

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

**Produzione e caratterizzazione di  
bioplastiche a base di alcol polivinilico e  
proteine da larve di *Hermetia illucens***



**Azienda**

CNR STIIMA sede di Biella

**Relatore**

Prof.ssa Dalle Vacche Sara

**Correlatore**

Dott.ssa Zoccola Marina

**Candidato**

Di Pasquale Alessia

Marzo 2025



# Indice

Elenco delle tabelle

Elenco delle figure

1. Introduzione .....	1
2. Hermetia illucens nell'economia circolare e l'importanza delle bioplastiche .....	3
2.1. Hermetia Illucens .....	3
2.2. Sostenibilità ed Economia Circolare attraverso i Principi della Green Chemistry .....	4
2.3. Bioplastiche.....	6
3. Preparazione delle proteine e purificazione del PVA .....	9
3.1. Materiali .....	9
3.2. Preparazione delle proteine .....	10
3.2.1. Apparecchiature per il processo di idrolisi.....	10
3.2.2. Specifiche autoclave con agitatore da cinque litri.....	11
3.2.3. Estrazione delle proteine con idrolisi in autoclave.....	12
3.2.4. Processi di purificazione degli idrolizzati e calcolo delle rese di estrazione .....	13
3.2.5. Risultati e selezione delle condizioni di estrazione.....	16
3.2.6. Caratterizzazione delle larve di Hermetia illucens e degli estratti proteici.....	17
3.3. Purificazione del PVA.....	22
3.3.1. Estrazione Soxhlet.....	22
3.3.2. Calcolo della concentrazione di PVA nella soluzione .....	23
4. Produzione e caratterizzazione delle bioplastiche.....	25
4.1. Preparazione delle bioplastiche .....	25
4.2. Caratterizzazione delle bioplastiche.....	27
4.2.1. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR) .....	27
4.2.2. Analisi Termogravimetrica (TGA).....	27
4.2.3. Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) .....	28
4.2.4. Solubilità in acqua.....	30
4.2.5. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) .....	31
4.2.6. Water uptake .....	34
4.2.7. Spessore.....	35
4.2.8. Dinamometria.....	37
4.2.9. Angolo di contatto .....	39
4.2.10. Test di biodegradabilità.....	40
4.3. Risultati e discussione .....	41

4.3.1. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR) .....	41
4.3.2. Analisi Termogravimetrica (TGA).....	43
4.3.3. Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) .....	45
4.3.4. eSolubilità in acqua .....	47
4.3.5. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) .....	49
4.3.6. Water uptake .....	54
4.3.7. Spessore.....	55
4.3.8. Dinamometria.....	56
4.3.9. Angolo di contatto .....	58
4.3.10. Test di biodegradabilità.....	59
5. Conclusioni.....	63
6. Bibliografia.....	65
A. Appendice - Cenni teorici sulle tecniche di analisi utilizzate .....	i
A.1. Spettrometro a Infrarossi con Trasformata di Fourier (FT-IR) .....	i
A.1.1. Principio .....	i
A.1.2. Riflessione totale attenuata (ATR) .....	iii
A.2. Analizzatore termogravimetrico (TGA).....	iv
A.3. Calorimetro a scansione differenziale (DSC).....	v
A.4. Microscopio elettronico a scansione (SEM) .....	vii
A.4.1. Principio .....	vii
A.4.2. Componenti .....	viii
A.5. Microscopio ottico.....	ix
A.6. Dinamometro.....	ix
A.7. Goniometro ottico.....	ix
A.7.1. Principio .....	ix
A.7.2. Misurazione e valutazione.....	x

Ringraziamenti

## **Elenco delle tabelle**

<b>Tabella 3.1</b> Misure per calcolo peso secco .....	16
<b>Tabella 3.2</b> Misure per il calcolo della resa di estrazione .....	16
<b>Tabella 3.3</b> Misure per il calcolo della percentuale di umidità nel PVA .....	24
<b>Tabella 4.1</b> Composizione delle soluzioni PVA/Proteine .....	25
<b>Tabella 4.2</b> Parametri termici TGA film PVA/proteine con diverse composizioni .....	45
<b>Tabella 4.3</b> Calcolo del grado di cristallinità relativo del PVA .....	46
<b>Tabella 4.4</b> Proprietà meccaniche dei film PVA/proteine con diverse composizioni.....	57
<b>Tabella 4.5</b> Angolo di contatto dei film PVA/proteine con diverse composizioni .....	59

## Elenco delle figure

<b>Figura 2.1</b> Stadi evolutivi di <i>Hermetia illucens</i> .....	3
<b>Figura 2.2</b> La trasformazione dei rifiuti alimentari in risorse ad alto valore aggiunto con l'utilizzo di <i>Hermetia illucens</i> nel progetto HI-Tech .....	5
<b>Figura 2.3</b> Classificazione delle bioplastiche secondo l'Organizzazione Europea delle Bioplastiche.....	7
<b>Figura 3.1</b> Campione di larve di <i>Hermetia illucens</i> .....	9
<b>Figura 3.2</b> Filamento di PVA (a) e struttura chimica dell'alcol polivinilico (b).....	10
<b>Figura 3.3</b> Autoclave Amar Equipment da 5L (a) e il suo pannello di controllo (b).....	12
<b>Figura 3.4</b> Centrifuga Jouan MR1822 dall'esterno (a) e all'interno (b) .....	14
<b>Figura 3.5</b> Bilancia analitica Sartorius Analytic (a) e campana essiccante (b) .....	14
<b>Figura 3.6</b> Campioni essiccati della parte liquida dei centrifugati e della parte solida precipitata nell'idrolizzato dopo l'idrolisi.....	15
<b>Figura 3.7</b> FT-IR NEXUS Thermo Nicolet con dispositivo ATR .....	17
<b>Figura 3.8</b> Spettri FT-IR di larve di <i>Hermetia illucens</i> prima e dopo estrazione con esano, con riferimento di chitina Sigma.....	18
<b>Figura 3.9</b> Spettri FT-IR della parte liquida essiccata di idrolizzati di larve di <i>Hermetia illucens</i> a diverse condizioni operative con riferimento delle larve dopo estrazione Soxhlet. ....	19
<b>Figura 3.10</b> Spettri FT-IR della parte liquida e solida essiccata di idrolizzati di larve di <i>Hermetia illucens</i> , con riferimento a ceneri ottenute da larve di <i>Hermetia illucens</i> .....	21
<b>Figura 3.11</b> Matassatrice (a) e matassa risultante dal processo (b).....	22
<b>Figura 3.12</b> Estrattori Soxhlet (a) e assemblamento nel pallone con la camera di estrazione (b) .....	23
<b>Figura 4.1:</b> Bagno termostato (a) e soluzioni con diverse percentuali PVA/proteine (b) ....	25
<b>Figura 4.2</b> Vortex Velp .....	26
<b>Figura 4.3</b> Film PVA/proteine (da sinistra verso destra in percentuali: 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 1 10/90, 0/100) .....	26
<b>Figura 4.4</b> TGA Mettler Toledo .....	27
<b>Figura 4.5</b> DSC 821° Mettler Toledo .....	28
<b>Figura 4.6</b> Bilancia microanalitica Mettler MT5 .....	29
<b>Figura 4.7</b> Sistema di filtrazione sottovuoto (a) con filtro di carta 5 $\mu$ m (b).....	31
<b>Figura 4.8</b> SEM ZEISS .....	32
<b>Figura 4.9</b> Kit di preparazione dei campioni per la SEM .....	32
<b>Figura 4.10</b> Metallizzatore Quorum.....	33
<b>Figura 4.11</b> SEM Dual Joystick e schermata Stage Navigation.....	34
<b>Figura 4.12</b> Stufa Memmert HPP 260.....	35
<b>Figura 4.13</b> Comparatore digitale Fowler .....	36

<b>Figura 4.14</b> Microscopio ottico Leica DMLP .....	36
<b>Figura 4.15</b> Serbatoio criogenico di azoto liquido .....	37
<b>Figura 4.16</b> Dinamometro Zwick Roell Z005 .....	38
<b>Figura 4.17</b> Morsetti da 50 N del dinamometro (a) e lente con luce circolare da tavolo (b) ..	38
<b>Figura 4.18</b> Goniometro ottico EasyDrop .....	39
<b>Figura 4.19</b> Ago goniometro ottico(a) e dispositivo per la produzione di acqua ultrapura(b)	40
<b>Figura 4.20</b> Vaso con film di PVA/proteine con diverse composizioni all'interno di sacchetti di PET .....	41
<b>Figura 4.21</b> Spettri FT-IR dei film PVA/proteine con diverse composizioni .....	42
<b>Figura 4.22</b> TGA dei film PVA/proteine con diverse composizioni .....	43
<b>Figura 4.23</b> DTG dei film PVA/proteine con diverse composizioni .....	44
<b>Figura 4.24</b> DSC dei film PVA/proteine con diverse composizioni .....	46
<b>Figura 4.25</b> Solubilità dei film PVA/proteine a diverse composizioni .....	47
<b>Figura 4.26</b> Immagini SEM a 16X dei film PVA/proteine con diverse composizioni (in ordine come percentuali 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100) .....	50
<b>Figura 4.27</b> Immagini SEM a 100X dei film PVA/proteine con diverse composizioni (in ordine come percentuali 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100) .....	51
<b>Figura 4.28</b> Immagini SEM a 1000X dei film PVA/proteine con diverse composizioni (in ordine come percentuali 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100) .....	52
<b>Figura 4.29</b> Water Uptake dei film PVA/proteine a diverse composizioni .....	54
<b>Figura 4.30</b> Spessore film PVA/proteine con diverse composizioni .....	55
<b>Figura 4.31</b> Immagine al microscopio ottico della sezione trasversale del film .....	56
<b>Figura 4.32</b> Curve sforzo-deformazione dei film PVA/proteine con diverse composizioni...	56
<b>Figura 4.33</b> Immagini dell'angolo di contatto dei film PVA/proteine con diverse composizioni (in ordine come percentuali 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70) .....	58
<b>Figura 4.34</b> Perdita di peso dei film PVA/proteine con diverse composizioni .....	60
<b>Figura 4.35</b> Spettri FT-IR dei film PVA/proteine con diverse composizioni come percentuali (30/70,50/50,70/30,90/10,100/0) durante diversi giorni dei test di biodegradabilità.....	61
<b>Figura A.1</b> Processo strumentale FT-IR.....	i
<b>Figura A.2</b> Valori di assorbimento nell'infrarosso tipici per vari tipi di legami.....	iii
<b>Figura A.3</b> Riflessione multipla dell'ATR.....	iv
<b>Figura A.4</b> Schema di una cella DSC a flusso di calore con un sistema di misura a disco .....	vi
<b>Figura A.5</b> Colonna SEM.....	viii
<b>Figura A.6</b> Angolo di contatto per un materiale idrofilo (a sinistra) e idrofobico (a destra) ....	x
<b>Figura A.7</b> Schema della misurazione dell'angolo di contatto con goccia sessile.....	xi



# 1. Introduzione

Negli ultimi anni, la consapevolezza ambientale riguardo all'uso di materiali plastici convenzionali è cresciuta notevolmente, incentivando lo sviluppo di soluzioni biodegradabili e sostenibili. La ricerca si sta orientando verso materiali bioplastici che possano degradarsi rapidamente, prodotti inoltre da risorse rinnovabili o con un basso impatto ecologico. In questa tesi, è stata sperimentata la combinazione di alcol polivinilico (PVA) e proteine estratte da fonti naturali per la produzione di bioplastiche. Il PVA è un polimero idrosolubile dalle eccellenti proprietà meccaniche, biocompatibile e facilmente biodegradabile in condizioni ambientali controllate. Le proteine, d'altra parte, possono derivare da insetti alimentati da prodotti di scarto, i quali rappresentano quindi una risorsa proteica interessante grazie alla loro abbondanza. In particolare, la mosca soldato nera (*Hermetia illucens*), costituisce una fonte proteica sostenibile, il cui allevamento richiede un impiego minimo di risorse, permettendo la conversione di rifiuti organici in biomassa proteica. I film bioplastici con proteine estratte da *Hermetia illucens* e incorporate in una matrice di PVA sono stati prodotti e caratterizzati, analizzando come la variazione nelle proporzioni di PVA e proteine influenzi la composizione dei film e le loro proprietà chimiche, morfologiche, fisiche, meccaniche, di bagnabilità e degradative. L'analisi di queste proprietà mira ad ottenere una comprensione delle interazioni tra PVA e proteine cercando di proporre un materiale biodegradabile e sostenibile che possa avere delle applicazioni pratiche.

Oltre a questa introduzione, la tesi è articolata in quattro capitoli principali, la bibliografia e un'appendice, in cui vengono descritte nel dettaglio le tecniche analitiche impiegate.

- Nel capitolo "***Hermetia illucens* nell'economia circolare e l'importanza delle bioplastiche**" si offre una panoramica sulla mosca soldato nera, allevata per ottenere proteine, lipidi e chitina, materiali impiegati in diversi ambiti e il suo ruolo all'interno della bioeconomia circolare. Viene inoltre esplorato il tema delle bioplastiche, con una classificazione e un'analisi dei vantaggi ambientali. Infine, il concetto di sostenibilità viene esaminato attraverso i principi della green chemistry, sottolineando come l'uso di risorse rinnovabili e processi a basso impatto ambientale possa contribuire allo sviluppo di materiali più sostenibili.
- Nel capitolo "**Produzione delle proteine e purificazione del PVA**" ci si concentra sulla preparazione delle materie prime necessarie per la sintesi delle bioplastiche. Inizialmente viene descritto il trattamento delle larve di *Hermetia illucens*, sottoposte a specifici processi per la successiva l'estrazione delle proteine tramite idrolisi in autoclave con acqua surriscaldata. Viene fatto uno studio sull'influenza di diverse variabili operative sulla resa e sulla qualità dell'estratto, attraverso l'analisi FT-IR, per caratterizzare la composizione chimica degli idrolizzati, oltre che delle larve e della parte solida residua. In seguito, si parla della purificazione del PVA, realizzata attraverso un'estrazione Soxhlet per eliminare eventuali impurità.
- Nel capitolo "**Produzione e caratterizzazione delle bioplastiche**" viene approfondito il metodo per ottenere le bioplastiche combinando PVA e proteine in proporzioni diverse. Successivamente si illustrano le tecniche analitiche per valutarne le proprietà. Tra queste, la spettroscopia FT-IR, utile per verificare la presenza e l'interazione dei gruppi funzionali, l'analisi termogravimetrica e la calorimetria a scansione differenziale (DSC), impiegate per studiare il comportamento termico dei materiali, e la microscopia elettronica a scansione (SEM), per analizzarne la morfologia superficiale. Inoltre, sono stati misurati parametri come la solubilità in acqua con una filtrazione sottovuoto, l'assorbimento di umidità e lo spessore attraverso un comparatore digitale e un microscopio ottico.

Quest'ultimo parametro è servito per le successive prove di resistenza meccanica, condotte attraverso test di trazione con dinamometro, che hanno permesso di valutare la robustezza dei film. Successivamente si è misurato l'angolo di contatto con un goniometro ottico, utile per valutare la bagnabilità del materiale, ed infine è stata esaminata la biodegradabilità attraverso dei test in vaso.

- Nel capitolo “**Conclusioni**” si raccolgono gli esiti dello studio, analizzando come la composizione influenzi le varie proprietà dei film e si cerca di correlare i vari risultati. Questi evidenziano il potenziale della combinazione tra PVA e proteine di *Hermetia illucens*, suggerendo che, pur presentando caratteristiche promettenti, alcuni aspetti hanno necessità di ulteriori ottimizzazioni.

L'argomento di questa tesi si colloca all'interno del progetto di ricerca di rilevante interesse nazionale (PRIN), finanziato attraverso il Bando 2022, intitolato: "*Hermetia illucens* biofactory: from waste to high value technological products".

## 2. *Hermetia illucens* nell'economia circolare e l'importanza delle bioplastiche

Questo capitolo esplora il contributo della *Hermetia illucens* nell'ambito della sostenibilità, grazie alla sua capacità di convertire scarti organici in biomassa ad alto valore aggiunto. Viene analizzato il potenziale del suo allevamento per ridurre lo spreco alimentare e per favorire lo sviluppo di materiali innovativi, tra cui le bioplastiche. Un approfondimento è dedicato ai principi della green chemistry e alla loro applicazione in questa tesi. Infine, il capitolo introduce il concetto di bioplastica, mettendo in evidenza le caratteristiche e i vantaggi che può offrire.

### 2.1. *Hermetia Illucens*

*Hermetia illucens*, nota anche come mosca soldato nera o BSF (Black Soldier Fly), è un insetto dell'ordine Diptera e della famiglia Stratiomyidae ed è una specie originaria del Sud America, ma attualmente diffusa a livello cosmopolita, data la sua capacità di adattarsi a numerosi ambienti e diverse fonti alimentari. Questi insetti vengono spesso allevati in impianti pilota alimentati con materiali in decomposizione, come scarti dell'industria agroalimentare o acquacoltura, e scarti della grande distribuzione, potendo bioconvertire i rifiuti organici. In questo modo ne si riduce significativamente il volume, trasformandoli in una biomassa ad alto valore aggiunto contenente lipidi, proteine e chitina che, a loro volta, possono essere ulteriormente estratti per la produzione di prodotti bioderivati [1].

Il ciclo vitale di *Hermetia Illucens* si compone di quattro stadi principali, come mostrato in **Figura 2.1** fino alla metamorfosi completa. Il primo stadio è rappresentato dalle uova, deposte in prossimità di materiale organico in decomposizione. Successivamente, dalle uova fuoriescono le larve, che crescono rapidamente accumulando massa corporea. Raggiunta la maturazione, diventano prima prepupe, dove smettono di alimentarsi e la loro pelle si indurisce, e subito dopo pupe, le quali subiscono la metamorfosi in adulti alati, che si concentrano esclusivamente sulla riproduzione [2].



**Figura 2.1** Stadi evolutivi di *Hermetia illucens* [3]

La mosca soldato nero è utilizzata soprattutto durante la sua fase larvale, durante la quale ha la capacità di accumulare grandi quantità di grassi e proteine. Le larve, durante la digestione, riducono drasticamente la presenza di batteri patogeni come *Salmonella* ed *Escherichia coli*, dato che regolano il pH del substrato portandolo a valori più alcalini, in quanto producono ammoniaca grazie alla loro attività enzimatica [4].

Inoltre, soprattutto durante la fase larvale, questi insetti, oltre a trasformare i rifiuti in biomassa ad alto valore aggiunto, generano anche un sottoprodotto chiamato "frass", ovvero il residuo

organico, che è ricco di nutrienti come azoto, fosforo e potassio, così da poterlo impiegare come fertilizzante organico [5]. Per di più, gli adulti di *Hermetia illucens*, che vivono solo pochi giorni, non si nutrono, riducendo così il rischio di trasmissione di malattie, dato che non diffondono patogeni [6].

Le proteine estratte da questo insetto possono diventare materie prime per bioplastiche, che possono essere utilizzate per le pacciamature agricole come un'alternativa sostenibile ai materiali plastici tradizionali, i quali sono una fonte di inquinamento a causa della frammentazione e dell'incapacità di biodegradarsi completamente. Queste bioplastiche, oltre a proteggere il suolo, fanno anche da fertilizzanti durante la degradazione del film, che può rilasciare nutrienti come l'azoto e il carbonio [7,8]. Inoltre, le proteine possono essere utilizzate come coloranti naturali per tessuti o come fonte proteica nei mangimi animali. I lipidi, invece, essendo ricchi di acido laurico possono essere impiegati per sviluppare tensioattivi o per la produzione di biocarburante, il quale possiede caratteristiche simili a quelle del biodiesel ottenuto dall'olio di colza, ma si distingue per essere più sostenibile e meno costoso, poiché deriva da rifiuti e non da colture agricole. [1,9]. Infine, la chitina derivante soprattutto dalle esuvie, ovvero gli esoscheletri lasciati dalle pupe dopo la muta, dopo un processo di deacetilazione può essere trasformata in chitosano, un materiale biocompatibile, biodegradabile e non tossico e quindi applicabile in settori quali la chirurgia, il packaging alimentare e la cosmetica, offrendo un'alternativa rinnovabile all'ammoniaca di origine fossile per la produzione di composti contenenti azoto [9].

