, 1-63, **2000**.
- [26]<http://www.storiadellafarmacia.it/ii-storia/1-le-origini/>
- [27] Salvoni F., Review of *The papyrus Ebers. The greatest egyptian medical document, Aegyptus*, 20, 3, 240-44, **1940**.
- [28] Pavlidou S., Papaspyrides C.D., A review on polymer-layered silicate nanocomposites. *Elsevier*, 33.12, 1119-1198, **2008**.
- [29] Kornmann X., Lindberg H., Berglund L.A., Synthesis of epoxy-clay nanocomposites: influence of the nature of the clay on structure., *Polymer*, 42.10, 4493-4499, **2001**.
- [30] Beyer G., Nanocomposites: a new class of flame retardants for polymers, *Plast. Addit. Compound*, 4.10, 22-28, **2002**.
- [31] Vaia R.A., Giannelis E.P., Polymer melt intercalation in organically-modified layered silicates, *Macromolecules*, 30.25, 8000-8009, **1997**.
- [32] Vaia R.A., Ishii H., Giannelis E.P., Synthesis and properties of two-dimensional nanostructures by direct intercalation of polymer melts in layered silicates, *Chem. Mater.*, 298.5600, 1942-1946, **1993**.
- [33] Fischer H., Polymer nanocomposites: from fundamental research to specific applications. *Mater. Sci. Eng.*, 23.6-8, 763-772, **2003**.
- [34] Hughes D., Andersson D.I., Evolutionary Trajectories to Antibiotic Resistance, *Annu Rev Microbiol.*, 71:579-596, **2017**.
- [35] Lakhundi S., Zhang K., Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology., *Clin Microbiol Rev.*, 31(4), **2018**.
- [36] Morrison K. D., Misra R., Williams L., Unearthing the Antibacterial Mechanism of Medicinal Clay: A Geochemical Approach to Combating Antibiotic Resistance, *Sci Rep.*, 6.1, 1-13, **2016**.

- [37] Sánchez-López E., Gomes D., Esteruelas G., Bonilla L., Lopez-Machado A.L., Galindo R., Cano A., Espina M., Ettcheto M., Camins A., Silva A.M., Durazzo A., Santini A., Garcia M.L., Souto E.B., Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview, *Nanomaterials* (Basel), 10(2):292, **2020**.
- [38] Bartolozzi A., Bertani R., Burigo E., Fabrizi A., Panozzo F., Quaresimin M., Simionato F., Sgarbossa P., Tamburini S., Zappalorto M., Zorzi F., Multifunctional Cu²⁺ montmorillonite/epoxy resin nanocomposites with antibacterial activity, *Journal of Applied Polymer Science*, 134.16, **2016**.
- [39] Khezerlou A., Alizadeh-Sani M., Azizi-Lalabadi M., Ehsani A., Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses, *Microb Pathog.*, 123:505-526, **2018**.
- [40] Williams L. B., Metge D. W., Eberl D. D., Harvey R. W., Turner A. G., Prapaipong P., Poret-Peterson A.T. What makes a natural clay antibacterial?, *Environ. Sci. Technol.*, 45.8, 3768-3773, **2011**.
- [41] Bertani R., Bartolozzi A., Pontefisso A., Quaresimin M., Zappalorto M. Improving the Antimicrobial and Mechanical Properties of Epoxy Resins via Nanomodification: An Overview., *Molecules*, 26.17, 5426, **2021**.
- [42] Huang K.S., Yang C.H., Huang S.L., Chen C.Y., Lu Y.Y., Lin Y.S., Recent Advances in Antimicrobial Polymers: A Mini-Review, *Int J Mol Sci*, 17(9), 1578, **2016**.
- [43] Jain A., Duvvuri L.S., Farah S., Beyth N., Domb A.J., Khan W., Antimicrobial polymers. *Adv Healthc Mater.*, 3(12):1969-1985, **2014**.
- [44] Ray P. D., Huang B. W., Tsuji Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling., *Cell Signal.*, 24.5, 981-990, **2012**.
- [45] Deka S.R., Sharma A.K., Kumar P. Cationic polymers and their self-assembly for antibacterial applications., *Curr. Top. Med. Chem.*, 15(13), 1179-1195, **2015**.
- [46] Li W.R., Xie, X.B., Shi Q.S. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli., *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 1115–1122, **2010**.