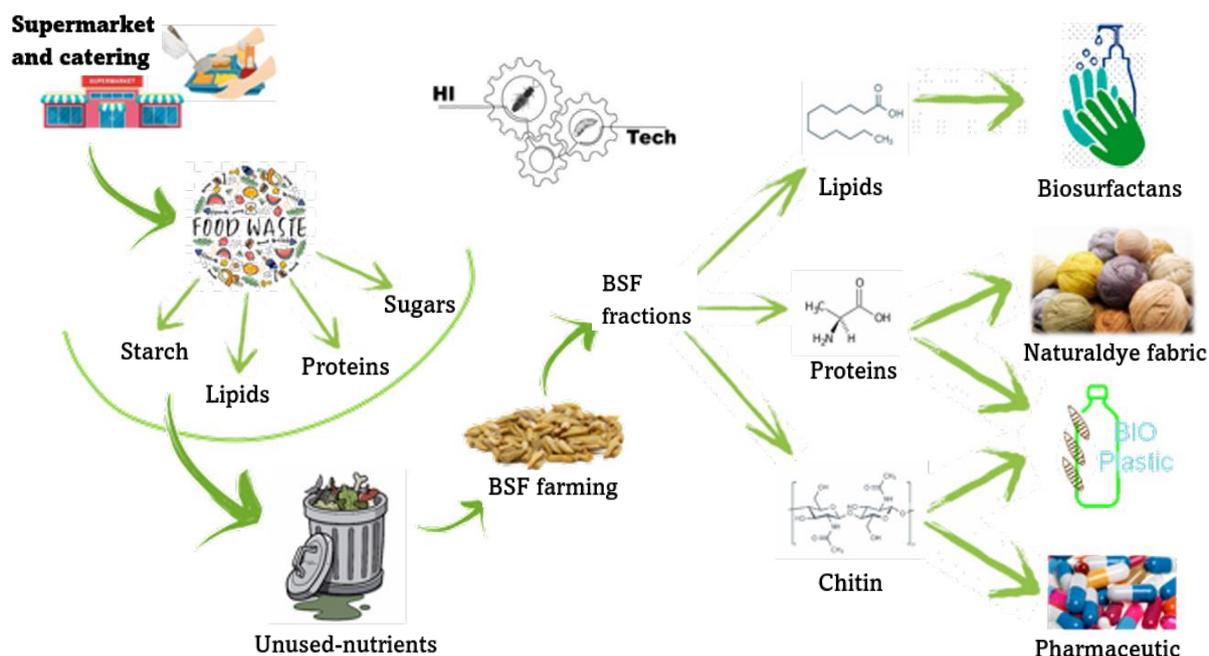
Nonostante i numerosi vantaggi, l'allevamento di BSF presenta alcune sfide, tra cui l'ottimizzazione dei substrati alimentari per ottenere rese migliori, le regolamentazioni sanitarie che garantiscano la sicurezza dei prodotti derivati e gli investimenti in infrastrutture per l'implementazione su larga scala [5].

## 2.2. Sostenibilità ed Economia Circolare attraverso i Principi della Green Chemistry

L'utilizzo di *Hermetia illucens*, oltre a valorizzare i sottoprodotti alimentari non utilizzati, diminuisce la massa dei rifiuti da conferire in discarica e contribuisce a risolvere problematiche ambientali legate ad essa, come le emissioni di metano generate dalla decomposizione anaerobica dei rifiuti, e la contaminazione del suolo e delle acque. L'allevamento di questo insetto richiede inoltre relativamente risorse idriche minime e estensioni di terreno ridotte [5].

Come già spiegato, questi insetti sono in grado di convertire materiale organico di scarso valore in una biomassa ricca di sostanze utili, quali proteine, lipidi e chitina. Questa biomassa integrata e concentrata offre un notevole vantaggio, ovvero consente di ottenere simultaneamente queste risorse senza doverle produrre separatamente tramite processi industriali complessi e spesso dispendiosi. I componenti della biomassa possono poi essere estratti e separati grazie a processi il più possibile sostenibili, ottimizzando l'efficienza e riducendo i costi produttivi complessivi. Questo approccio circolare non solo mitiga l'impatto ambientale, ma rende anche economicamente sostenibile la produzione di questi composti chimici per diverse applicazioni come mostrato in **Figura 2.2**.

In definitiva, i rifiuti vengono reintegrati in un ciclo produttivo continuo, dove ogni elemento trova una nuova utilità, provvedendo a una riduzione dei rifiuti, un minore sfruttamento delle risorse naturali e alla creazione di nuovi settori economici e posti di lavoro.



**Figura 2.2** La trasformazione dei rifiuti alimentari in risorse ad alto valore aggiunto con l'utilizzo di *Hermetia illucens* nel progetto HI-Tech [9]

In questo studio, per estrarre le proteine, si è utilizzata un'idrolisi che utilizza acqua surriscaldata come solvente, offrendo un'alternativa innovativa ai tradizionali processi chimici che impiegano acidi e basi forti che, pur risultando spesso efficaci, richiedono complesse e costose fasi di purificazione, oltre a essere ecologicamente meno sostenibili rispetto all'acqua. Questo approccio riduce drasticamente i rifiuti pericolosi e i rischi ambientali, mantenendo al contempo un'elevata efficienza e minimizzando l'impatto ambientale. Inoltre, preserva la qualità chimica e strutturale delle proteine, ottenendo idrolizzati con proteine a basso peso molecolare, facilmente incorporabili nella matrice di PVA. La semplicità e la sostenibilità del processo non solo migliorano l'impatto ecologico, ma rendono i prodotti finali ideali per settori che richiedono standard rigorosi. Infatti, l'idrolisi ad alta temperatura sterilizza il materiale, garantendo un prodotto finale sicuro. Inoltre, c'è un'ottimizzazione del consumo energetico grazie a condizioni controllate di temperatura e pressione [5,10].

In questa tesi, si è cercato di seguire il più possibile i principi della Green Chemistry, che è una disciplina scientifica che fonde sostenibilità e progresso tecnologico, trasformando il modo in cui i processi chimici vengono ideati e condotti. Questo approccio nasce come una risposta concreta alle crescenti emergenze ambientali, tra cui l'inquinamento causato dai rifiuti chimici, proponendo metodi che puntano a ridurre o eliminare l'uso di sostanze nocive. Alla base di questa disciplina, troviamo dodici principi fondamentali, che forniscono linee guida per lo sviluppo di tecnologie più sicure, efficienti e sostenibili [11]. La produzione di bioplastiche ottenute da PVA e proteine estratte dagli insetti in questo studio, offre una soluzione sostenibile, biodegradabile e versatile ai problemi ambientali legati ai materiali plastici tradizionali e segue i seguenti principi. Innanzitutto, troviamo la **prevenzione dei rifiuti**, per l'uso di insetti alimentati con scarti organici. Inoltre, si ha un **modello di economia circolare** dato che l'integrazione tra allevamento di insetti e la gestione dei rifiuti crea un ciclo chiuso e altamente sostenibile. Poi vi è un **uso di materie prime rinnovabili**, tra cui gli insetti. Il PVA utilizzato, invece, non può essere definito rinnovabile essendo un polimero sintetico da fonte fossile, ma può essere considerato sostenibile per la sua solubilità in acqua e la biodegradabilità in

condizioni specifiche. Tuttavia, esiste già la possibilità di produrre PVA bio-based, anche se per il momento non è molto diffuso. Inoltre, avviene un **processo di estrazione sicuro e non pericoloso** attraverso idrolisi con acqua surriscaldata, senza impiegare solventi tossici. Oltretutto, si può ottenere una buona **efficienza energetica**, nonostante l'idrolisi richieda energia per mantenere alte temperature e pressioni. Naturalmente, vengono progettati **prodotti potenzialmente degradabili**, ovvero le bioplastiche, che al termine del loro ciclo di vita, si decompongono in acqua, anidride carbonica e biomassa, evitando l'accumulo di microplastiche nei mari e nei suoli. Infine, è presente una **ridotta quantità di sottoprodotti**, come i lipidi estratti dalle larve o la parte solida che rimane dopo l'idrolisi. Tuttavia, essi possono essere utilizzati per altre applicazioni.

Seguendo questi principi, si affrontano sfide globali quali la crescita demografica e la necessità di soluzioni economiche e sostenibili, seguendo le pratiche di "bioraffineria", ossia un approccio sostenibile alla trasformazione della biomassa per produrre una varietà di prodotti commerciabili, ottimizzando al massimo l'uso delle risorse, massimizzando la produttività e minimizzando gli sprechi [12,13].

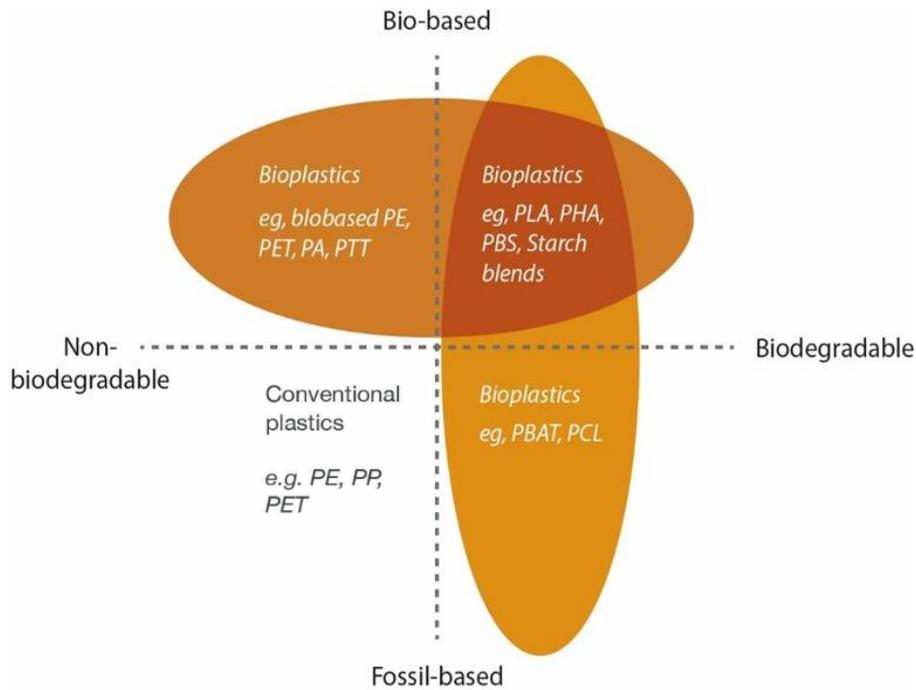
### 2.3. Bioplastiche

L'utilizzo di materiali innovativi ed eco-sostenibili deriva dall'urgenza di trovare alternative alle plastiche tradizionali. Le bioplastiche rappresentano una soluzione promettente in quanto possono essere biodegradabili, compostabili o semplicemente ricavate da fonti rinnovabili, contribuendo a ridurre la dipendenza dai polimeri di origine fossile [14].

Il termine *bioplastica* si riferisce a materiali che possiedono una o più delle caratteristiche citate in seguito e mostrate in **Figura 2.3**. Innanzitutto, è da considerare l'**origine bio-based**, ovvero la derivazione, almeno in parte, da risorse rinnovabili. Inoltre, si prende in considerazione la **biodegradabilità**, ossia la capacità di degradarsi in ambienti naturali o in condizioni industriali specifiche. Anche se il PVA usato non proviene da fonti rinnovabili, i film PVA/proteine rientrano nella categoria delle bioplastiche grazie alla componente bio-based fornita dalle proteine, alla loro biodegradabilità e al loro contributo complessivo verso una maggiore sostenibilità rispetto ai materiali completamente sintetici.

I polimeri biodegradabili si trasformano in acqua, anidride carbonica, metano o biomassa attraverso processi biologici, risultando particolarmente utili per applicazioni come materiali monouso, dove la gestione del fine vita rappresenta una sfida. Sfortunatamente non tutte le bioplastiche sono biodegradabili, e quelle compostabili richiedono condizioni specifiche, come alte temperature, per degradarsi efficacemente [15].

Le plastiche tradizionali, come il polietilene a bassa densità (LDPE), trovano largo impiego in agricoltura per usi come la pacciamatura o la copertura delle serre. Sebbene apprezzate per il loro costo contenuto e per le buone prestazioni meccaniche e ottiche, durante il processo di degradazione, si riducono in frammenti microscopici che permangono nel suolo, risultando praticamente impossibili da rimuovere [16]. Una soluzione si può trovare con lo sviluppo di materiali alternativi, progettati non solo per degradarsi completamente senza lasciare residui dannosi, ma anche per rilasciare nutrienti che arricchiscano il terreno e supportano la crescita delle colture.



**Figura 2.3** Classificazione delle bioplastiche secondo l'Organizzazione Europea delle Bioplastiche [17]

Nonostante il potenziale delle bioplastiche, rimangono alcune sfide da affrontare, come il miglioramento delle proprietà meccaniche, in particolare la resistenza alla trazione, l'ottimizzazione dei processi produttivi per aumentarne l'efficienza energetica e il costo ancora non competitivo rispetto ai consolidati processi industriali per la produzione delle plastiche convenzionali. L'utilizzo di additivi e la combinazione con altri polimeri potrebbe potenziare significativamente la resa e migliorare la qualità delle bioplastiche. Per esempio, per migliorare le proprietà meccaniche si possono utilizzare rinforzi come nanoparticelle e fibre naturali.

Con il crescente interesse per i materiali sostenibili, le bioplastiche potrebbero trovare sempre più applicazioni. L'integrazione delle bioplastiche in tecnologie esistenti, come la stampa 3D, ne amplia le possibilità d'uso. Proseguendo le ricerche e con un adeguato supporto in termini di investimenti e innovazione legislativa, è realistico immaginare un futuro in cui le bioplastiche diventino una realtà industriale su larga scala, con la creazione di nuovi mercati.

Per il momento le bioplastiche, grazie alle loro proprietà uniche, trovano applicazioni in numerosi ambiti come quello medicale per sistemi di rilascio di farmaci e scaffold per la rigenerazione dei tessuti. Inoltre, vengono usate come imballaggi alimentari per creare pellicole con proprietà antimicrobiche e antiossidanti, che prolungano la conservazione dei cibi. Infine, sono impiegate come nanoparticelle integrate, che migliorano le prestazioni meccaniche e termiche dei materiali dove vengono inglobate, ampliandone le possibili applicazioni [15].



### 3. Preparazione delle proteine e purificazione del PVA

Questo capitolo si concentra sulla produzione delle componenti delle bioplastiche sviluppate in questa tesi. Viene descritto il metodo di purificazione del PVA, realizzato tramite estrazione Soxhlet, e il processo di estrazione delle proteine, che si basa su un'idrolisi in autoclave con acqua surriscaldata con diverse condizioni operative, cercando di ottimizzare il processo. Viene anche fatta una caratterizzazione chimica con spettroscopia FT-IR delle larve, degli idrolizzati e della parte solida residua.

#### 3.1. Materiali

Le proteine utilizzate in questa tesi derivano dalle larve di *Hermetia illucens* mostrate in **Figura 3.1**. Le larve vengono allevate presso il centro sperimentale del dipartimento di Scienze Zootecniche dell'Università di Torino a Carmagnola, in una camera climatica con temperatura e umidità controllate ( $29 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , umidità relativa  $60 \pm 5\%$ ), ventilazione costante per assicurare un'adeguata ossigenazione e prevenire accumuli di calore e stratificazioni di anidride carbonica e ammoniaca. In questo modo vengono garantiti un'ambiente di crescita ottimale e una composizione nutrizionale standardizzata, minimizzando la variabilità chimica e biologica del campione. I substrati per alimentare le larve includono rifiuti organici, principalmente residui alimentari di origine animale e vegetale, che risultano non più idonei al consumo umano. Inoltre, questo metodo di allevamento garantisce la sicurezza microbiologica dei campioni tramite analisi specifiche che monitorano la presenza di metalli pesanti e agenti patogeni. Dei vari stadi evolutivi dell'insetto, per questo studio, è stato scelto quello delle larve poiché presenta il più elevato contenuto proteico [18], rendendole idonee all'estrazione di proteine destinate ad essere impiegate nella produzione delle bioplastiche. Le larve raccolte, dopo esser state selezionate manualmente per garantire l'uniformità dei campioni, sono state essiccate, macinate fino a ottenere una polvere fine e sgrassate tramite estrazione Soxhlet, utilizzando l'esano come solvente.

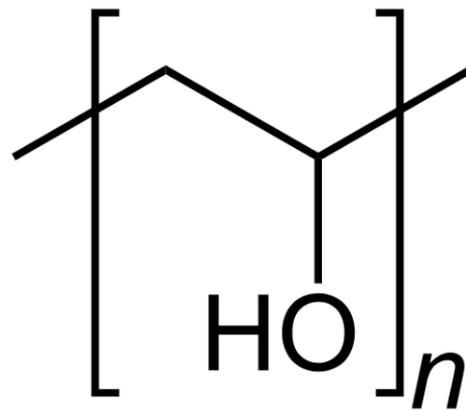


**Figura 3.1** Campione di larve di *Hermetia illucens*

L'alcol polivinilico (PVA) utilizzato è fornito dall'azienda F.lli Citterio S.p.A. sottoforma di filamento, come mostrato in **Figura 3.2(a)** e presenta un alto peso molecolare. Il PVA ha la formula chimica  $(C_2H_4O)_n$  e la struttura chimica riportata in **Figura 3.2(b)**. Possiede una struttura semicristallina, quindi con una combinazione di regioni cristalline ordinate e regioni amorfe disordinate. È un polimero sintetico lineare avente caratteristiche chimiche e fisiche che lo rendono ideale come matrice di supporto per materiali biocompositi. Si tratta infatti di un polimero idrofilo con gruppi idrossilici (-OH) lungo la catena principale, che permettono di formare legami idrogeno con altre molecole, tra cui le proteine estratte da *Hermetia illucens*. Il PVA è solubile in acqua a 65 °C, avendo la capacità di formare soluzioni che permettono di ottenere film abbastanza omogenei e facili da lavorare dopo l'evaporazione del solvente. Inoltre, è dotato di buona resistenza a trazione.



(a)



(b)

**Figura 3.2** Filamento di PVA (a) e struttura chimica dell'alcol polivinilico (b)

### 3.2. Preparazione delle proteine

#### 3.2.1. Apparecchiature per il processo di idrolisi

Per estrarre le proteine dalle BSF, si è adoperato un reattore di idrolisi, che è un dispositivo per la trasformazione di materiali tramite il fenomeno dell'idrolisi, un processo chimico che rompe i legami molecolari attraverso l'interazione con un solvente, in condizioni controllate di temperatura, pressione e agitazione. Il processo di idrolisi utilizza spesso l'acqua come solvente principale, ma può essere accelerato o migliorato tramite l'uso di catalizzatori chimici o condizioni fisiche estreme, come acqua surriscaldata o vapore sotto pressione. La scelta del reattore dipende dalla natura del materiale da trattare, dalla scala operativa e dal prodotto finale desiderato. Il controllo preciso della temperatura e della pressione è essenziale per regolare la velocità di reazione e garantire una rottura efficace dei legami chimici senza compromettere la qualità del prodotto. Inoltre, il design interno è ottimizzato, per assicurare che il materiale sia uniformemente esposto al calore e al liquido idrolitico.

Per avere dei prodotti su larga scala, è necessario effettuare un processo di scale-up, ovvero il trasferimento di un processo da una scala di laboratorio a una scala industriale, mantenendo l'efficienza e la qualità del prodotto. L'uso di reattori su scala di laboratorio, progettati per piccoli volumi, da pochi millilitri a 10 litri, sono ideali per test preliminari e studi di ottimizzazione. Di solito, sono costruiti in acciaio inossidabile per resistere a condizioni

estreme e sono dotati di sensori di controllo come termocoppie e manometri per monitorare temperatura e pressione. Una volta ottimizzati i parametri, si può passare a reattori semi-industriali, con una capacità compresa tra 10 e 50 litri, verso una produzione su scala maggiore. Questi sono dotati di sistemi per garantire una distribuzione uniforme del calore e un'idratazione completa del materiale, come camicie riscaldanti o generatori di vapore, oltre ad agitatori interni. Questi reattori sono particolarmente indicati per processi batch, ovvero in discontinuo, che permettono di monitorare e analizzare con precisione ogni fase. Infine, si può passare a reattori industriali, progettati per gestire volumi superiori ai 500 litri e funzionare in continuo. Sono dotati di sistemi automatizzati per il controllo dei parametri e per la sicurezza, che monitorano ogni aspetto del processo, dal carico dei materiali alla qualità del prodotto finale. Inoltre, è spesso presente un sistema di gestione dei rifiuti, oltre a sistemi di recupero del calore per ridurre i costi operativi [19].

### 3.2.2. Specifiche autoclave con agitatore da cinque litri

In questa tesi è stata utilizzata un'autoclave Amar Equipment con una capienza di cinque litri mostrata in **Figura 3.3(a)**, che è uno strumento progettato per condurre reazioni chimiche in condizioni di alta pressione e temperatura. Il corpo principale del reattore è realizzato in acciaio inossidabile SS 316L, noto per la sua resistenza alla corrosione e alla capacità di sopportare condizioni chimiche e fisiche ostili. Le superfici interne a contatto con i reagenti sono progettate per minimizzare il rischio di contaminazioni e reazioni indesiderate. La camera di reazione cilindrica ha un volume operativo utile compreso tra 800 mL e 4 L. Questo spazio operativo aiuta a prevenire sovrappressioni grazie a una riserva di volume per l'espansione di gas o liquidi. Il coperchio, fissato tramite dei bulloni, garantisce una chiusura ermetica. Questo design semplifica la pulizia, il caricamento dei reagenti e l'accesso per la manutenzione. Un riscaldatore a fascia ceramica, dotato di resistenze elettriche, avvolge la camera di reazione, consentendo un riscaldamento uniforme fino a 300 °C. L'isolamento in lana ceramica riduce la dispersione termica. La temperatura è regolata tramite un controllore PID programmabile. Inoltre, può essere presente una serpentina elicoidale in acciaio inossidabile che permette il passaggio del refrigerante per abbassare rapidamente la temperatura dopo la reazione, ma nel caso di questa tesi non è stata utilizzata. Inoltre, è presente un agitatore ad accoppiamento magnetico che aziona una turbina a pale, ideale per mescolare uniformemente i componenti messi nel reattore. Valvole esterne gestiscono l'ingresso del gas, un eventuale campionamento del liquido e lo sfiato. Un manometro monitora la pressione interna, mentre un disco di rottura protegge da sovrappressioni accidentali. Infine, è presente un pannello di controllo mostrato in **Figura 3.3(b)**, dotato di strumenti per monitorare e regolare temperatura e velocità dell'agitatore. Esso include allarmi per anomalie come surriscaldamenti o guasti [20].



(a)



(b)

**Figura 3.3** Autoclave Amar Equipment da 5L (a) e il suo pannello di controllo (b)

Per il corretto funzionamento del reattore è necessario attuare una sequenza specifica di operazioni. Dopo aver verificato che il reattore sia pulito e che tutte le valvole siano chiuse, avviene il caricamento dei reagenti, lasciando il 20% del volume totale vuoto per prevenire sovrappressioni. A questo punto si può posizionare il coperchio sul reattore, fissandolo con dei bulloni tramite una chiave inglese andando a stringerli in modo alternato e opposto. Questo metodo garantisce una chiusura uniforme e previene deformazioni o tensioni irregolari sulle guarnizioni. Dopodiché si può inserire il sensore di temperatura e allineare l'agitatore magnetico. Assemblato il reattore, si può impostare la temperatura che si vuole raggiungere e la velocità dell'agitatore in rpm sul pannello di controllo, sul quale si può anche accendere il riscaldatore e monitorare l'aumento graduale della temperatura, oltre a poter controllare la pressione interna tramite il manometro. Una volta completato il processo, si può disattivare il riscaldatore e l'agitatore. Successivamente si può avviare un eventuale sistema di raffreddamento per ridurre la temperatura, oppure semplicemente aspettare che il reattore arrivi a temperatura ambiente, aiutandosi anche con il rilascio parziale della pressione interna utilizzando la valvola di sfiato. A questo punto si può rimuovere il coperchio e svuotare il reattore, pulendo poi tutte le superfici.

### 3.2.3. Estrazione delle proteine con idrolisi in autoclave

Per questa ricerca, sono state condotte tre prove di idrolisi con acqua surriscaldata, per esaminare l'influenza delle diverse condizioni operative sulla resa di estrazione. La Prova 1 è stata effettuata a 160 °C per un'ora, la Prova 2 ha incluso un pretrattamento con acido cloridrico (HCl) prima dell'idrolisi a 160 °C per un'ora, mentre la Prova 3 ha raggiunto una temperatura di 180 °C per un'ora senza pretrattamento, per capire se l'aumento della temperatura potesse migliorare la resa. Tutte le prove sono state eseguite seguendo scrupolosamente le specifiche di sicurezza e funzionamento dell'autoclave, utilizzando anche il sistema di agitazione magnetica per mantenere l'omogeneità del campione, assicurando un'idrolisi uniforme. Dopo ogni trattamento, i campioni sono stati essiccati e analizzati per calcolare la resa di estrazione,

consentendo un confronto quantitativo tra le condizioni operative. Per ciascuna prova è stato preparato un campione di 50 g di larve tritate di *Hermetia Illucens*, trattate precedentemente con esano per rimuovere i lipidi. Questo campione è stato poi miscelato con un litro di acqua deionizzata.

Nella **Prova 1**, ovvero l'idrolisi a 160 °C, il reattore è stato sottoposto a un'ispezione preliminare per verificare la pulizia interna e la chiusura delle valvole superiore e inferiore. Il coperchio è stato poi fissato con una fascetta e dei bulloni, serrati prima a mano e poi con una chiave inglese, per garantire la chiusura ermetica del reattore, e la valvola di sfiato è stata chiusa per evitare perdite di pressione. È stata impostata una temperatura di 160 °C, con agitazione a 400 rpm per garantire l'omogeneità del campione. Durante il riscaldamento, la pressione è stata monitorata fino a raggiungere circa 4,5 bar, quando si è stabilizzata la temperatura. La reazione è stata mantenuta a 160 °C per un'ora. Successivamente, si è spento il sistema di riscaldamento e miscelazione e la temperatura si è ridotta gradualmente fino a 100 °C e a questa temperatura è stata aperta la valvola di sfiato. Una volta stabilizzata la pressione a livello atmosferico, il campione è stato recuperato.

Per la **Prova 2** è stata effettuata un'idrolisi a 160 °C con pretrattamento in HCl, ovvero il campione di 50 g di larve è stato immerso in una soluzione di HCl 2N (84,74 mL di HCl al 37%, diluiti in 500 mL di acqua) per 24 ore, con agitazione a 130 rpm. Successivamente, il campione è stato filtrato e risciacquato con acqua più volte fino al raggiungimento di un pH neutro, con anche l'aggiunta di ammoniaca diluita. Il campione neutralizzato è stato diluito con acqua deionizzata fino a raggiungere un litro di volume totale e successivamente è stato caricato nel reattore, con le stesse procedure precedenti, impostando una temperatura di 160 °C per un'ora e una velocità di agitazione di 400 rpm. Durante il riscaldamento, la pressione ha raggiunto circa 6 bar, probabilmente a causa della presenza di componenti acidi residui.

Infine, nella **Prova 3** è stata effettuata un'idrolisi a 180 °C per un'ora sotto agitazione di 400 rpm senza pretrattamento con le stesse modalità operative delle altre prove. La pressione ha raggiunto circa 10 bar, in accordo con l'aumento della temperatura.

#### 3.2.4. Processi di purificazione degli idrolizzati e calcolo delle rese di estrazione

A seguito del trattamento di idrolisi in autoclave, ogni idrolizzato è stato sottoposto alle stesse procedure operative per isolare la frazione liquida ad alto contenuto proteico e determinarne la resa di estrazione, assicurando la comparabilità dei risultati tra le diverse condizioni operative di idrolisi.

Inizialmente è stata effettuata una **filtrazione** della soluzione attraverso un filtro a rete metallica per separare la frazione per la maggior parte liquida, ricca di proteine solubilizzate, dalla frazione solida più grossolana. La soluzione filtrata è stata poi sottoposta a **centrifugazione** tramite centrifuga Jouan MR1822 (**Figura 3.4**) per separare ulteriormente i componenti in base alla densità grazie alla forza centrifuga. Quattro provette sono state riempite in maniera uniforme verificando che il peso delle provette opposte fosse il più simile possibile, per evitare vibrazioni o danni al rotore e sono state centrifugate. La centrifugazione è stata eseguita a 8000 giri/min per 15 minuti. Questo processo ha prodotto due fasi: il surnatante, contenente proteine solubilizzate e altre molecole disciolte, e una parte solida in fondo alle provette. Il surnatante è stato quindi trasferito in un altro contenitore per essere utilizzato nelle fasi successive.



(a)



(b)

**Figura 3.4** Centrifuga Jouan MR1822 dall'esterno (a) e all'interno (b)

Per il calcolo della **resa di estrazione** è stato necessario calcolare il peso secco corrispondente ai 50 g di larve usate inizialmente. Due campioni di larve sono stati essiccati in stufa eseguendo due misurazioni replicative. I campioni sono stati mantenuti a una temperatura di 105°C per un periodo di 4 ore, tempo necessario a garantirne la completa disidratazione. Successivamente, i campioni sono stati rimossi dalla stufa e poi pesati con la bilancia analitica Sartorius Analytic in **Figura 3.5(a)**. Per assicurare misurazioni accurate, i campioni essiccati sono stati trasportati e conservati all'interno di una campana essiccante mostrata in **Figura 3.5(b)**, preparata contenente gel di silice per mantenere un ambiente a bassissima umidità relativa. La campana è stata chiusa ermeticamente per garantire un'atmosfera stabile e asciutta. Per pesare la massa secca iniziale, i campioni sono stati estratti rapidamente dalla campana, minimizzando l'esposizione all'umidità esterna.



(a)



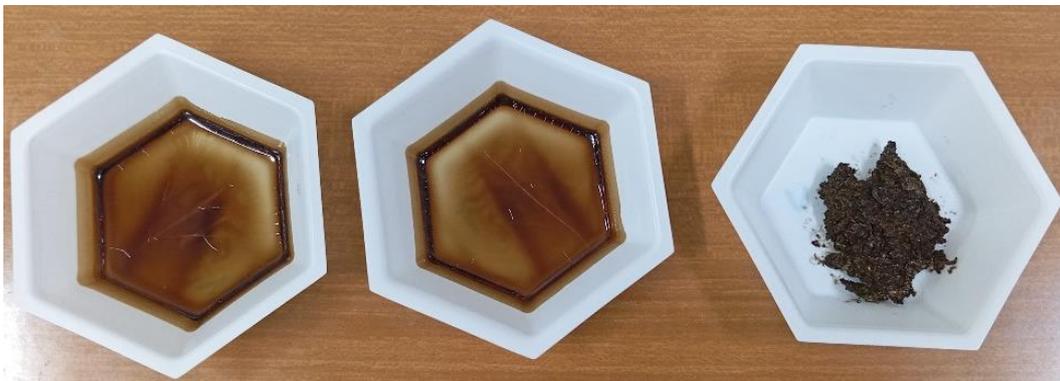
(b)

**Figura 3.5** Bilancia analitica Sartorius Analytic (a) e campana essiccante (b)

Conoscendo la tara del contenitore, il peso iniziale e finale dopo essiccazione dei singoli campioni e facendo una media tra i due valori, si può calcolare la percentuale di secco del campione iniziale di larve con la formula (3.1).

$$\% \text{ Secco} = \frac{\text{Media peso secco campioni}}{\text{Media peso umido campioni}} \quad (3.1)$$

A questo punto sono state prelevate due aliquote di 10 mL da ciascun surnatante centrifugato e messe in due contenitori, mostrati in **Figura 3.6**, di cui si è misurata la tara. Per mantenere una distribuzione uniforme delle proteine nella soluzione da cui prendere questi campioni ed evitare stratificazioni, è stato utilizzato un agitatore magnetico. Questi campioni, insieme a un campione della parte solida precipitata nell'idrolizzato dopo l'idrolisi, sono stati posti in stufa a 60 °C, per consentire l'evaporazione dell'acqua e misurare il peso secco delle frazioni.



**Figura 3.6** Campioni essiccati della parte liquida dei centrifugati e della parte solida precipitata nell'idrolizzato dopo l'idrolisi

Dopo l'essiccazione, i campioni sono stati pesati. La differenza tra il peso del campione liquido essiccato e la tara del contenitore ha permesso di ottenere il peso del liquido essiccato e, facendo una media di questo peso dei due campioni per avere maggiore precisione e, conoscendo il volume residuo degli idrolizzati e il volume delle due aliquote, si è potuto calcolare il peso delle proteine nei diversi idrolizzati usando la formula (3.2). Inoltre, conoscendo il peso umido iniziale, ovvero 50 g, e la percentuale di secco, è possibile calcolare il peso secco iniziale con la formula (3.3). Successivamente, la resa di estrazione è stata calcolata valutando il rapporto tra il peso delle proteine estratte e il peso secco iniziale delle larve usate nell'idrolisi utilizzando la formula (3.4). Questa procedura ha permesso di esprimere l'efficacia dell'idrolisi in termini percentuali, consentendo una valutazione quantitativa dell'efficienza del processo di estrazione.

$$\text{Peso proteine idrolizzato} = \frac{\text{Media peso liquido essiccato campioni} \times \text{Volume residuo idrolizzato}}{\text{Volume campioni}} \quad (3.2)$$

$$\text{Peso secco iniziale} = \% \text{ Secco} \times \text{Peso umido iniziale} \quad (3.3)$$

$$\text{Resa di estrazione} = \frac{\text{Peso proteine idrolizzato}}{\text{Peso secco larve iniziali}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.2.5. Risultati e selezione delle condizioni di estrazione

Nella **Tabella 3.1** e nella **Tabella 3.2** sono riassunti i valori misurati ed utilizzati per il calcolo delle rese di estrazione, per il quale è stato necessario calcolare il peso secco iniziale delle larve con la formula (3.3), che risulta essere di 46,11 g. In particolare, per il calcolo della percentuale di secco si è usata la formula (3.1), per il calcolo del peso delle proteine nei singoli idrolizzati si è usata la formula (3.2) ed infine per il calcolo della resa di estrazione proteica delle tre prove si è usata la formula (3.4).

**Tabella 3.1** Misure per calcolo peso secco

	Peso iniziale umido (peso totale – tara)	Peso finale secco (peso totale – tara)	% Secco
Campione 1	0,4577g	0,4208g	
Campione 2	0,7671g	0,7088g	
Media	0,6124 g	0,5648 g	92,23%

**Tabella 3.2** Misure per il calcolo della resa di estrazione

	Media peso liquido essiccato campioni (peso totale – tara)	Peso proteine nell'idrolizzato	Resa di estrazione
Prova 1 (160°C)	0,2209g	20,9855g	45,51 %
Prova 2 (HCl + 160°C)	0,0765g	6,3495g	13,77 %
Prova 3 (180°C)	0,2826g	21,1950g	45,96 %

La **Prova 1**, ovvero l'idrolisi a 160°C, ha raggiunto una resa di estrazione proteica del 45,51%, un risultato che dimostra l'efficacia del solo trattamento termico, senza necessità di reagenti chimici aggiuntivi. Questa temperatura è risultata efficace nel rompere le interazioni molecolari, rendendo solubili gran parte delle proteine.

Nella **Prova 2** a 160°C con pretrattamento con HCl, la resa si è ridotta notevolmente fino al 13,77%, risultando quindi un processo controproducente. Probabilmente l'uso dell'acido cloridrico ha provocato una parziale idrolisi e una perdita in soluzione di proteine, ed inoltre una certa quantità di materiale in fase solida e liquida è stato perso durante le operazioni di risciacquo e filtrazione. Di conseguenza, questo trattamento non solo ha ridotto drasticamente la quantità di proteine recuperabili, ma ha anche comportato maggiori costi operativi per il consumo di HCl e la neutralizzazione, risultando inefficiente sia dal punto di vista energetico che economico.

Infine, la **Prova 3** a 180°C ha ottenuto una resa del 45,93%, ovvero leggermente superiore rispetto alla Prova 1, grazie all'incremento della temperatura. Difatti, l'energia termica aggiuntiva ha presumibilmente intensificato il processo di idrolisi, favorendo la rottura dei legami tra le proteine e altre componenti strutturali del campione. La differenza di resa tra la terza e la prima prova però resta modesta, non modificando in modo sostanziale la quantità di proteine estraibili. Inoltre, a 180°C, alcune molecole proteiche potrebbero denaturarsi, limitando così un ulteriore aumento significativo della resa.

La quantità di proteine nelle larve di *Hermetia illucens* varia dal 38% al 62% a seconda della dieta dell'insetto [21], per cui probabilmente già con l'estrazione a 160°C tutte le proteine sono state estratte e la quantità di proteine presenti o estraibili aveva raggiunto un livello massimo. Un aumento della temperatura da 160°C a 180 °C non ha portato ad un aumento rilevante delle proteine estratte, ma potrebbe aver aumentato l'idrolisi delle proteine con conseguente diminuzione dei pesi molecolari, con un effetto negativo sulla processabilità delle proteine a produrre film. Per questi motivi, uniti ad un maggior dispendio energetico dovuto alla temperatura più elevata, si è scelto di procedere utilizzando solo l'idrolizzato della Prova 1.

### 3.2.6. Caratterizzazione delle larve di *Hermetia illucens* e degli estratti proteici

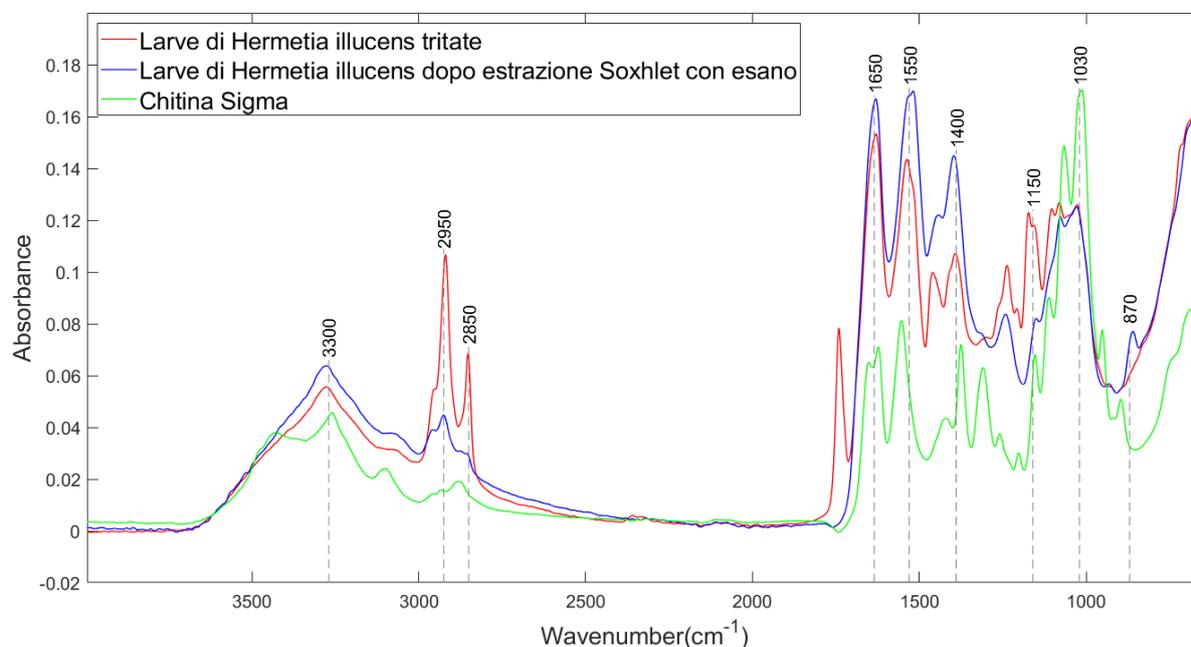
La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier FT-IR rileva l'assorbimento della radiazione infrarossa da parte delle molecole che causa vibrazioni nei loro legami a frequenze caratteristiche. L'analisi dello spettro risultante consente di determinare la composizione chimica di una sostanza. L'analisi Spettroscopica Infrarossa a Trasformata di Fourier FT-IR è stata condotta su vari campioni per effettuare dei confronti. Si è utilizzato uno spettrofotometro FT-IR NEXUS Thermo Nicolet mostrato in **Figura 3.7**, con la tecnica ATR (Riflettanza Totale Attenuata). Questo approccio ha permesso di analizzare direttamente la superficie dei campioni, eliminando la necessità di preparazioni complesse e garantendo comunque risultati affidabili. Per l'elaborazione dei dati è stato utilizzato il software OMNIC. In **Appendice A.1** è presente un approfondimento dello strumento e della tecnica analitica.



**Figura 3.7** FT-IR NEXUS Thermo Nicolet con dispositivo ATR

Le procedure preanalitiche includevano una pulizia accurata del cristallo ATR in diamante con metanolo per prevenire contaminazioni. Successivamente, è stata depositata al centro del cristallo una quantità minima di campione, che è stato fissato avvitando una vite dinamometrica. A questo punto, una volta impostato il numero di scansioni pari a 64, il range di numeri d'onda tra 4500-500  $\text{cm}^{-1}$  e la risoluzione pari a 4  $\text{cm}^{-1}$ , si è acquisito uno spettro di background iniziale, poi sottratto automaticamente allo spettro finale per ottenere dati privi di interferenze. Gli spettri sono stati ulteriormente processati applicando una funzione di smoothing per ridurre il rumore e migliorandone la leggibilità. Sono stati inoltre rimossi picchi indesiderati, come quelli associati alla  $\text{CO}_2$  a specifiche lunghezze d'onda, per evitare distorsioni nell'interpretazione.

In primo luogo, si è effettuata un'analisi comparativa degli spettri FT-IR su **campioni di larve di *Hermetia illucens* prima e dopo esser state sottoposte a un trattamento di estrazione Soxhlet con esano**. Per identificare alcuni componenti chimici presenti, si è utilizzato come riferimento lo spettro della chitina dell'azienda Sigma-Aldrich, che ha permesso di riconoscere le sue bande caratteristiche e di confrontarle con quelle dei campioni analizzati. Questi spettri sono mostrati in **Figura 3.8**.



**Figura 3.8** Spettri FT-IR di larve di *Hermetia illucens* prima e dopo estrazione con esano, con riferimento di chitina Sigma

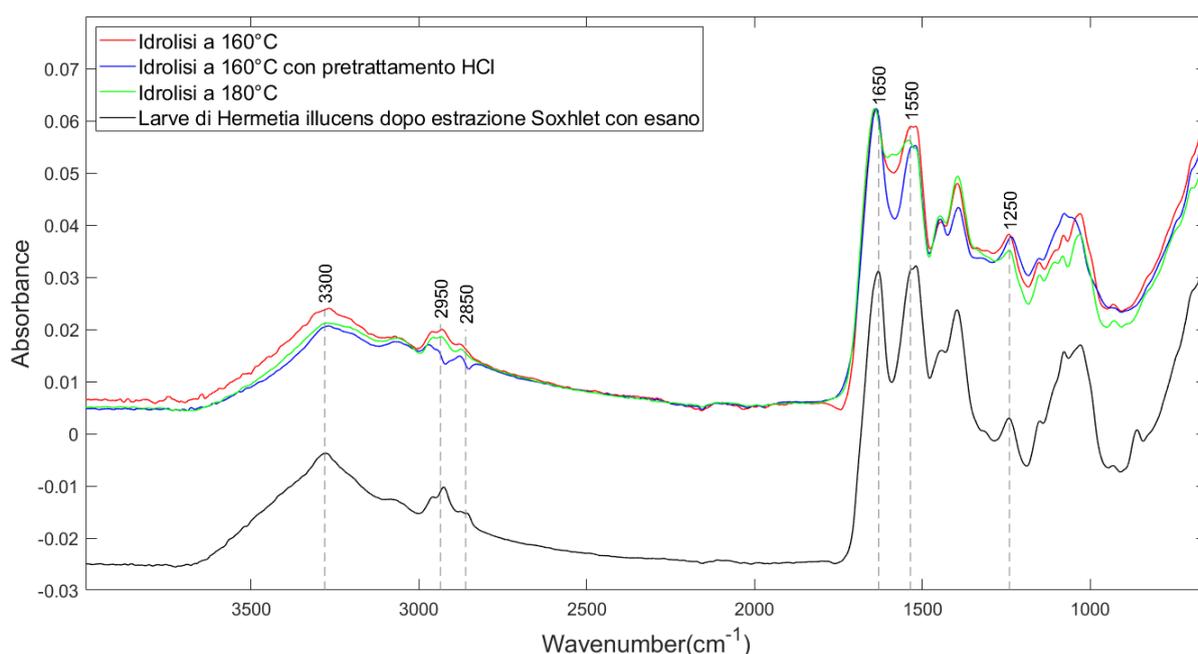
L'analisi ha confermato che molti dei picchi caratteristici dello spettro della chitina sono presenti anche negli spettri delle larve, confermando la presenza di chitina. Per esempio, alla lunghezza d'onda di circa  $1150\text{ cm}^{-1}$ , che rappresenta i legami C-N, si può vedere un picco in tutti i campioni. Stessa cosa a circa  $3300\text{ cm}^{-1}$  per i gruppi O-H e N-H. Invece nella regione  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$  (Stretching C-H), nella chitina i picchi sono trascurabili, poiché in essa non sono presenti in maniera significativa catene alifatiche, mentre per le larve, i segnali forti in questa regione derivano dai lipidi. Le bande caratteristiche della chitina sono quindi visibili sia nello spettro delle larve tritate sia in quello delle larve dopo estrazione, dimostrando che la chitina è rimasta intatta anche dopo il trattamento con esano, grazie al fatto che essa è insolubile in solventi organici. Inoltre, sono presenti alcuni assorbimenti attribuibili a materiale inorganico presente nelle larve, in particolare calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) con gli assorbimenti a circa  $1400\text{ cm}^{-1}$ , attribuibile alla banda di stretching asimmetrico del carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), a  $1030\text{ cm}^{-1}$  dovuta allo stretching simmetrico dello stesso gruppo ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ed a  $870\text{ cm}^{-1}$  dovuto al bending del gruppo CaO.