- [47] Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology Advances*, 27, 1, 76-8, **2009**.
- [48] Hahn C., Hans M., Hein C., Dennstedt A., Mücklich F., Rettberg P., Hellweg C.E., Leichert L.I., Rensing C., Moeller R., Antimicrobial properties of ternary eutectic aluminum alloys, *Biometals*, 31(5), 759-770, **2018**.
- [49] Palza H., Gutiérrez S., Delgado K., Salazar O., Fuenzalida V., Avila J.I., Figueroa G. and Quijada R., Toward Tailor-Made Biocide Materials Based on Poly(propylene)/Copper Nanoparticles, *Macromol. Rapid Commun.*, 31, 563-567, **2010**.
- [50] Huppmann T., Yatsenko S., Leonhardt S., Krampe E., Radovanovic I., Bastian M., Wintermantel E., Antimicrobial polymers-The antibacterial effect of photoactivated nano titanium dioxide polymer composites, *AIP Conference Proceedings*, 1593, 440-443, **2014**.
- [51] Wasa A., Land J.G., Gorthy R., Krumdieck S., Bishop C., Godsoe W., Heinemann J.A., Antimicrobial and biofilm-disrupting nanostructured TiO₂ coating demonstrating photoactivity and dark activity, *FEMS Microbiol Lett.*, 368(7), **2021**.
- [52] Kubo T., Yasuda K., Tominaga Y., Otsuka K., Hosoya K., Antibacterial activities effectuated by co-continuous epoxy-based polymer materials, *Colloid Surf. B.*, 107, 53-58, **2013**.
- [53] Sjollem J., Zaat S.A.J., Fontaine, V., Ramstedt M., Luginbuehl R., Thevissen K., Li J., van der Mei H.C., Busscher H.J. In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs, *Acta Biomater.*, 70, 12-24, **2018**.
- [54] Haghghi F., Roudbar Mohammadi S., Mohammadi P., Hosseinkhani S., Shidpour R., Antifungal Activity of TiO₂ nanoparticles and EDTA on *Candida albicans* Biofilms, *Infection, Epidemiology & Medicine*, 1, 33-38, **2013**.
- [55] Gutiérrez J.A., Caballero S., Díaz L.A., Guerrero M.A., Ruiz J., Ortiz C.C., High Antifungal Activity against *Candida* Species of Monometallic and Bimetallic Nanoparticles Synthesized in Nanoreactors, *ACS Biomater Sci Eng.*, 4(2), 647-653, **2018**.
- [56] Wigginton K.R., Kohn T., Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function., *Curr Opin Virol.*, 2(1), 84-89, **2012**.

- [57] Wang S., Liang B., Wang W., Li L., Feng N., Zhao Y., Wang T., Yan F., Yang S., Xia X., Viral vectored vaccines: design, development, preventive and therapeutic applications in human diseases, *Signal Transduct Target Ther.*, 8(1), 149, **2023**.
- [58] Wigginton K.R., Kohn T., Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. *Curr Opin Virol.*, 2(1), 84-89, **2012**.
- [59] Śmiłowicz D., Metzler-Nolte N., Bioconjugates of Co(III) complexes with Schiff base ligands and cell penetrating peptides: Solid phase synthesis, characterization and antiproliferative activity., *J Inorg Biochem.*, 206:111041, **2020**.
- [60] Hajkova P., Spatenka P., Horsky J., Horska I., Kolouch A., Photocatalytic effect of TiO₂ films on viruses and bacteria, *Plasma Process. Polym.*, 4(1), 397-401, **2007**.
- [61] Ghosh S., Mondol S., Lahiri D., Nag M., Sarkar T., Pati S., Pandit S., Alarfaj A.A., Mohd Amin M.F., Edinur H.A., Ahmad Mohd Zain M.R., Ray R.R., Biogenic silver nanoparticles (AgNPs) from *Tinosporacordifolia* leaves: An effective antibiofilm agent against *Staphylococcus aureus* ATCC 23235, *Front Chem.*, 11:1118454, **2023**.
- [62] Thi Ngoc Dung T., Thi Thu Thuy N., Hau V.T.B., Thi Nhan T., Thi Yen Chi N., Viet Quang D., Potential application of chitosan stabilized silver nanoparticles for simultaneous control of dengue virus and mosquito vectors., *Nanotechnology.*, 34(2), **2022**.
- [63] Sharma V., Kaushik S., Pandit P., Dhull D., Yadav J.P., Kaushik S., Green synthesis of silver nanoparticles from medicinal plants and evaluation of their antiviral potential against chikungunya virus., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 103(2), 881-891, **2019**.
- [64] Orłowski P., Kowalczyk A., Tomaszewska E., Ranhoszek-Soliwoda K., Węgrzyn A., Grzesiak J., Celichowski G., Grobelny J., Eriksson K., Krzyzowska M., Antiviral Activity of Tannic Acid Modified Silver Nanoparticles: Potential to Activate Immune Response in Herpes Genitalis., *Viruses.*, 10(10), 524, **2018**.
- [65] Berthomieu C., Hienerwadel R., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy., *Photosynth Res.*, 101(2-3), 157-170, **2009**.
- [66] Bunaciu A.A., Udriștioiu E.G., Aboul-Enein H.Y., X-ray diffraction: instrumentation and applications, *Crit Rev Anal Chem.*, 45(4), 289-299, **2015**.