Confrontando invece lo spettro delle larve prima e dopo l'estrazione Soxhlet, si possono notare due picchi a  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$  (Stretching C-H), che nel campione originale sono più pronunciati per la presenza dei gruppi  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  nelle catene lipidiche, mentre nel campione estratto c'è una riduzione evidente dell'intensità, indicando la rimozione di una parte consistente dei lipidi, anche se alcuni gruppi alifatici sono rimasti per via della presenza delle proteine, nelle quali essi sono presenti ma in minori quantità. Inoltre, in entrambi i campioni sono presenti bande simili associate ai legami peptidici delle proteine. In particolare, a  $1650\text{ cm}^{-1}$  è presente il

segnale dell'amide I, relativo allo stretching C=O dei gruppi peptidici, mentre a  $1550\text{ cm}^{-1}$  è presente il segnale caratteristico dell'amide II, relativo al bending del legame N-H e stretching C-N. Ciò conferma che l'estrazione con esano non ha avuto impatti significativi sulle proteine.

In conclusione, l'estrazione con esano ha principalmente rimosso i lipidi, grazie alla sua efficacia come solvente organico non polare per trigliceridi e acidi grassi, mentre c'è stata la conservazione di proteine, materiale inorganico e chitina, che proporzionalmente sono più presenti nel campione dopo l'estrazione.

Successivamente sono stati analizzati gli spettri FT-IR degli **idrolizzati essiccati ottenuti da larve di *Hermetia illucens* con acqua surriscaldata** mostrati in **Figura 3.9**. Si ricorda che le larve sono state triturate e trattate con esano per rimuovere i lipidi e che le idrolisi sono state condotte in tre diverse condizioni operative, ovvero a  $160^\circ\text{C}$ , a  $160^\circ\text{C}$  con pretrattamento con HCl e a  $180^\circ\text{C}$ . Il tempo di trattamento è sempre stato di un'ora e il rapporto bagno, ovvero il rapporto materiale/liquido, di 1:20. L'obiettivo principale era identificare eventuali differenze chimiche tra i campioni, considerando quindi anche i gruppi funzionali oltre alle rese di estrazione, per determinare il trattamento più efficiente dal punto di vista energetico e qualitativo. Inoltre, è stato effettuato un confronto tra lo spettro delle larve trattate con esano prima dell'idrolisi e gli idrolizzati per valutare le modifiche chimiche introdotte dal processo. Il riferimento è traslato verso il basso rispetto agli altri spettri.



**Figura 3.9** Spettri FT-IR della parte liquida essiccata di idrolizzati di larve di *Hermetia illucens* a diverse condizioni operative con riferimento delle larve dopo estrazione Soxhlet.

Tutti gli spettri FT-IR hanno mostrato bande caratteristiche delle proteine. Difatti è presente l'amide I a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , l'amide II a  $1550\text{ cm}^{-1}$  e l'amide III a circa  $1250\text{ cm}^{-1}$ , che rappresentano rispettivamente lo stretching del C=O, il bending di N-H e lo stretching del C-N. Queste bande sono visibili in tutti i campioni, con intensità simili, suggerendo che i trattamenti hanno estratto prevalentemente la frazione proteica e molti legami ammidici delle proteine sono rimasti inalterati. Ugualmente, nella regione  $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ , associata ai gruppi -OH, probabilmente derivanti da umidità residua e all'amide A delle proteine e nella regione  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ , associata allo stretching C-H delle catene alifatiche, non ci sono differenze rilevanti, soprattutto

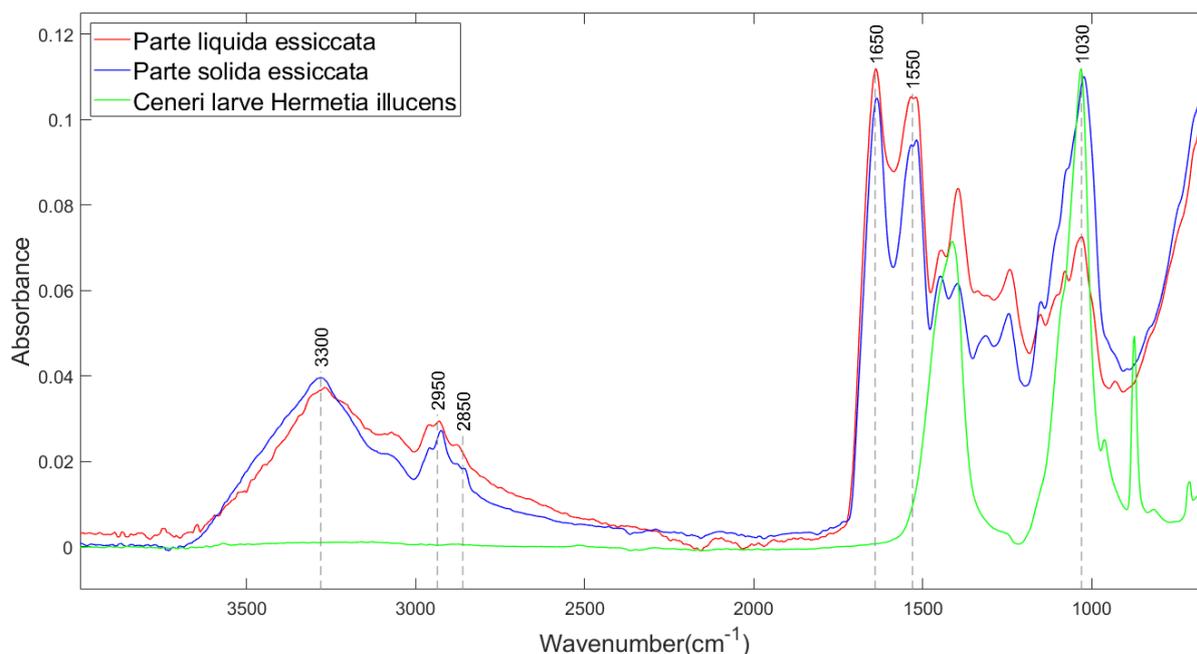
per le idrolisi senza pretrattamenti. In generale, nel campione sottoposto a idrolisi a 160°C con pretrattamento con HCl, le bande caratteristiche delle proteine risultano attenuate, suggerendo una parziale degradazione e frammentazione delle catene proteiche, probabilmente dovuta all'azione aggressiva dell'HCl. Invece, nell'idrolisi a 160°C senza HCl, si registra un segnale residuo nella regione 2950–2850 cm<sup>-1</sup>, riconducibile allo stretching C-H delle catene alifatiche. Questo potrebbe derivare dalla presenza di catene laterali di specifici amminoacidi nelle proteine.

L'analisi comparativa con lo spettro delle larve di *Hermetia illucens* sottoposte a estrazione Soxhlet con esano ha evidenziato alcune differenze. La banda Amide I (1650 cm<sup>-1</sup>) rimane pressoché invariata dopo l'idrolisi, suggerendo che la struttura del legame C=O nelle proteine non abbia subito trasformazioni rilevanti. Diversamente, la banda Amide II (1550 cm<sup>-1</sup>) appare leggermente più intensa nelle larve, un dato che potrebbe indicare una diversa disposizione dei legami N-H nelle proteine. Al contrario, la banda Amide III (1250 cm<sup>-1</sup>) risulta meno pronunciata nelle larve rispetto agli idrolizzati, suggerendo un'interazione differente tra i gruppi C-N e N-H nella struttura proteica prima dell'idrolisi. Nella regione compresa tra 2850 e 2950 cm<sup>-1</sup>, associata allo stretching C-H delle catene alifatiche, il picco a 2950 cm<sup>-1</sup> risulta più netto nelle larve, indicando una maggiore presenza di gruppi alifatici intatti. Tuttavia, il picco a 2850 cm<sup>-1</sup> non mostra variazioni significative tra i due campioni, segnalando che la componente alifatica in questa regione non è stata influenzata in modo sostanziale dal processo idrolitico. Infine, la banda attorno ai 3300 cm<sup>-1</sup>, attribuibile ai gruppi -OH e N-H, risulta leggermente più intensa nelle larve estratte con esano rispetto agli idrolizzati. Questa differenza potrebbe essere dovuta a una maggiore quantità di umidità residua o a una diversa organizzazione dei legami idrogeno nelle proteine non ancora sottoposte a idrolisi.

Ricordando le rese di estrazione calcolate precedentemente in **Tabella 3.2**, ovvero 45,51% per l'idrolisi a 160°C, 13,77% per l'idrolisi a 160°C con pretrattamento con HCl e 45,96% per l'idrolisi a 180°C, si può cercare di capire se ci siano correlazioni tra rese e picchi dello spettro. La resa significativamente inferiore del campione trattato con HCl riflette una perdita di proteine nella fase di pretrattamento con HCl, nelle fasi di lavaggio per portare il campione a pH neutro e una degradazione delle proteine, come indicato dalla riduzione, seppur non troppo rilevante, delle bande proteiche. Al contrario, i campioni idrolizzati a 160°C e 180°C hanno rese quasi identiche e bande proteiche più simili, suggerendo che un aumento della temperatura non porta vantaggi significativi in termini di estrazione proteica.

Gli spettri FT-IR confermano quindi che i campioni presentano composizioni chimiche molto simili, con differenze marginali. Pertanto, l'uso del pretrattamento con HCl non è giustificato, poiché comporta una resa inferiore e un costo maggiore rispetto all'idrolisi a 160°C. Inoltre, quest'ultima offre una qualità dell'idrolizzato paragonabile a quella ottenuta a 180°C, ma con un consumo energetico inferiore, rendendo il trattamento a 160°C più sostenibile. Per questi motivi, è stato scelto di utilizzare solo l'idrolizzato a 160°C per un'ora per produrre i film di PVA e proteine.

Sono stati poi confrontati gli spettri FT-IR delle **frazioni liquide e solide essiccate ottenute dall'idrolizzato di larve di *Hermetia illucens* trattate con acqua surriscaldata a 160°C**, mostrate in **Figura 3.6**, ed un campione di ceneri ottenute dalle larve trattate in forno a muffola per 5 ore alla temperatura di 550 °C. Il confronto con le ceneri è stato fatto per identificare la natura dei materiali minerali presenti e per analizzare il comportamento dei composti inorganici durante il trattamento con acqua surriscaldata. Gli spettri sono mostrati in **Figura 3.10**.



**Figura 3.10** Spettri FT-IR della parte liquida e solida essiccata di idrolizzati di larve di *Hermetia illucens*, con riferimento a ceneri ottenute da larve di *Hermetia illucens*

Le analisi degli spettri FT-IR delle frazioni liquida e solida dell'idrolizzato mostrano diverse somiglianze dalle bande proteiche, come nella regione a circa 3300 cm<sup>-1</sup>, ovvero le vibrazioni di stretching dei gruppi -OH e -NH, nella regione 2850-2950 cm<sup>-1</sup>, date dalle vibrazioni dei legami C-H di gruppi alifatici e nella regione 1550 e 1650 cm<sup>-1</sup>, dovute alle vibrazioni dei gruppi carbonilici C=O, e della deformazione dei legami N-H, caratteristici dei legami peptidici delle proteine. Questi risultati confermano che entrambe le frazioni contengono una composizione organica di base simile, coerente con la loro comune derivazione dall'idrolizzato della stessa matrice biologica.

Al contrario, si possono notare delle differenze per il picco a circa 1030 cm<sup>-1</sup>, dove la frazione solida presenta un picco molto più intenso rispetto a quella liquida. Questo segnale, secondo quanto riportato in letteratura, è riconducibile alla calcite (CaCO<sub>3</sub>). Difatti gli spettri FT-IR delle ceneri derivanti dall'incenerimento di esuvie di BSF alle stesse condizioni evidenziano un picco intorno a 1030 cm<sup>-1</sup>, associato allo stretching del carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) [6]. Pertanto, la forte somiglianza con lo spettro delle ceneri delle larve, che presenta quasi una completa sovrapposizione di questi segnali con quelli della frazione solida, conferma che il segnale è attribuibile a materiali minerali naturali, come la calcite, probabilmente derivati dal substrato alimentare delle larve o da residui ambientali non metabolizzati. Inoltre, l'elevata intensità del picco nella frazione solida suggerisce che i composti inorganici si siano concentrati in questa fase, precipitando durante l'idrolisi.

In conclusione, si può quindi dedurre che l'idrolisi con acqua surriscaldata separa efficacemente i composti organici solubili nella frazione liquida da quelli inorganici precipitati nella frazione solida.

### 3.3. Purificazione del PVA

Per preparare il formato di PVA appropriato a questo studio, si è deciso di dipanare la rocca di filato di PVA per formare delle matasse (**Figura 3.11**) in modo da avere maggior facilità di manipolazione del materiale. Inoltre, nelle matasse di filato c'è un aumento della superficie esposta, utile ai trattamenti successivi. Per questo è stata usata la matassatrice rotativa di Officine Brustio mostrata in **Figura 3.11**, scelta per la sua efficienza nel creare avvolgimenti uniformi e compatti, limitando al minimo la tensione esercitata sul filo di PVA. Per garantire il giusto equilibrio tra densità e quantità della matassa, è stato impostato un numero di giri pari a 900 e la velocità massima. Questo ha permesso di ottenere matasse da 20 g. Inoltre, grazie al contatore digitale OMRON H7EC, è stato possibile monitorare in tempo reale il numero di giri effettuati. Questa configurazione ha consentito di raggiungere un avvolgimento omogeneo, limitando al minimo la tensione esercitata sul PVA.



**Figura 3.11** Matassatrice (a) e matassa risultante dal processo (b)

#### 3.3.1. Estrazione Soxhlet

Prodotte le matasse di PVA, si è proceduto ad effettuare un'estrazione Soxhlet a circa 70 °C per quattro ore, usando come solvente l'etere di petrolio, al fine di rimuovere sostanze quali lipidi residui o altri composti apolari che potrebbero alterare le proprietà chimico-fisiche del PVA, rischiando inoltre di compromettere la capacità del materiale di formare film omogenei e stabili.

L'estrattore Soxhlet utilizzato è mostrato in **Figura 3.12** ed è costituito da diversi componenti da assemblare. Il pallone di riscaldamento contiene il solvente ed è posto in un bagno d'acqua riscaldante per mantenere il solvente in continua ebollizione. Nel pallone si sono inserite delle palline di vetro per prevenire un'ebollizione tumultuosa, in quanto distribuiscono meglio il calore, favorendo la formazione di bolle più piccole e quindi riducendo il rischio di un eventuale traboccamento del solvente, oltre a garantire un'evaporazione più omogenea. Sopra al pallone, viene posizionata la camera di estrazione, dove si inserisce la matassa di PVA, collocata in un "ditale" poroso, che consente al solvente di fluire attraverso il campione in maniera uniforme, per solubilizzare i contaminanti. Nella parte superiore del sistema si trova un condensatore, che raffredda i vapori di solvente, condensandoli in un liquido che gocciola sul campione attraverso un circuito di acqua fredda che scorre all'interno di una serpentina esterna al condensatore. Infine, è presente un sifone, che permette lo svuotamento automatico dalla camera di estrazione

quando si raggiunge un certo livello del solvente, consentendogli di defluire nel pallone inferiore, avviando un nuovo ciclo. Questo processo ciclico continua per diverse ore, dopo le quali si interrompe il processo, e il campione di PVA viene rimosso e lasciato asciugare all'aria per eliminare eventuali tracce di solvente.



**Figura 3.12** Estrattori Soxhlet (a) e assemblamento nel pallone con la camera di estrazione (b)

L'uso dell'estrattore Soxhlet risulta particolarmente vantaggioso in quanto permette estrazioni ripetute senza consumo eccessivo di solvente, grazie al ciclo continuo di estrazione che migliora l'efficienza del processo. Inoltre, utilizzare il PVA sottoforma di matassa ha permesso al solvente di penetrare facilmente nel materiale, massimizzando il contatto e quindi l'efficacia e l'uniformità dell'estrazione. L'etere di petrolio è stato scelto come solvente per l'estrazione in quanto è apolare, quindi altamente efficace nello sciogliere composti anch'essi apolari, come i grassi, mentre il PVA rimane intatto. Inoltre, presenta un punto di ebollizione relativamente basso consentendo di operare a temperature moderate, come in questo caso a circa 70 °C, minimizzando i rischi di degradazione termica del PVA. Infine, è caratterizzato da una bassa tensione di vapore che facilita una rapida evaporazione e condensazione all'interno del sistema, consentendo un consumo minimo di solvente. L'elevata volatilità permette anche una rapida rimozione del solvente dopo l'estrazione tramite evaporazione, riducendo al minimo il rischio di contaminazione residua nel PVA.

### 3.3.2. Calcolo della concentrazione di PVA nella soluzione

Per la soluzione di PVA da utilizzare nella produzione delle bioplastiche, si è optato di usare una concentrazione uguale a quella delle proteine nell'idrolizzato selezionato, ovvero 21 g/L in peso secco. Per questo scopo, si è determinata la percentuale di umidità del PVA. Due campioni di PVA trattato sono stati messi in stufa a 105°C per circa 4 ore, così da ottenerne il peso secco. Si è calcolata la percentuale di umidità nei campioni, conoscendo la tara dei contenitori, oltre al peso dei campioni prima e dopo l'essiccazione in stufa, utilizzando la formula (3.5). Infine, è stata fatta una media dei due valori di umidità ottenuti. I risultati ottenuti sono mostrati in **Tabella 3.3**.

$$\%Umidità = \frac{\text{Peso umido campione} - \text{Peso secco campione}}{\text{Peso umido campione}} \times 100 \quad (3.5)$$

**Tabella 3.3** Misure per il calcolo della percentuale di umidità nel PVA

	Peso iniziale umido (peso totale – tara)	Peso finale secco (peso totale – tara)	% di umidità
Campione 1	0,2753g	0,2633g	4,36%
Campione 2	0,1260g	0,1198g	4,92%

Facendo la media delle percentuali di umidità ottenute, si ottiene una percentuale di umidità del PVA utilizzato pari al 4,64%. Sapendo che nell'idrolizzato preso in considerazione la concentrazione di proteine era di circa 21 g/L in peso secco, per sapere quanti grammi di PVA non essiccato sono da mettere in 100 mL di acqua deionizzata, si può utilizzare la formula (3.6).

$$\text{Concentrazione PVA} \left[ \frac{g}{100 \text{ mL}} \right] = \frac{\text{Concentrazione proteine} \left[ \frac{g}{100 \text{ mL}} \right]}{1 - \%umiditàPVA} = 2,20 \frac{g}{100 \text{ mL}} \quad (3.6)$$

## 4. Produzione e caratterizzazione delle bioplastiche

Questo capitolo si concentra sulla produzione dei film bioplastici e sull'analisi delle loro proprietà. Viene illustrato il metodo di preparazione, spiegando come le proteine vengano integrate nella matrice polimerica per ottenere film con diverse percentuali dei due componenti. Successivamente, vengono esaminate le loro proprietà chimiche, morfologiche, fisiche, meccaniche, di bagnabilità e di biodegradabilità.

### 4.1. Preparazione delle bioplastiche

La produzione dei film biodegradabili è stata realizzata miscelando il PVA disciolto in acqua e le proteine estratte dalle larve di *Hermetia illucens*, anch'esse disciolte in acqua.

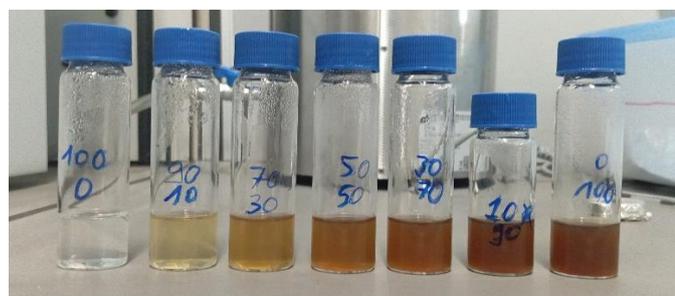
Considerando la concentrazione di PVA calcolata precedentemente, sono stati pesati 2,20 g di PVA estratto in Soxhlet e sono stati disciolti in 100 mL di acqua deionizzata. La soluzione è stata inserita in un bagno termostato con agitazione costante mostrato in **Figura 4.1(a)**, e la temperatura è stata impostata a 65 °C per favorire la dissoluzione completa del PVA senza alterazioni chimiche del polimero. Nella vasca è stata inserita anche una beuta contenente l'idrolizzato proteico. Dopo un'ora, quando il PVA si era totalmente sciolto, le soluzioni di PVA e proteine sono state miscelate in delle fiale mostrate in **Figura 4.1(b)**, ottenendo un volume totale di 10 mL secondo le proporzioni volumetriche in **Tabella 4.1**.

**Tabella 4.1** Composizione delle soluzioni PVA/Proteine

PVA [%]	Proteine [%]
100	0
90	10
70	30
50	50
30	70
10	90
0	100



(a)



(b)

**Figura 4.1:** Bagno termostato (a) e soluzioni con diverse percentuali di PVA e proteine (b)

Dopodiché le sette soluzioni con diverse concentrazioni di PVA e proteine sono state rimesse nel bagno termostato a 65 °C sotto agitazione per un'ora.

In seguito, le soluzioni sono state prelevate dal bagno termostato e, previa miscelazione di ogni campione con l'agitatore Vortex in **Figura 4.2**, per assicurare una distribuzione omogenea delle proteine nella matrice di PVA, le soluzioni sono state versate in navicelle di poliestere quadrate, scelte per le loro proprietà antiaderenti che facilitano la rimozione del film una volta asciutto. Durante il versamento, si è cercato di garantire una distribuzione uniforme, riducendo al minimo la presenza di bolle d'aria. Gli stampi sono stati poi collocati in una cappa aspirante in piano per evitare variazioni di spessore e a temperatura ambiente, per favorire l'essiccazione dei film promuovendo una rimozione graduale dell'acqua senza stress termici, fino all'eliminazione completa dell'acqua residua e il consolidamento della struttura del film.



**Figura 4.2** Vortex Velp

Dopo circa 48 ore i film sono risultati secchi, così da poterli rimuovere manualmente dagli stampi. Una criticità è stata riscontrata nei campioni con il 90% e il 100% di proteine, che non sono riusciti a staccarsi dagli stampi. Questo fenomeno è attribuibile alla fragilità del materiale e alla limitata capacità delle proteine di formare una matrice coesa e autoportante, oltre alla maggiore adesione del materiale agli stampi. Infine, i film sono stati conservati in un ambiente a umidità e temperatura controllata (20 °C e 65% RH) per stabilizzarne il contenuto in umidità prima delle analisi successive.



**Figura 4.3** Film PVA/proteine (da sinistra verso destra in percentuali: 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100)

I film ottenuti dalla miscelazione di PVA e proteine mostrano proprietà visive e strutturali diverse, influenzate direttamente dalla loro composizione. I film appaiono generalmente abbastanza lisci e con una distribuzione omogenea del materiale. Tuttavia, nei campioni con un'elevata concentrazione di proteine, emergono delle irregolarità superficiali. Per quanto riguarda la colorazione, i film con una percentuale maggiore di PVA risultano più trasparenti, mentre quelli con una composizione proteica elevata sono più opachi, con un aumento dell'intensità di colore con l'aumento delle proteine. Inoltre, i film con una predominanza di PVA sono più resistenti e maneggevoli, mentre quelli con un'elevata percentuale di proteine risultano più fragili e inclini a rompersi, soprattutto lungo i bordi.

## 4.2. Caratterizzazione delle bioplastiche

### 4.2.1. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

Come illustrato nella **Sezione 3.2.6.**, anche in questo caso l'analisi FT-IR è stata condotta con lo spettrofotometro FT-IR NEXUS Thermo Nicolet in **Figura 3.7**, utilizzando la tecnica ATR (Riflettanza Totale Attenuata) e l'elaborazione dei dati è stata svolta tramite il software OMNIC. Le condizioni operative rimangono invariate.

### 4.2.2. Analisi Termogravimetrica (TGA)

L'analisi TGA costituisce una tecnica per indagare la degradazione termica dei materiali, e in questa tesi è stata eseguita utilizzando la strumentazione TGA/DSC 1 prodotta da Mettler Toledo mostrata in **Figura 4.4**, per rilevare le variazioni di massa sotto riscaldamento controllato all'interno di una fornace. In **Appendice A.2.** è presente un approfondimento dello strumento. L'elaborazione dei dati e la programmazione delle prove sono state effettuate tramite il software STARE SW 9.30, che ha permesso di ottenere sia le curve TGA che le derivate DTG, fondamentali per identificare le temperature critiche di degradazione.



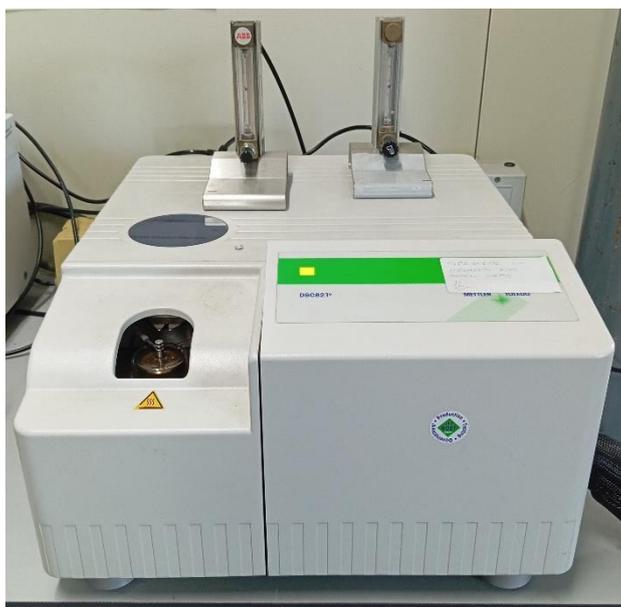
**Figura 4.4** TGA Mettler Toledo

Per ottenere risultati affidabili, è necessario provvedere alla pulizia del forno e dei crogioli, riscaldandoli fino a temperature molto elevate di almeno 900°C, per eliminare ogni traccia organica. La fornace viene inizialmente aperta per il posizionamento del portacampione, a cui è stata fatta la tara. Successivamente, è stato caricato il campione, mantenendo una massa compresa tra 5 mg e 20 mg. Per i campioni costituiti interamente da proteine, è stata scelta una quantità inferiore, circa 1 mg, per evitare fenomeni di rigonfiamento durante il riscaldamento che avrebbero potuto causare la caduta del campione. Inoltre, il materiale deve essere posto uniformemente al fondo del crogiolo, massimizzando l'esposizione al gas. Dopo aver posto il crogiolo con dentro il campione sulla bilancia della TGA, all'interno della fornace, si può aprire il gas impostandone il flusso volumetrico. Inoltre, tramite software, si può fissare il range di temperatura la velocità di riscaldamento, per poi iniziare le prove.

L'impiego di azoto (N<sub>2</sub>) come gas di purga, con un flusso regolato a 70 mL/min, ha garantito un'atmosfera inerte, eliminando eventuali interferenze dovute a processi ossidativi. Questo approccio ha permesso di concentrarsi esclusivamente sui processi di decomposizione termica. Le analisi sono state condotte su un intervallo di temperatura compreso tra 30°C e 700°C, con una velocità di riscaldamento costante di 10°C/min.

#### 4.2.3. Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

La DSC è una tecnica utilizzata per studiare le proprietà termiche dei materiali, misurando il flusso di calore tra un campione e un riferimento inerte durante un riscaldamento. Analizzando la curva DSC, che mostra l'andamento del flusso di calore rispetto alla temperatura e al tempo, è possibile individuare alcuni fenomeni termici. L'analisi DSC è stata condotta per la caratterizzazione termica dei film costituiti da miscele di PVA e proteine estratte dalle larve di *Hermetia illucens*, utilizzando un calorimetro DSC 821e di Mettler Toledo mostrato in **Figura 4.5**. Questo strumento opera secondo il principio del flusso di calore, ovvero il calore è fornito da un'unica sorgente, e il campione e il riferimento si trovano nello stesso forno. Grazie al software STARe SW 9.30, è stato possibile programmare le analisi e interpretare le curve termiche risultanti. Per ulteriori dettagli si rimanda in **Appendice A.3**.



**Figura 4.5** DSC 821<sup>e</sup> Mettler Toledo

Una corretta preparazione del campione è fondamentale per ottenere risultati precisi e ripetibili. Il campione viene posto in dei crogioli di alluminio, costituiti da una parte inferiore, chiamata capsula, e da una parte superiore, ovvero il coperchio. Per pesare la quantità di campione si è usata una bilancia microanalitica Mettler MT5, mostrata in **Figura 4.6**, che consente di pesare quantità dell'ordine del microgrammo con elevata precisione, essendo dotata di un sistema automatico rotativo che riduce l'influenza delle vibrazioni o delle correnti d'aria durante la misurazione. Dopo aver messo il crogiolo all'interno della bilancia, facendone la tara, viene messo il campione al suo interno. Inoltre, è essenziale avere dei campioni omogenei per evitare artefatti legati a distribuzioni irregolari di massa o composizione. Successivamente, la capsula viene posta in una pressa per crogioli e, sopra di essa, viene posto il coperchio, sul quale viene applicata una pressione controllata attraverso una manovella manuale, assicurando che le due

parti del crogiolo siano sigillate. In questo modo, si garantisce un'efficace trasmissione del calore e una riduzione delle perdite. A questo punto con un punzonatore, prima viene schiacciato il coperchio e poi vengono effettuati tre fori per rendere possibile il passaggio del gas all'interno del forno. Infatti, per il corretto funzionamento dello strumento, ci deve essere un'atmosfera di misura, la quale può essere inerte come con l'azoto, utilizzato in questa tesi, il quale può prevenire ossidazioni, oppure reattiva, come con l'aria, che favorisce specifiche reazioni chimiche. Successivamente si rimuove il coperchio della DSC, e si pone il crogiolo con il campione, accanto a quello di riferimento. Chiuso il coperchio, si può procedere con l'impostazione delle condizioni operative da software, tra cui il range di temperatura e la velocità di riscaldamento, che non deve essere troppo alta, in quanto si possono distorcere i picchi, ma neanche troppo bassa, rischiando di allungare inutilmente l'esperimento.



**Figura 4.6** Bilancia microanalitica Mettler MT5

Le analisi sono state condotte in un intervallo di temperatura compreso tra 50°C e 500°C, con una velocità di riscaldamento fissata a 5°C/min. Durante l'intero processo, un flusso continuo di azoto a 10 mL/min ha creato un'atmosfera inerte, necessaria per prevenire ossidazioni o decomposizioni indesiderate. Per i film contenenti miscele di PVA e proteine sono stati utilizzati campioni di massa compresa tra 2,5 e 3 mg, un intervallo che ha permesso di ottenere segnali stabili e interpretabili. Tuttavia, per i campioni proteici puri, si è scelto di ridurre la massa a circa 1 mg per evitare problemi di rigonfiamento delle proteine durante il riscaldamento.

Una volta ottenuto il termogramma, si può calcolare la percentuale di cristallinità del campione misurando l'area del picco di fusione che corrisponde all'entalpia di fusione ( $\Delta H_f$ ). Quest'area si può calcolare attraverso il metodo dei trapezi, prendendo come estremi i punti di intersezione con la linea di base del termogramma. Poiché i campioni analizzati contengono proporzioni variabili di PVA e proteine, è necessario normalizzare l'entalpia di fusione rispetto alla quantità di PVA presente. Il valore risultante corrisponde all'energia necessaria per fondere il PVA presente nel campione, permettendo così di capire in che misura la cristallinità del PVA sia influenzata dalla presenza delle proteine. Successivamente, l'entalpia di fusione riferita al PVA si può confrontare con il valore misurato per il campione di PVA puro, considerato come riferimento, consentendo di valutare in che modo la cristallinità del PVA nei campioni misti differisca rispetto al PVA puro. Complessivamente, il grado di cristallinità relativa ( $X_c$ ) del PVA nei campioni contenenti proteine si può calcolare con la formula (4.1).

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\left(\frac{\%PVA}{100}\right) \times \Delta H_{f,100\%PVA}} \times 100 \quad (4.1)$$

#### 4.2.4. Solubilità in acqua

L'analisi della solubilità consente di valutare la capacità dei film di dissolversi in acqua, che dipende dalla loro composizione, dalla struttura interna e dalle interazioni con il solvente. Lo scopo dell'analisi è quello di esaminare il comportamento dei film caratterizzati da diverse composizioni di PVA e proteine, misurando la quantità di materiale solubile dopo immersione e scuotimento in acqua.

Per determinare la solubilità, sono stati presi pezzi di film il più uniformi possibili. Per questo motivo, si è scelto di non analizzare il campione di sole proteine, in quanto troppo fragile da poterlo staccare dagli stampi. Successivamente, i pezzi sono stati essiccati in un forno ventilato impostato a 50°C, per rimuovere completamente ogni traccia di umidità residua. Una volta essiccati, i campioni sono stati conservati in un contenitore ermetico contenente gel di silice, mostrato in **Figura 3.5(b)**, per prevenire il riassorbimento di umidità dall'ambiente. La massa secca iniziale è stata poi registrata con l'ausilio di una bilancia analitica di precisione mostrata in **Figura 3.5(a)**. La fase successiva ha previsto l'immersione dei campioni in acqua distillata, scelta per evitare interferenze derivanti da sali o altre impurità. Ogni campione è stato immerso in 50 mL di acqua contenuti in una beuta mantenuta a temperatura ambiente (circa 25°C). Per garantire un'esposizione omogenea dei campioni con il solvente durante la fase di immersione, le beute sono state fissate tra due barre di metallo in un agitatore meccanico, assicurandone così la stabilità durante l'agitazione. Il movimento è stato di tipo oscillante, permettendo un continuo rimescolamento del liquido. L'immersione in continua agitazione è durata 24 ore, per consentire la dissoluzione delle componenti solubili presenti nei film. Al termine dell'immersione, il contenuto delle beute è stato sottoposto a **filtrazione sottovuoto**, utilizzata per separare i residui solidi dal liquido rimanente. Il sistema di filtrazione Millipore mostrato in **Figura 4.7(a)** è composto da un imbuto di Büchner, un filtro di carta con porosità di 5 micron, una beuta filtrante e una pompa a vuoto. I filtri, prima di essere utilizzati, sono stati essiccati in stufa a 105°C, per misurarne il peso secco. L'imbuto di Büchner è composto da più elementi. La parte superiore consiste in un cilindro verticale destinato a contenere la soluzione da filtrare. Nella parte inferiore si trova una superficie perforata, sopra la quale viene posizionato un filtro di carta, e un collo conico che si collega alla beuta filtrante. Per assicurare stabilità durante l'operazione, le due parti vengono fissate tramite una pinza metallica. Questo sistema evita movimenti accidentali, contribuendo a mantenere il vuoto e garantendo un processo di filtrazione senza perdite. L'imbuto di Büchner è stato montato sulla beuta filtrante con una guarnizione in sughero per garantire una connessione ermetica. Infine, è stata collegata la pompa a vuoto al sistema attraverso un tubo nella beuta filtrante. Dopo l'assemblaggio, le soluzioni sono state versate nella parte superiore dell'imbuto e si è proceduto all'attivazione della pompa a vuoto, che ha generato una pressione negativa, facilitando il passaggio del liquido attraverso il filtro e trattenendo i residui solidi sulla sua superficie come si può vedere in **Figura 4.7(b)**. Terminata la filtrazione, i filtri di carta sopra i quali sono rimasti i residui solidi sono stati trasferiti in un forno a 50°C, dove sono rimasti fino al raggiungimento di un peso costante. A questo punto, conoscendo il peso secco dei singoli filtri, si può calcolare il peso dei residui solidi con una bilancia analitica.



(a)



(b)

**Figura 4.7** Sistema di filtrazione sottovuoto (a) con filtro di carta 5  $\mu\text{m}$  (b)

L'intero procedimento è stato ripetuto tre volte per ciascuna composizione di film. A questo punto, conoscendo il peso dei campioni secchi prima e dopo la filtrazione, si può procedere al calcolo della solubilità per ogni prova con la formula (4.2).

$$\text{Solubilità}(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100 \quad (4.2)$$

I valori ottenuti da ciascuna ripetizione sono stati successivamente impiegati per calcolare la media e la deviazione standard, ovvero la variabilità nei dati, della solubilità per ogni composizione di film.

#### 4.2.5. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

La SEM è una tecnica analitica che sfrutta un fascio di elettroni per esaminare la morfologia di un campione. Per comprendere le caratteristiche superficiali dei film a base di PVA e proteine derivate da insetti, è stata effettuata un'analisi SEM utilizzando un microscopio modello ZEISS mostrato in **Figura 4.8**, gestito tramite il software SmartSEM. In **Appendice A.2.** è presente un approfondimento dello strumento.



**Figura 4.8 SEM ZEISS**

Per effettuare un'analisi al SEM, è necessario eseguire una precisa preparazione dei campioni. Per questo si usano dei portacampioni metallici a disco con una base piatta che assicura un fissaggio stabile. Questi vengono posti in un supporto per portacampioni, che è uno strumento la cui funzione è facilitare la preparazione simultanea di più campioni, mantenendo più portacampioni stabili. Successivamente si applica un nastro biadesivo, modellato grazie a un taglierino, sul quale viene posta una piccola porzione di campione con delle pinzette. Gli strumenti utilizzati sono mostrati in **Figura 4.9**.



**Figura 4.9 Kit di preparazione dei campioni per la SEM**

Successivamente, dato che si trattano campioni non conduttivi, si è usato un metallizzatore Quorum Q150R ES Plus mostrato in **Figura 4.10**, per effettuare un doppio rivestimento di oro attraverso il processo di sputtering per conferire ai film conducibilità elettrica. Si utilizza l'oro in quanto ha un'ottima conducibilità elettrica, è chimicamente stabile e non si ossida facilmente, garantendo un rivestimento duraturo. Inoltre migliora l'emissione di elettroni secondari,

contribuendo a immagini SEM più dettagliate e nitide. Il campione viene posizionato nella camera del metallizzatore su un supporto conduttivo, assicurandosi che sia stabile. Successivamente, la camera viene evacuata tramite una pompa, eliminando l'aria per prevenire interazioni indesiderate tra gli ioni e le molecole presenti nell'atmosfera. A questo punto viene introdotto un gas inerte, ovvero argon, a bassa pressione. Applicando un campo elettrico tra il catodo, cioè il bersaglio d'oro e l'anodo, il gas argon si ionizza, creando un plasma necessario per la fase successiva. Gli ioni di argon vengono accelerati verso il bersaglio d'oro. L'impatto con la superficie provoca il distacco degli atomi d'oro, che vengono proiettati verso il campione, e si depositano in maniera uniforme sulla superficie del campione, formando uno strato sottilissimo nell'ordine dei nanometri. Terminato il rivestimento, la camera viene riportata alla pressione atmosferica e il campione è pronto per l'analisi al SEM.

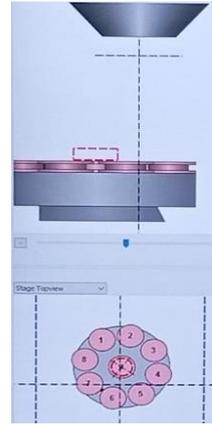


**Figura 4.10** Metallizzatore Quorum

A questo punto, i campioni sono stati inseriti nella camera del SEM, dove essi sono posizionati su uno stadio mobile, controllabile lungo gli assi x, y e z e regolabile in rotazione e inclinazione attraverso un Dual Joystick mostrato in **Figura 4.11(a)** e visualizzabile sul software nella schermata Stage Navigation come mostrato in **Figura 4.11(b)**. Nella camera è stato creato un ambiente a vuoto controllato per ottimizzare l'interazione tra il fascio di elettroni e le superfici dei campioni. Una pompa meccanica ha inizialmente rimosso la maggior parte delle molecole d'aria, e in seguito una pompa turbomolecolare ha permesso di raggiungere un vuoto elevato per evitare interferenze tra molecole residue e fascio elettronico, garantendo immagini nitide e ad alta risoluzione.



(a)



(b)

**Figura 4.11** SEM Dual Joystick e schermata Stage Navigation

Per quanto riguarda i parametri operativi del SEM, il Beam Current è stato fissato a 20  $\mu\text{A}$ , mentre il voltaggio di accelerazione (ETH Target) è stato mantenuto a 20 kV. Inoltre, è stato utilizzato un rilevatore di elettroni secondari di tipo 1 (SE1), ovvero con un segnale prodotto da elettroni emessi superficialmente quando il fascio primario interagisce con il campione, ideale per analizzare la morfologia superficiale. Ogni immagine è stata ottenuta calibrando il fascio di elettroni e regolando la distanza di lavoro (WD) per ottimizzare la visualizzazione delle immagini.

#### 4.2.6. Water uptake

Il water uptake è un parametro che descrive la capacità di un materiale di assorbire umidità dall'ambiente circostante, influenzando su proprietà come la resistenza meccanica e la velocità di degradazione. Anche in questo caso si è effettuata la misura di questo parametro per le diverse composizioni dei film PVA/proteine.