- [67] XL30 Options Manual, XL30 ESEM Series, Scanning Electron Microscope, FEI Company and Philips, 2.6, **1998**.
- [68] Feng X., Zhang H., Yu P., X-ray fluorescence application in food, feed, and agricultural science: a critical review., *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 61(14), 2340-2350, **2021**.
- [69] Donghi D., Johannsen S., Sigel R.K., Freisinger E., NMR spectroscopy in bioinorganic chemistry, *Chimia (Aarau)*, 66(10), 791-797, **2012**.
- [70] ISO 527-2, Plastics - Determination of tensile properties. Part 2: Test conditions for moulding and extrusion plastics., *International Organization for Standardization*, **2012**.
- [71] ASTM D5045-14. Standard test methods for plane-strain fracture toughness and strain energy release rate of plastic materials, **2022**.
- [72] ISO 22196:2011, Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces. International Organization for Standardization, **2012**.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Roberta Bertani, che in qualità di relatrice mi ha permesso di raggiungere questo importante traguardo, aiutandomi ed incitandomi alla stesura della tesi. Le auguro il meglio per questo finale di carriera ed un felice e spensierato pensionamento. Doveroso ringraziare anche il mio correlatore, il dott. Mario Rigo, soprannominato “Super Mario” per un motivo ben preciso: senza le sue straordinarie capacità, simpatia e supporto morale datomi tutto questo non sarebbe potuto succedere. Anche a lui auguro il meglio per il proseguo della sua carriera, che sono sicuro sarà piena di soddisfazioni.

Ringrazio la mia famiglia, tutti hanno sempre creduto in me anche quando io stesso non ero in grado di farlo da solo, in particolare mia madre, la sua pazienza e le dolci parole che ha speso per me non le dimenticherò mai, mi auguro di raggiungere almeno la metà della forza che Tu Mamma mi hai sempre dimostrato.

Ringrazio i miei compagni e fedeli amici dell’università, in questo viaggio percorso insieme, nonostante vivessero le mie stesse paure, hanno sempre trovato il tempo per aiutarmi, confrontarsi e confortarmi.

Una dedica va anche agli amici fuori dall’ambito accademico, Alessandro, Marco, Roberto e Simone, che hanno saputo ascoltarmi e regalarmi sorrisi, rendendo le difficoltà più leggere.

Ora mi rivolgo direttamente a Te, Papà. Sono un po’ di anni che non sei più qui vicino a me, è stata davvero dura senza il tuo supporto ed i tuoi insegnamenti, ma sono sicuro che come me in questo momento che sto scrivendo queste frasi, ti saresti emozionato, e saresti orgoglioso di questo raggiungimento. Ti ringrazio per avermi fatto diventare ciò che sono, a te e a mamma la mia dedica più grande.

Infine, voglio ringraziare me stesso, che davanti ai fallimenti ho deciso di non mollare mai, seguendo gli obiettivi che mi sono imposto. Dopo anni e anni di studio, adesso mi auguro da solo una vita di tanti altri importanti traguardi che mi facciano vivere senza rimpianti.