Per la preparazione dei campioni, sono stati tagliati i bordi dei film, poiché tali aree possono presentare disomogeneità nella struttura o nella composizione, cercando di formare dei pezzi più omogenei possibile. Per i film composti interamente da proteine, dato che il materiale non poteva essere rimosso dallo stampo senza causare danni significativi ai campioni, non è stato possibile effettuare misurazioni di water uptake su questa composizione. Dopo questa fase, i campioni sono stati essiccati in una stufa a 50°C per eliminare qualsiasi traccia di umidità, garantendo che il calcolo del water uptake tenga conto solo dell'umidità assorbita durante il test. I campioni essiccati sono stati trasferiti in una stufa Memmert HPP 260 mostrata in **Figura 4.12**, calibrata per mantenere condizioni ambientali controllate a 20°C e 65% di umidità relativa. In queste condizioni, ogni campione è stato monitorato per valutare la quantità di umidità assorbita nel tempo. Le misurazioni del peso sono state effettuate utilizzando una bilancia analitica e sono state eseguite a intervalli di un'ora per le prime otto ore fino ad arrivare poi al peso dopo 24 ore, consentendo di analizzare sia le fasi iniziali che quelle a regime del processo di assorbimento.



**Figura 4.12** Stufa Memmert HPP 260

Il water uptake (%) è stato calcolato tramite la formula (4.3).

$$\text{Water Uptake}(\%) = \frac{W_{umido} - W_{secco}}{W_{secco}} * 100 \quad (4.3)$$

Per ciascuna composizione, sono state condotte tre prove utilizzando campioni distinti, riducendo le incertezze legate alla variabilità nella preparazione dei campioni e nella procedura sperimentale.

#### 4.2.7. Spessore

Lo spessore di un materiale è un parametro che serve per calcolare le sue proprietà meccaniche. Per i film a base di PVA e proteine, si è deciso di utilizzare un comparatore digitale e successivamente un microscopio ottico, permettendo di confermare i risultati ottenuti. Non è stato possibile misurare lo spessore dei film al 90% e al 100% di proteine, poiché non sono risultati abbastanza coesi per essere rimossi dagli stampi in maniera adeguata.

Il **comparatore digitale**, mostrato in **Figura 4.13**, è un modello Fowler electronic digital indicator con una risoluzione di 0,01 mm (0.0005”).

Inizialmente, il comparatore digitale è stato calibrato utilizzando un vetrino coprioggetto, che ha permesso di impostare uno zero. A questo punto, i campioni sono stati posizionati sotto la punta del comparatore. Per ciascun campione, lo spessore è stato misurato in diversi punti distribuiti uniformemente sulla superficie.



**Figura 4.13** Comparatore digitale Fowler

Per confermare i risultati ottenuti, si è deciso di misurare gli spessori mediante un **microscopio ottico** Leica DMLP, mostrato in **Figura 4.14**, ovvero un dispositivo capace di ingrandire le immagini utilizzando un sistema di lenti. Per analizzare le immagini si è usato il software **LAS V4.12**. In **Appendice A.5**, è presente un approfondimento dello strumento.



**Figura 4.14** Microscopio ottico Leica DMLP

Per misurare lo spessore, il campione deve essere sottile, uniforme e correttamente orientato. Per questo si è deciso di effettuare una frattura fragile tramite immersione preliminare del campione in azoto liquido mostrato in **Figura 4.15**, avente una temperatura di  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , così da provocare un raffreddamento estremamente rapido, rendendo il campione fragile. Inoltre, si è utilizzato un gancio piegato a  $90^{\circ}$  come supporto che consentisse di mantenere il campione stabile durante le fasi di raffreddamento, di rottura e di analisi al microscopio. Una volta raffreddato, il campione è stato sottoposto a una sollecitazione meccanica mirata a causare la frattura. Il risultato è una superficie di frattura pulita e priva delle deformazioni plastiche tipiche delle rotture duttili.



**Figura 4.15** Serbatoio criogenico di azoto liquido

I diversi campioni preparati sono stati posizionati sotto il microscopio ottico e, utilizzando il software, si sono catturate le immagini delle sezioni trasversali, effettuando le misurazioni dello spessore.

#### 4.2.8. Dinamometria

Per caratterizzare le proprietà meccaniche dei film ottenuti combinando PVA e proteine estratte da insetti, sono state condotte prove di trazione, utilizzando un dinamometro elettronico Zwick Roell Z005, mostrato in **Figura 4.16**, il quale è dotato di una cella di carico con capacità massima di 5 kN. In **Appendice A.6.** è presente un approfondimento dello strumento. Inoltre, si è utilizzato il software TestXPer III per impostare i parametri delle prove e analizzare i risultati in curve dinamometriche che mettono in relazione la forza esercitata e l'allungamento provocato. In particolare, per ogni campione si sono calcolati il modulo elastico, attraverso il coefficiente angolare della porzione lineare delle curve, la resistenza a trazione e la deformazione a rottura.



**Figura 4.16** Dinamometro Zwick Roell Z005

Per agganciare i campioni sono stati utilizzati dei morsetti con una forza di serraggio massima di 50 N, mostrati in **Figura 4.17(a)**. Per ogni composizione dei film, sono stati analizzati cinque campioni che sono stati tagliati a forma di striscette rettangolari di dimensioni 2 mm x 2,5 cm. Queste dimensioni ridotte sono state scelte in base alla resistenza meccanica dei materiali e alle capacità del dinamometro. Data la loro piccola dimensione, per la preparazione dei campioni, è stata utilizzata una lente d'ingrandimento con luce circolare da tavolo mostrata in **Figura 4.17(b)**, che ha permesso di tagliare i film con maggiore precisione. Per evitare che i campioni scivolassero durante la prova, sono stati applicati piccoli pezzi di sughero alle estremità delle strisce, migliorando l'aderenza. La distanza iniziale tra i morsetti, fissata a 1,5 cm, è stata scelta per garantire che la deformazione misurata avvenisse principalmente nella sezione centrale del campione, riducendo al minimo l'influenza delle zone di presa. Analogamente alla misura degli spessori, non si sono analizzati i campioni al 90% e al 100% di proteine, poiché non sono risultati abbastanza coesi per essere rimossi dagli stampi adeguatamente, rendendo impossibile ottenere campioni adatti per la prova a trazione.



(a)



(b)

**Figura 4.17** Morsetti da 50 N del dinamometro (a) e lente con luce circolare da tavolo (b)

#### 4.2.9. Angolo di contatto

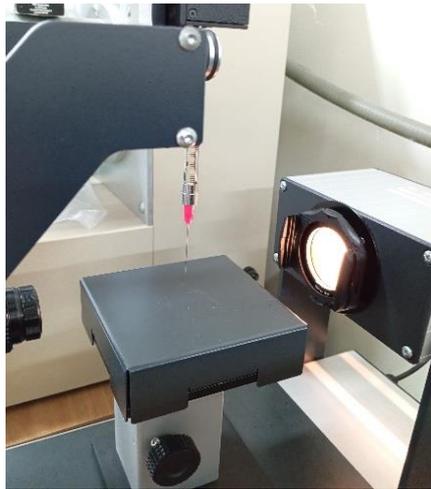
L'angolo di contatto è un parametro che serve per comprendere la bagnabilità di un materiale, analizzandone l'interazione con un liquido ed è visibile dal profilo della goccia di liquido sulla superficie del solido.

In questa tesi, per le misurazioni è stato utilizzato un goniometro ottico EasyDrop mostrato in **Figura 4.18**. In **Appendice A.7** è presente un approfondimento dello strumento.



**Figura 4.18** Goniometro ottico EasyDrop

Le gocce d'acqua sono state generate tramite un ago in acciaio inox mostrato in **Figura 4.19(a)** con diametro di 0.5 mm, collegato a una siringa di precisione impostata su una portata di 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ , con un volume di goccia pari a 10.5  $\mu\text{L}$ . È stata utilizzata acqua ultrapura (mQ) ottenuta tramite il sistema Merck Millipore Direct-Q 3 UV mostrato in **Figura 4.19(b)**, per evitare contaminazioni che avrebbero potuto alterare i risultati. Il goniometro ottico è dotato di una lampada alogena regolabile che permette la visione della goccia durante l'esperimento. Le immagini sono state acquisite tramite una fotocamera CCD monocromatica con un frame rate di 25/30 fps, supportata da un obiettivo zoom 6 $\times$  e da un intervallo di misurazione compreso tra 1° e 180°. L'illuminazione è stata ottimizzata per garantire un certo contrasto, migliorando la precisione nella misurazione dell'angolo di contatto.



(a)



(b)

**Figura 4.19** Ago del goniometro ottico (a) e dispositivo per la produzione di acqua ultrapura (b)

I film costituiti da PVA e proteine, dopo esser stati tagliati in un formato adatto, sono stati fissati su dei vetrini con del nastro adesivo per garantire la stabilità del campione. I film con una percentuale di proteine pari al 90% e al 100%, non potendo essere staccati dagli stampi in maniera uniforme, non sono stati presi in considerazione.

Le analisi sono state condotte con il metodo della goccia sessile, che consiste nel posizionare una goccia di liquido sulla superficie del materiale, osservandone il profilo determinato dalla tensione superficiale e dalle interazioni con il substrato. Per catturare l'immagine appropriata, è stato registrato un video, selezionando il frame in cui la goccia raggiunge il film e si stabilizza. Dopo aver acquisito le foto, l'angolo di contatto è stato calcolato tramite il software Drop Shape Analysis utilizzando il metodo delle tangenti, ovvero tracciando una tangente al profilo della goccia nella zona di contatto con il materiale e misurando l'angolo formato con la superficie.

#### 4.2.10. Test di biodegradabilità

Per analizzare la degradazione dei film composti da PVA e proteine da insetto, sono stati condotti test di biodegradabilità replicando l'ambiente tipico del suolo. L'esperimento ha avuto lo scopo di monitorare la perdita di massa dei film nel tempo e di studiare le variazioni della loro composizione chimica.

Per ciascun tipo di film, sono stati ritagliati campioni di dimensioni adeguate e sottoposti a essiccazione in stufa a 50°C, così da ottenere il peso secco iniziale. Successivamente, i campioni sono stati inseriti in sacchetti di poliestere (PET), con lo scopo di proteggerli dal contatto diretto con l'acqua e dagli effetti meccanici del suolo e di recuperare senza difficoltà i film degradati. L'esperimento è stato condotto utilizzando un vaso riempito di terra prelevata dal giardino del CNR, composta da terriccio, piccoli rami, foglie, insetti, vermi e sassolini. Inizialmente è stato messo uno strato di terra sul fondo del vaso. Successivamente sono stati messi in maniera uniforme i sacchetti contenenti i film ed in seguito è stato cosparso un ulteriore strato di terra che ha ricoperto completamente i campioni. Per rendere realistica la biodegradazione, il suolo è stato mantenuto umido tramite irrigazioni periodiche. I film con il 90% e il 100% di proteine non sono stati presi in considerazione. Ogni composizione di film aveva un set di cinque campioni, così da poter dissotterrare periodicamente una serie di campioni per farne le analisi. Le estrazioni sono avvenute a intervalli di 10/20/30/60/90 giorni.



**Figura 4.20** Vaso con film di PVA/proteine con diverse composizioni all'interno di sacchetti di PET

I campioni recuperati sono stati posti in stufa a 50 °C, per ottenere il peso secco post-degradazione e la perdita di massa è stata calcolata con la formula (4.4). I valori dei pesi fanno riferimento alle misure dei singoli film senza sacchetto.

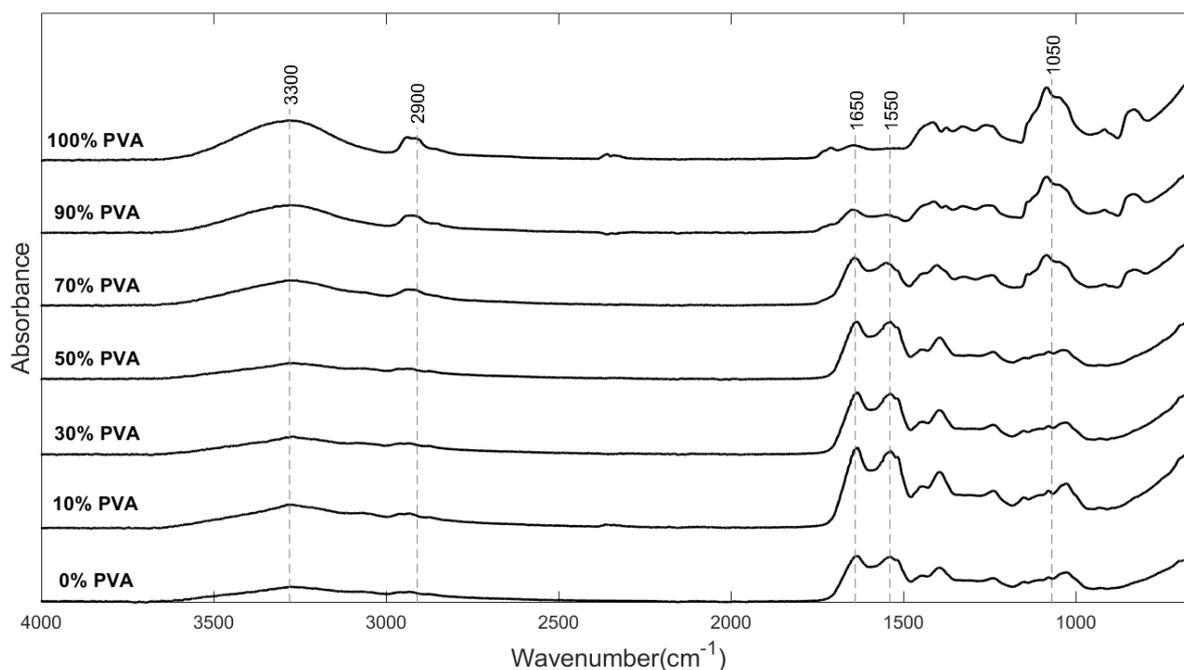
$$\text{Perdita di massa [\%]} = \frac{\text{massa iniziale} - \text{massa finale}}{\text{massa iniziale}} \quad (4.4)$$

Oltre al calcolo della perdita di peso, si sono effettuate delle analisi FT-IR, che forniscono informazioni sui cambiamenti chimici che questi materiali subiscono nel tempo.

### 4.3. Risultati e discussione

#### 4.3.1. Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR)

Una volta prodotti i film biodegradabili composti da alcol polivinilico (PVA) e proteine in diverse composizioni mostrati in **Figura 4.3**, è stata effettuata l'analisi spettroscopica FT-IR per identificare le bande caratteristiche dei diversi film, fornendo informazioni sulle interazioni tra i due componenti. Questo confronto è visibile in **Figura 4.21**, dove gli spettri sono stati confrontati per poter evidenziare le differenze.



**Figura 4.21** Spettri FT-IR dei film PVA/proteine con diverse composizioni

Nei film composti esclusivamente da PVA, la banda situata a circa  $3300\text{ cm}^{-1}$  appare ampia e intensa, segno distintivo dei legami idrogeno intra- e intermolecolari tra i gruppi O-H del polimero. Questa banda riflette la natura idrofila del PVA e la sua capacità di formare una struttura cristallina stabilizzata dai legami idrogeno. Nel momento in cui si introduce una maggiore quantità di proteine nelle miscele, si nota un ulteriore allargamento della banda e una riduzione della sua intensità. Questo comportamento è attribuibile all'interferenza delle vibrazioni N-H delle proteine e alla formazione di nuovi legami idrogeno tra i due componenti. Infine, nei campioni con basso contenuto di PVA la banda diventa meno definita, indicando la predominanza delle vibrazioni N-H rispetto ai legami O-H.

Spostandosi nella regione a circa  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ , nel PVA puro, il picco risulta definito, rappresentando lo stiramento dei legami C-H nelle catene alchiliche. Tuttavia, con l'aumento della concentrazione proteica nei blend, l'intensità di questi picchi si attenua progressivamente, riflettendo la diluizione del PVA nella matrice. Nei campioni composti interamente da proteine, questi picchi scompaiono quasi completamente, indicando che le proteine non contribuiscono significativamente a questa regione dello spettro.

Diversamente, le bande amide I a circa  $1650\text{ cm}^{-1}$  e II a circa  $1550\text{ cm}^{-1}$ , che sono associate ai segnali delle strutture secondarie delle proteine come  $\alpha$ -eliche, foglietti  $\beta$  o random coil, risultano più intense nei film più proteici, mentre le blend con maggior PVA mostrano una riduzione progressiva dell'intensità, evidenziando comunque che le proteine mantengono la presenza di legami ammidici anche nelle miscele.

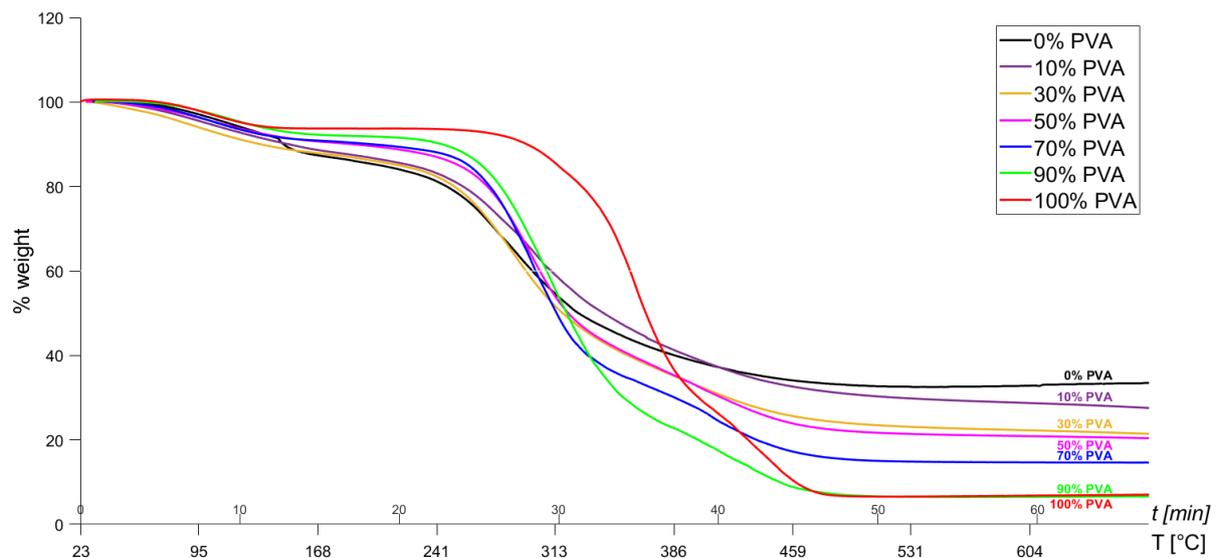
Infine, si può notare un picco intenso a circa  $1050\text{ cm}^{-1}$  nei film con maggior quantitativo di PVA, rappresentativo dei legami C-O. Difatti, questa banda è fortemente associata alla cristallinità del PVA. Nei blend con proteine, la banda mostra una riduzione di intensità man mano che il contenuto proteico aumenta, segnalando una parziale riduzione della cristallinità del PVA, rimanendo comunque preservata in buona parte, dimostrando la coesistenza fisica dei due materiali.

Nel complesso, questa analisi degli spettri FT-IR evidenzia la compatibilità tra PVA e proteine nelle miscele, grazie alle interazioni non covalenti, come i legami idrogeno. Il PVA mantiene una certa cristallinità, mentre le proteine anche se parzialmente idrolizzate mantengono ancora un certo peso molecolare come dimostra la presenza di legami ammidici, e si può affermare che è possibile lo sviluppo di materiali biodegradabili con proprietà ottimizzate in base alla composizione.

#### 4.3.2. Analisi Termogravimetrica (TGA)

Durante l'intera prova, il software ha registrato continuamente le variazioni di massa in funzione della temperatura, producendo curve TGA, che rappresentano la perdita di massa cumulativa. Inoltre, sono state tracciate le curve DTG, che evidenziano i tassi di degradazione massima. Da queste analisi si sono potuti ricavare dei parametri principali, che sono la temperatura di decomposizione iniziale ( $T_{onset}$ ), la temperatura di picco ( $T_{peak}$ ) e il residuo finale.

Partendo dai risultati delle analisi TGA dei film a base di PVA e proteine con diverse composizioni mostrati in **Figura 4.22**, si può notare come la composizione chimica dei film influenzi il loro comportamento termico. L'obiettivo principale delle analisi è studiare le dinamiche di degradazione termica dei film polimerici.



**Figura 4.22** TGA dei film PVA/proteine con diverse composizioni

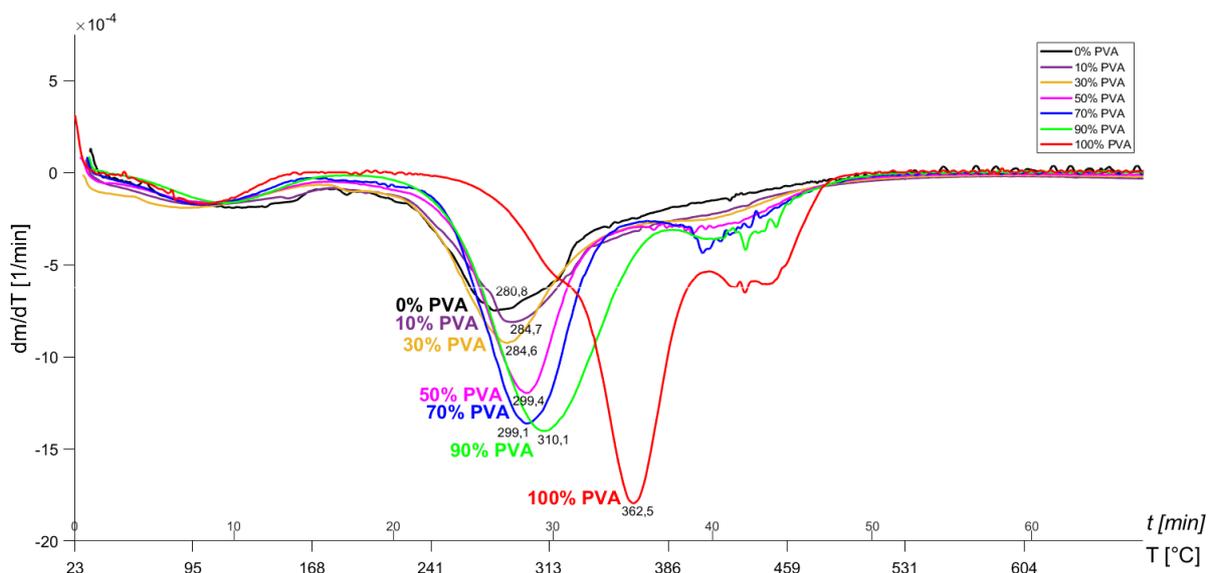
La **temperatura di onset** è la temperatura alla quale la decomposizione del materiale diventa significativa ed è ricavata tramite il software utilizzando il metodo della tangente, ovvero come l'intersezione tra la tangente al punto in cui il peso inizia a diminuire e quella al punto di flesso della curva TGA. Prima della vera decomposizione, però, si registra una prima perdita di massa dovuta all'evaporazione dell'acqua residua presente nel campione, generalmente a temperature inferiori ai 120 °C. Per questo, la  $T_{onset}$  è calcolata nella seconda fase di degradazione. L'analisi delle  $T_{onset}$  ottenute rivela che c'è un aumento di essa all'aumentare della concentrazione di PVA, corrispondente a una maggior stabilità termica del materiale. Questo comportamento indica che il PVA esercita un effetto stabilizzante sulla matrice polimerica, ritardando l'inizio della decomposizione termica. In particolare, il film composto unicamente da proteine presenta la temperatura più bassa, pari a 128,1 °C, in linea con la natura delle proteine, le quali tendono

a degradarsi a causa della denaturazione delle loro strutture e della rottura dei legami intermolecolari. L'aggiunta minima di PVA porta a un incremento significativo della  $T_{onset}$ , che raggiunge i 235,7 °C, evidenziando il forte impatto stabilizzante del PVA. Con l'aumento della concentrazione di PVA, si osserva un progressivo incremento fino ad arrivare a 333,4 °C nel caso del PVA puro. L'incremento della  $T_{onset}$  con l'aumento della percentuale di PVA suggerisce che il polimero forma legami idrogeno con i gruppi funzionali delle proteine, contribuendo a stabilizzare la struttura del materiale, limitando la mobilità molecolare, rallentando così i processi di degradazione termica.

Per quanto riguarda invece il **residuo finale**, è un indicatore della quantità di residuo carbonioso che rimane dopo la decomposizione. Per ottenere una stima più accurata di questo residuo, si rapporta al peso secco, escludendo quindi l'umidità persa nella fase iniziale del riscaldamento. Per quantificare la perdita d'acqua, si prende in considerazione la massa iniziale di ciascun campione, confrontandola con la massa residua a 120°C, ovvero la temperatura fino alla quale la riduzione di massa è generalmente dovuta all'evaporazione dell'acqua. A questo punto, il residuo finale è stato calcolato in funzione del peso secco.

Nei campioni di sole proteine, il residuo finale è pari al 35,5%, un valore relativamente elevato attribuibile alla tendenza di lasciare un residuo carbonioso significativo dopo la decomposizione termica, piuttosto che decomporsi completamente in composti volatili. Con l'aggiunta di PVA, il residuo diminuisce progressivamente, dimostrando che la pirolisi è sempre più completa grazie al contributo del PVA. Nei campioni di PVA puro si arriva a un residuo finale del 7,4 %, confermando che questo polimero è un materiale che lascia un residuo carbonioso minore rispetto alle proteine.

Infine, sono state analizzate le curve DTG (Derivative Thermogravimetry) mostrate in **Figura 4.23**, ottenute calcolando la derivata numerica delle curve TGA. Queste curve indicano la velocità di perdita di peso in funzione della temperatura e permettono di identificare con precisione il punto in cui la decomposizione avviene più rapidamente.



**Figura 4.23** DTG dei film PVA/proteine con diverse composizioni

Da queste curve si può identificare la **temperatura di picco**, che rappresenta il momento in cui il materiale si decompone alla massima velocità. Questo parametro è essenziale per comprendere il comportamento dominante di ciascuna componente del film. Nel campione

composto esclusivamente da proteine, il picco della DTG si verifica a 280.8 °C, dove avviene la denaturazione e la rottura delle catene polipeptidiche. Con l'aumento del PVA, si osserva uno spostamento sempre più pronunciato del picco verso temperature più alte fino ad arrivare a 362.5°C con il PVA puro, evidenziando il crescente impatto del polimero, dato dalla sua stabilità termica maggiore rispetto alle proteine.

Per rendere i risultati delle analisi TGA più facilmente visualizzabili, si è costruita la **Tabella 4.2**, che sintetizza i principali parametri termici misurati per ciascuna composizione analizzata, evidenziando le differenze nei comportamenti termici in relazione alle diverse percentuali di PVA.

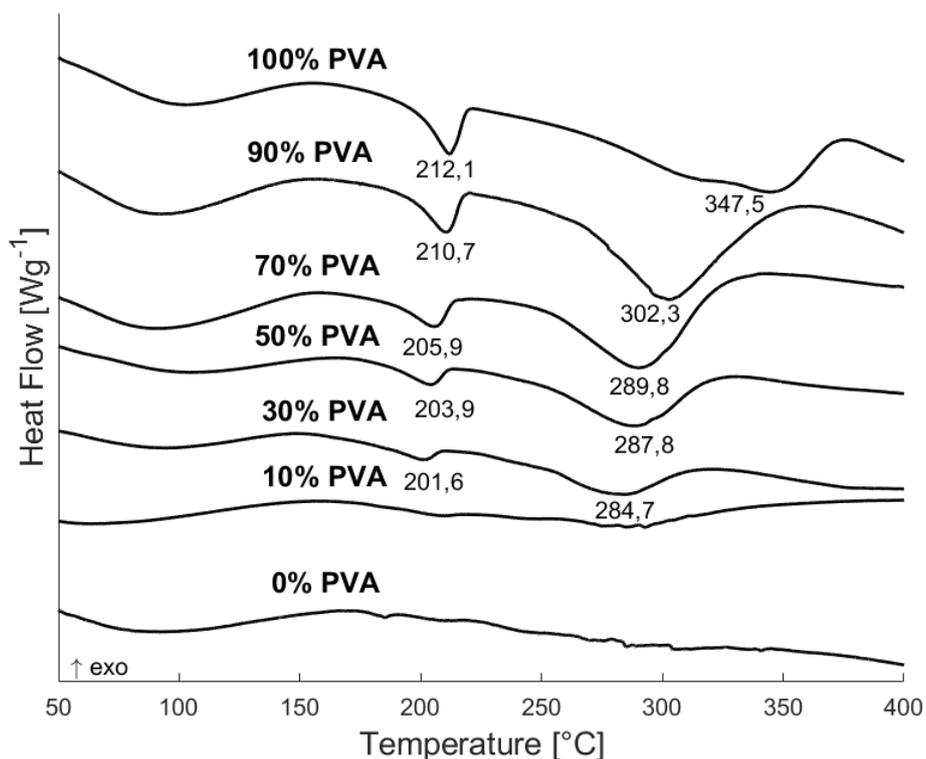
**Tabella 4.2** Parametri termici TGA film PVA/proteine con diverse composizioni

	T <sub>onset</sub> [°C]	T <sub>peak</sub> [°C]	Residuo [%]
0% PVA	128,1	280,8	35,5
10% PVA	235,7	284,7	29,4
30% PVA	241,8	284,6	23,3
50% PVA	260,3	299,4	21,6
70% PVA	268,1	299,1	15,5
90% PVA	275,9	310,1	6,9
100% PVA	333,4	362,5	7,4

In conclusione, si può dire che i campioni con alte percentuali di PVA offrono una maggiore resistenza al calore e una decomposizione controllata, rendendoli ideali per applicazioni in condizioni termiche elevate, mentre i campioni con basse percentuali di PVA sono indicati per applicazioni che non richiedono alta stabilità termica.

#### 4.3.3. Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

Gli obiettivi principali dell'analisi DSC sono quelli di identificare le principali transizioni termiche dei materiali, osservando fenomeni di degradazione termica, registrati come variazioni endotermiche o esotermiche nelle curve DSC. Questi risultati hanno permesso di analizzare anche le interazioni tra PVA e proteine, evidenziate da variazioni nelle temperature caratteristiche e nella morfologia dei picchi termici. I risultati di questa analisi sono visibili in **Figura 4.24**, in cui le curve rappresentanti le diverse composizioni dei film, sono messe a confronto.



**Figura 4.24** DSC dei film PVA/proteine con diverse composizioni

Le curve DSC analizzate evidenziano dei picchi endotermici. Il primo picco, localizzato intorno agli 80°C, è attribuibile all'evaporazione dell'umidità residua intrappolata nei film. Il secondo picco endotermico, osservato intorno ai 212 °C per il PVA puro, rappresenta il punto di fusione delle regioni cristalline del PVA, ovvero il passaggio a uno stato liquido delle sue strutture ordinate, essendo il PVA un polimero parzialmente cristallino. Anche in questo caso, facendo un confronto con la letteratura per il PVA puro, i risultati sono in linea. Difatti, per il PVA puro, il punto di fusione è riportato nella gamma 200-240°C, con una posizione precisa che può variare in base al grado di cristallinità [40]. Con l'aumento della concentrazione di proteine, si nota una progressiva riduzione dell'intensità di questo picco, mentre la sua temperatura subisce una leggera diminuzione. Questo comportamento suggerisce una diminuzione della cristallinità del PVA. Per verificarlo bisogna calcolare la percentuale di cristallinità relativa al campione di PVA puro attraverso la formula (4.1). Nei campioni con un contenuto di PVA pari al 10% e allo 0%, non è stato possibile identificare con chiarezza un picco di fusione. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto all'assenza di una fase cristallina significativa. Di conseguenza, tali campioni sono stati esclusi dal calcolo. I risultati sono elencati in **Tabella 4.3**.

**Tabella 4.3** Calcolo del grado di cristallinità relativo del PVA

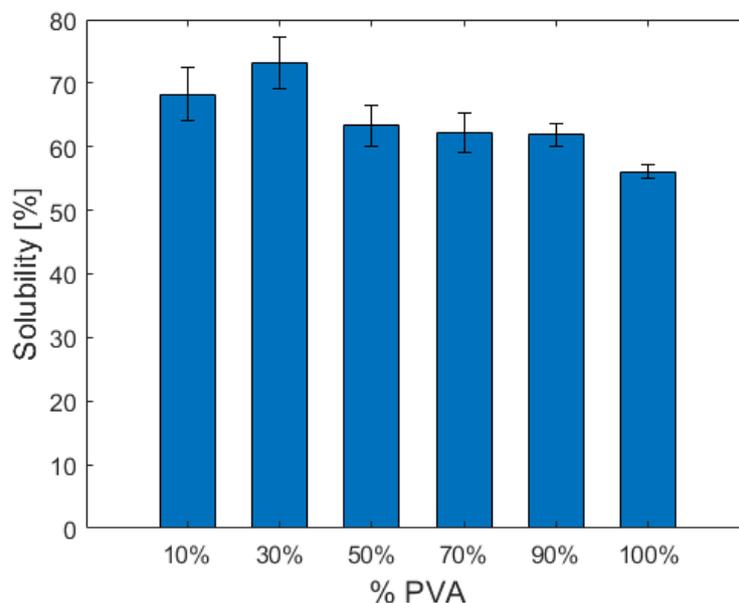
	$\Delta H_f$ [J/g]	$X_c$ [%]
100% PVA	4,3552	100
90% PVA	3,8424	98,25
70% PVA	2,5645	84,32
50% PVA	1,7062	78,18
30% PVA	0,2203	71,18

Dai risultati, si può notare una progressiva riduzione della cristallinità del PVA con l'aumento della frazione proteica. Questa tendenza può essere attribuita alle interazioni tra il PVA e le proteine, le quali si inseriscono tra le catene polimeriche, limitando il processo di cristallizzazione e favorendo una prevalenza di regioni amorfe all'interno del materiale, con possibili effetti sulle proprietà fisiche del materiale.

Dopo il picco di fusione del PVA, emerge un ulteriore evento endotermico a temperature più elevate. Questo fenomeno potrebbe essere associato alla degradazione delle proteine. Tuttavia, la sola DSC non fornisce una prova diretta della degradazione termica delle proteine, poiché il segnale di flusso di calore potrebbe derivare anche da altre trasformazioni, come transizioni di fase o la decomposizione di altri componenti presenti nel materiale. Per ottenere una conferma, è utile affiancare l'analisi DSC all'analisi TGA fatta precedentemente, in particolare esaminando la derivata della perdita di peso (DTG). Tuttavia, bisogna considerare che la DSC è stata condotta con un rateo di riscaldamento di 5°C/min, mentre la TGA con 10°C/min. Difatti, un incremento del rateo di riscaldamento tende a spostare le temperature di transizione verso valori più alti. Prendendo in considerazione le temperature dei picchi dell'evento endotermico dopo la fusione della DSC e le temperature di picco delle DTG, esse corrispondono con una differenza massima di 15°C. Ciò suggerisce che il fenomeno registrato nella DSC possa essere correlato alla degradazione delle proteine.

#### 4.3.4. Solubilità in acqua

Per ogni composizione, la solubilità dei diversi campioni è stata calcolata applicando la formula (4.2); successivamente, con i valori trovati, ne sono stati calcolati il valore medio e la deviazione standard, i quali sono riportati in **Figura 4.25**.



**Figura 4.25** Solubilità dei film PVA/proteine a diverse composizioni

I risultati sperimentali evidenziano delle diverse solubilità dei film in funzione della concentrazione di PVA e proteine. In generale, con l'aumentare della concentrazione di PVA, si osserva una progressiva riduzione della solubilità, accompagnata da una diminuzione della variabilità tra i campioni, misurata tramite la deviazione standard. Questo comportamento

riflette una transizione strutturale del materiale, che passa da una configurazione amorfa a una più cristallina, meno accessibile all'acqua.

A basse concentrazioni di PVA (10% e 30%), i film presentano una solubilità molto elevata, pari rispettivamente al 68.28% e al 73.26%. Questo risultato è attribuito alla predominanza di regioni amorphe lungo le catene polimeriche, caratterizzate da una disposizione disordinata e poco impacchettata, consentono alle molecole d'acqua di accedere facilmente ai gruppi idrossilici (-OH) del PVA e favorendo la formazione di legami idrogeno. La solubilità più bassa dei film al 10% di PVA rispetto a quelli con il 30% di PVA, potrebbe sembrare controintuitiva rispetto alla tendenza generale. Con solo il 10% di PVA, la quantità di polimero disponibile potrebbe non essere sufficiente a formare una matrice stabile e omogenea, lasciando alcune regioni del film dominate dalle proteine, che, in assenza di interazioni efficaci con il PVA, potrebbero comportarsi in modo diverso rispetto al resto della matrice. Le proteine, infatti, potrebbero aggregarsi o formare legami intermolecolari tra loro, riducendo la loro accessibilità all'acqua e rallentando così il processo di dissoluzione del materiale. Al contrario, con il 30% di PVA, il polimero, grazie ai suoi gruppi idrofili, riesce a interagire più efficacemente con le proteine e a conferire alla struttura una distribuzione più uniforme. Aumentando il contenuto di PVA, la solubilità diminuisce indicando la formazione sempre più crescente di regioni cristalline, che ostacolano le interazioni con l'acqua. Queste regioni, caratterizzate da una disposizione altamente ordinata delle catene polimeriche, limitano la disponibilità dei gruppi idrossilici per l'interazione con l'acqua, raggiungendo un punto di saturazione. Di conseguenza, le regioni amorphe, pur ancora presenti, iniziano a perdere la loro dominanza. Tra il 50% e il 70% di PVA, la solubilità si attesta al 63.34% e al 62.22% rispettivamente, quindi dei valori molto simili. Infine, al 90% di PVA, la solubilità media è pari al 61.88%, mentre per il PVA puro scende fino al 56.12%. La diminuzione della cristallinità del PVA all'aumentare della concentrazione in proteine è anche dimostrata dall'analisi in calorimetria a scansione differenziale fatta in precedenza.

Per dimostrare che il PVA diventa più solubile con l'aumento delle proteine, si possono prendere in considerazione i risultati delle solubilità dei film PVA/proteine 100/10 e 90/10. Se ipotizziamo che le proteine siano completamente solubili nella miscela 90/10, il contributo del PVA alla solubilità totale può essere stimato con la seguente equazione:

$$\text{Solubilità totale} = \text{Solubilità PVA} \times 90\% + \text{Solubilità proteine} \times 10\%$$

da cui, sostituendo i valori sperimentali:

$$\text{Solubilità PVA} = \frac{61,88\% - 10\%}{90\%} = 57,64\%$$

Questo valore risulta superiore alla solubilità del PVA puro (56,12%), indicando che la sua solubilità aumenta con la presenza delle proteine. Questo comportamento è coerente con la riduzione della cristallinità del PVA in presenza delle proteine, che favorisce una maggiore interazione con l'acqua e, di conseguenza, una maggiore solubilità.

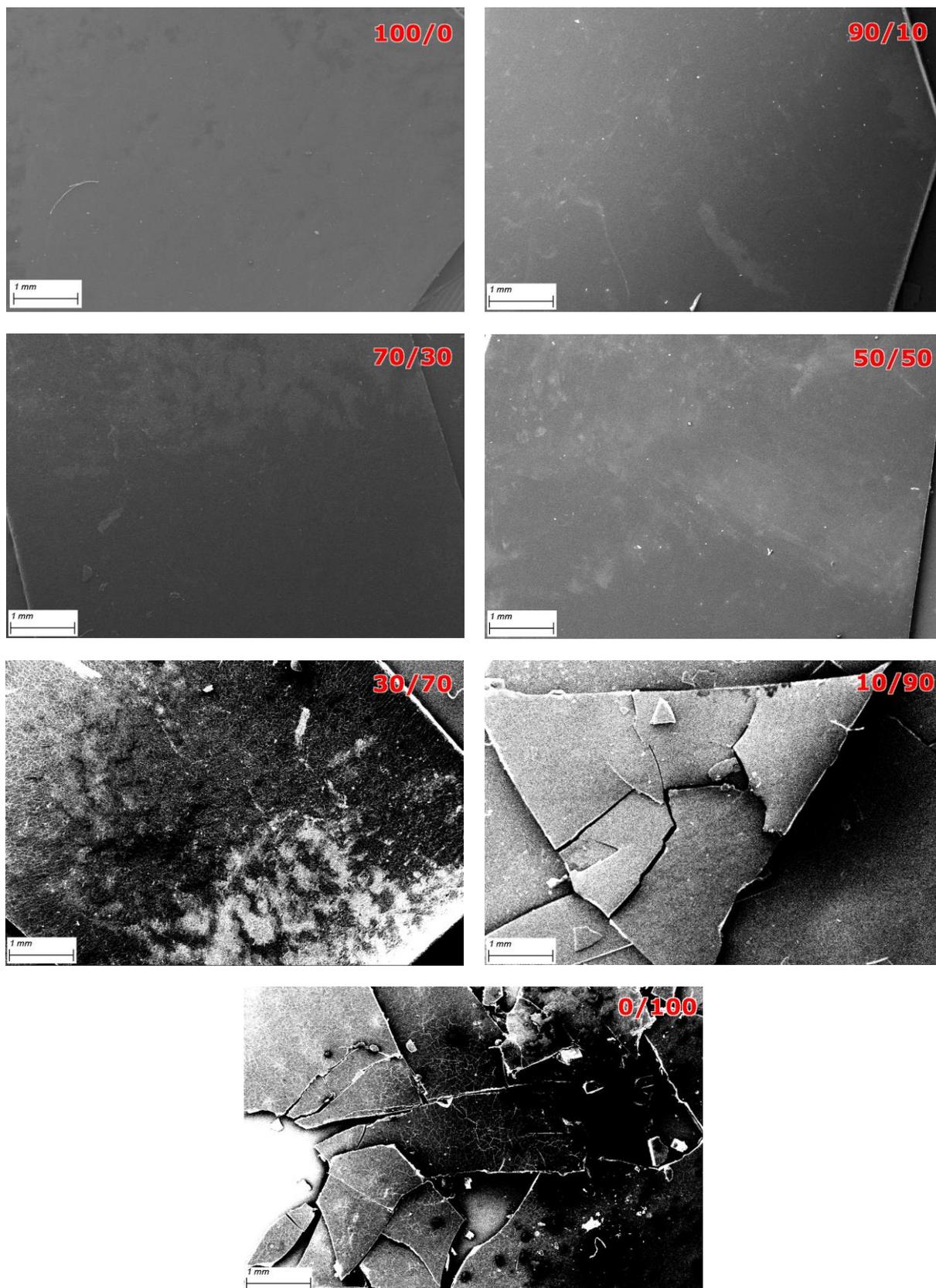
Inoltre, dai dati sperimentali emerge che entrambi i componenti della miscela sono solubili. Infatti, prendendo ad esempio la composizione 50/50, la solubilità complessiva misurata è pari al 63,34%, un valore superiore al 50%. Se solo uno dei due componenti fosse solubile, anche ipotizzando una solubilità del 100% per esso, la solubilità totale della miscela non supererebbe il 50%. Poiché il valore sperimentale è superiore a questa soglia, è evidente che non solo il PVA, ma anche le proteine contribuiscono alla solubilità complessiva del film.

Oltre alla solubilità media, un elemento fondamentale da considerare è la deviazione standard, che riflette la variabilità nei risultati ottenuti tra i campioni. A basse concentrazioni di PVA, la deviazione standard è relativamente alta. Questo suggerisce una maggiore eterogeneità tra i campioni, probabilmente dovuta alla distribuzione non uniforme delle regioni amorfe o a variazioni nella microstruttura del film. Con l'incremento della concentrazione di PVA, la deviazione standard diminuisce gradualmente, indicando una distribuzione sempre più strutturalmente omogenea.

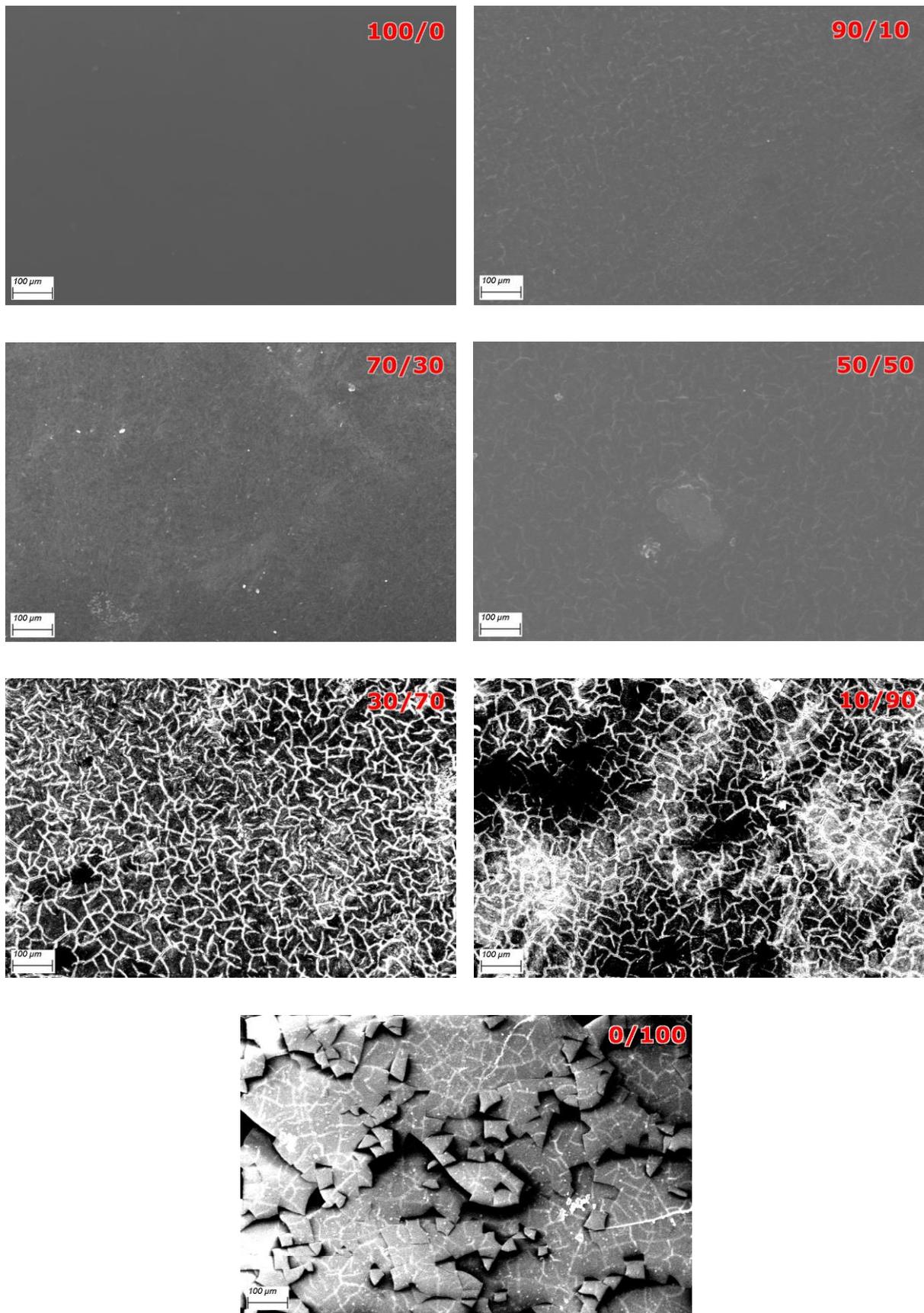
Da questi risultati possiamo dedurre che per applicazioni che richiedono una dissoluzione rapida in acqua, sono ideali basse concentrazioni di PVA, mentre per utilizzi che richiedono resistenza all'umidità, è preferibile utilizzare concentrazioni di PVA superiori.

#### 4.3.5. Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

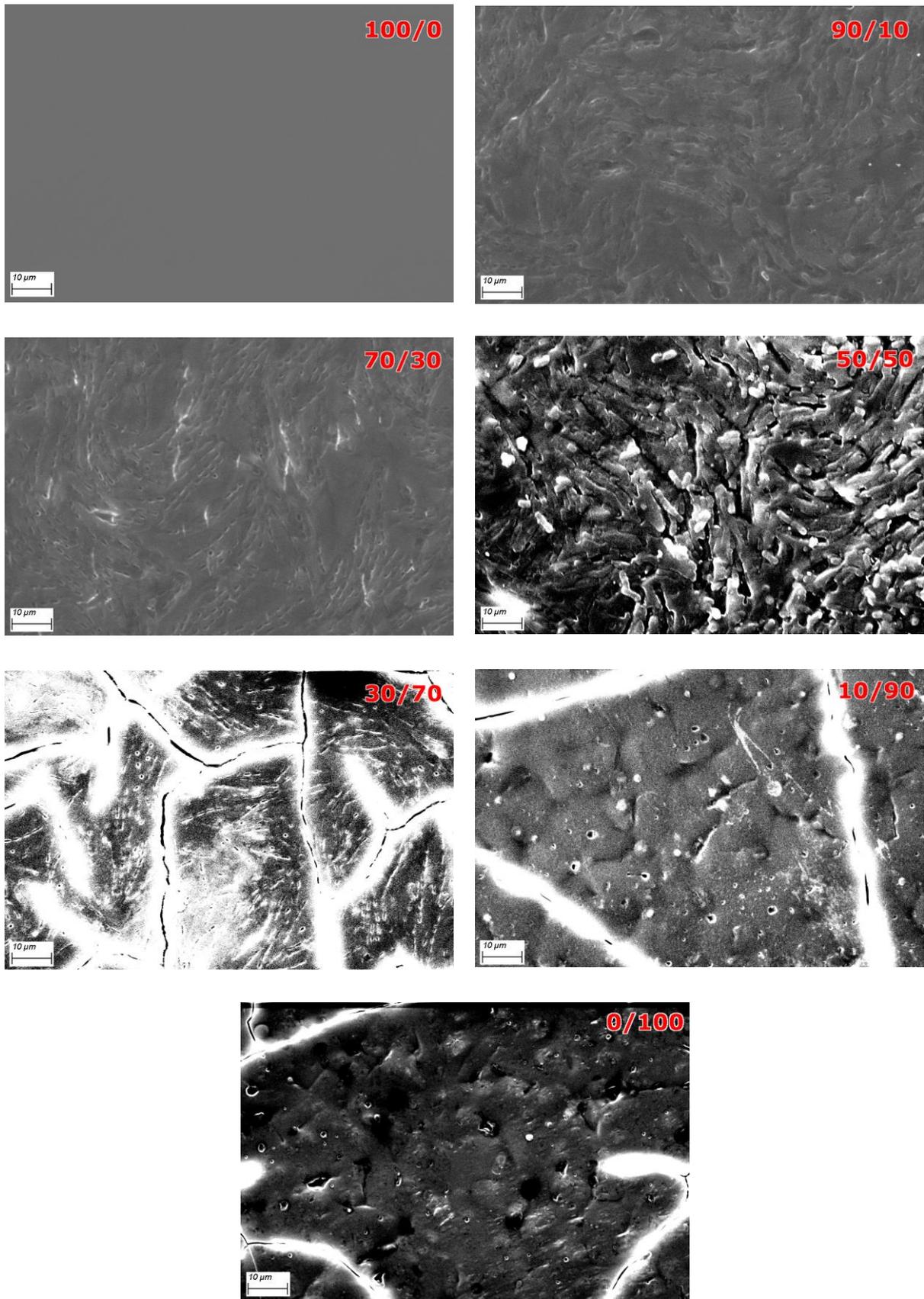
Le immagini SEM sono state acquisite con ingrandimenti differenti per ogni campione, consentendo un'analisi su più livelli. Un primo ingrandimento a 16X ha permesso di analizzare la superficie generale, evidenziando rugosità macroscopiche e difetti globali. Un secondo ingrandimento a 100X è servito per osservare dettagli più fini, come eventuali zone di aggregazione, mentre un ultimo ingrandimento a 1000X ha dato informazioni sull'omogeneità del campione attraverso l'analisi della sua rugosità superficiale a livello microscopico, mettendo in evidenza cricche, porosità o fenomeni di separazione di fase.



**Figura 4.26** Immagini SEM a 16X dei film PVA/proteine con diverse composizioni (in ordine come percentuali 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100)



**Figura 4.27** Immagini SEM a 100X dei film PVA/proteine con diverse composizioni (in ordine come percentuali 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100)



**Figura 4.28** Immagini SEM a 1000X dei film PVA/proteine con diverse composizioni (in ordine come percentuali 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100)

Le immagini SEM a 16X mostrate in **Figura 4.26**, rivelano come la composizione dei film PVA/proteine influenzi in modo significativo la struttura superficiale. A questo livello di ingrandimento, è possibile analizzare dettagli macroscopici, evidenziando come i film con maggiori percentuali di PVA mostrano superfici lisce e compatte, mentre con l'aumentare della quantità di proteine le superfici diventano progressivamente più irregolari e fragili. In tutti i campioni analizzati sono state rilevate tracce di polvere e impurità, presumibilmente introdotte durante la preparazione dei campioni. Tuttavia, questi elementi non sembrano avere un impatto significativo sulla morfologia totale dei film, ma potrebbero aver contribuito a difetti localizzati. Il film di PVA puro presenta una superficie liscia e uniforme, priva di crepe o porosità visibili. A 16X, la struttura appare compatta, confermando la capacità del polimero di formare una matrice densa e omogenea, grazie ai legami a idrogeno intramolecolari, che garantiscono resistenza e stabilità del film. L'aggiunta di una piccola quantità di proteine mantiene la superficie del film prevalentemente liscia e uniforme, ma emergono lievi variazioni nella trama, con la comparsa di piccoli segni di rugosità. Non si osservano pori o crepe significativi, il che indica che il PVA continua a dominare la matrice, garantendo la coesione strutturale. Aumentando la percentuale di proteine, si osservano irregolarità causate dall'aggregazione delle proteine, che iniziano a interferire con la coesione del PVA, facendo comparire in alcune aree piccole crepe e vuoti, segno di fragilità. Con il 70% di proteine, la superficie del film appare altamente irregolare e frammentata. Le immagini a 16X rivelano pori di dimensioni significative e crepe estese. Infine, le ultime immagini mostrano una superficie fortemente discontinua con una struttura destabilizzata, che porta a una fragilità tale che il film si rompa facilmente durante la manipolazione.

Successivamente sono state ottenute le immagini SEM con un ingrandimento a 100X per avere maggiori dettagli. I risultati sono mostrati in **Figura 4.27**. Per il film di PVA, la superficie risulta priva di imperfezioni confermando che il materiale forma una matrice isotropica e stabile. Con il 10% di proteine, emergono leggere disomogeneità appena percettibili, ma non si rilevano porosità e la matrice polimerica conserva la propria coesione. Con maggiori proteine, iniziano a comparire piccole crepe distribuite casualmente. Inoltre, alcune aree appaiono più scure, suggerendo la presenza di microvuoti o zone a densità ridotta, date da un inizio di separazione di fase tra PVA e proteine. Arrivati al 70% di proteine, la superficie è caratterizzata da una rete di crepe interconnesse, che si estendono su tutta l'area osservata, rendendo il materiale meno resistente a sollecitazioni meccaniche. Al 90% di proteine, la prevalenza di esse, produce aggregati che non riescono a integrarsi adeguatamente con il PVA residuo. La porosità è molto accentuata e la distribuzione disomogenea delle proteine crea punti di debolezza che favoriscono la formazione delle fratture. Infine, il film proteico mostra frammenti separati e bordi irregolari

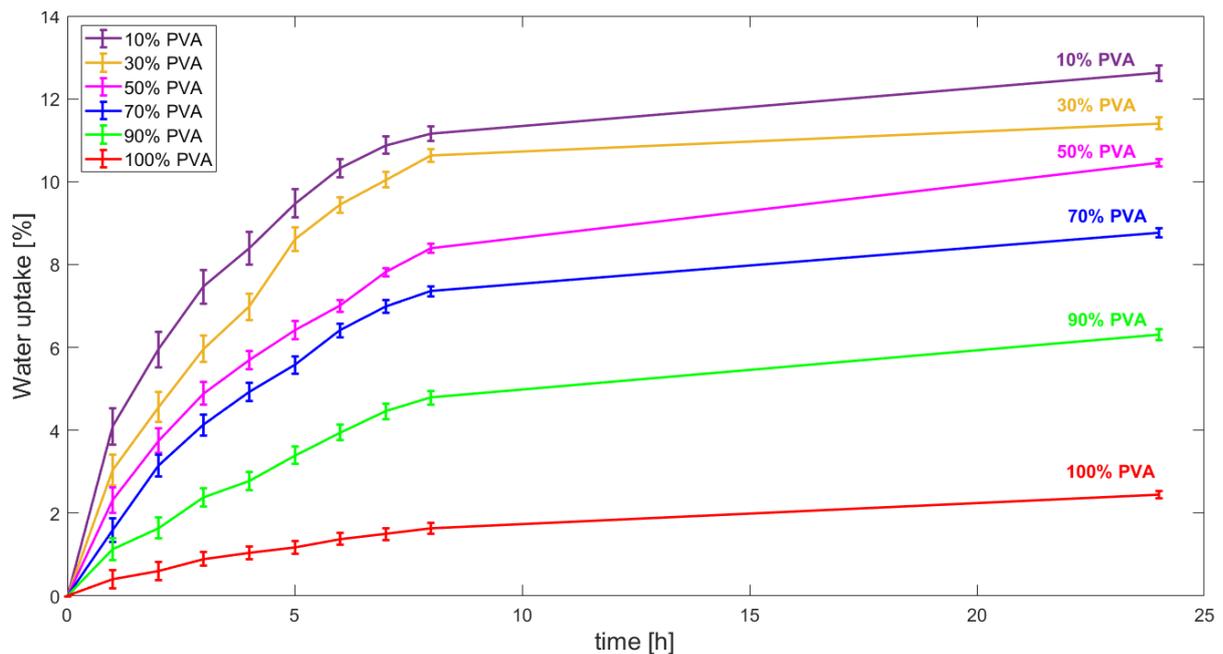
In seguito, sono state acquisite immagini SEM con un ingrandimento di 1000X per ottenere una visione ancora più dettagliata. I risultati sono riportati in **Figura 4.28**. Il film di PVA puro, come per le altre risoluzioni, mostra una superficie liscia e uniforme, con una buona integrità strutturale. L'aggiunta di proteine introduce leggere irregolarità. Con una prevalenza di proteine, i film assumono una morfologia caratterizzata da una superficie rugosa e discontinua con una struttura fragile, dove il PVA residuo agisce solo come legante, senza riuscire a garantire una coesione tra le fasi. Infine, il film composto interamente da proteine presenta una superficie piena di cavità e fratture.

L'analisi combinata delle immagini SEM effettuata a 16X, 100X e 1000X ha evidenziato un evidente cambiamento delle proprietà strutturali, meccaniche e funzionali nei film a base di PVA e proteine in relazione alla composizione. I film con elevate percentuali di PVA mostrano una struttura compatta e omogenea assicurando buone proprietà meccaniche, mentre con

l'aumento della componente proteica, emergono irregolarità, che compromettono la capacità del PVA di mantenere una matrice uniforme, rendendo la bioplastica molto fragile.

#### 4.3.6. Water uptake

La percentuale di water uptake è stata calcolata tramite la formula (4.3) per ciascuna composizione di film costituito da PVA e proteine. I risultati mostrati in **Figura 4.29**, sono stati riportati come medie aritmetiche dei tre test, correlate alle relative deviazioni standard per evidenziare la dispersione dei dati.



**Figura 4.29** Water Uptake dei film PVA/proteine a diverse composizioni

L'analisi delle curve del grafico mostra un significativo aumento del water uptake nelle prime otto ore per tutte le composizioni analizzate, seguito da un rallentamento progressivo che porta quasi a un plateau entro 24 ore. Questo andamento suggerisce che l'acqua inizialmente occupa i siti superficiali accessibili e i vuoti presenti nella matrice polimerica, per poi diffondersi più lentamente verso l'interno del materiale.

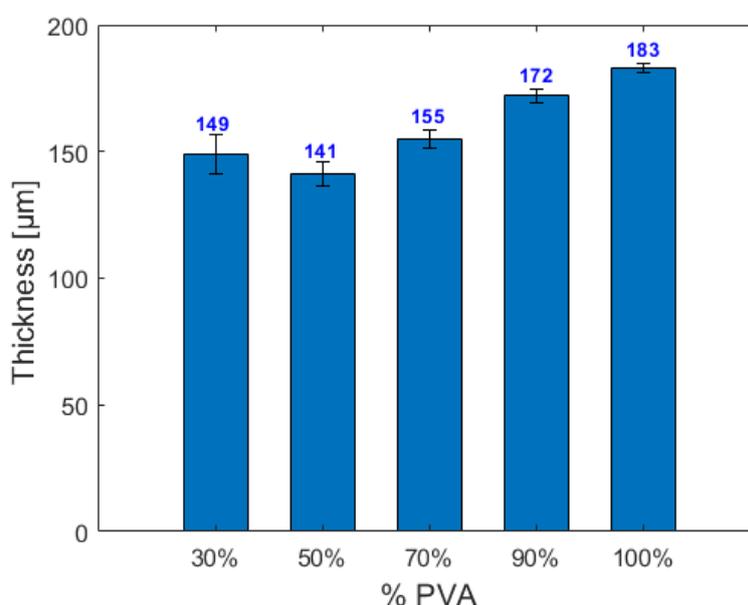
I film con un'elevata concentrazione di PVA mostrano valori di water uptake costantemente inferiori in ogni fase temporale. Questo comportamento è attribuibile alla struttura cristallina del PVA, che organizza le sue catene polimeriche in configurazioni ordinate e compatte, riducendo lo spazio disponibile per le molecole d'acqua e limitando la mobilità delle catene polimeriche che ostacolano ulteriormente la penetrazione dell'acqua. Inoltre, la bassa deviazione standard osservata in questi campioni suggerisce un comportamento omogeneo e prevedibile, grazie alla distribuzione uniforme del PVA all'interno del materiale. Al contrario, i film con una maggiore concentrazione di proteine presentano un assorbimento d'acqua decisamente più elevato. Le proteine, essendo prevalentemente amorfe, offrono un numero maggiore di siti idrofili, come gruppi amminici e carbossilici, che possono formare legami idrogeno con l'acqua. Questa struttura disordinata favorisce un assorbimento rapido nelle fasi iniziali e una maggiore capacità complessiva di trattenere umidità. Inoltre, i dati mostrano una

maggior variabilità nei campioni con alto contenuto proteico, che può essere attribuita a disomogeneità locali nella distribuzione delle proteine.

In generale, quindi, con l'aumento della componente proteica, si registra un incremento del water uptake, indicando che la presenza di proteine domina il comportamento igroscopico, mentre il PVA agisce come elemento strutturante. Per questo, i film ad alta concentrazione di PVA sono ideali per applicazioni in cui è necessaria una ridotta interazione con l'umidità, mentre i film con alta concentrazione di proteine, potrebbero essere più adatti a materiali che richiedono una biodegradabilità accelerata. Le composizioni miste rappresentano un compromesso, combinando la stabilità strutturale del PVA con la reattività delle proteine.

#### 4.3.7. Spessore

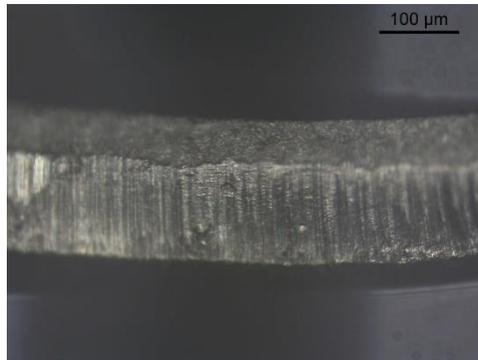
I dati raccolti dal comparatore digitale sono stati analizzati calcolando il valore medio dello spessore e la relativa deviazione standard, fornendo così anche informazioni sull'omogeneità dei film. I risultati sono rappresentati in **Figura 4.30**.



**Figura 4.30** Spessore film PVA/proteine con diverse composizioni

Si può notare che gli spessori dei film costituiti da PVA e proteine e la loro variabilità cambia in base alla composizione del blend. In particolare, l'analisi dei dati mostra che il film composto al 100% da PVA raggiunge lo spessore massimo, accompagnato dalla deviazione standard più bassa, dato che questo polimero forma una matrice omogenea e compatta grazie alle forti interazioni intermolecolari. Con l'introduzione delle proteine, lo spessore si riduce progressivamente, come anche l'aumento della deviazione standard. Ciò è dovuto al fatto che le proteine interrompono la struttura omogenea del PVA, generando una matrice più irregolare. A differenza della tendenza generale, quando il contenuto di PVA scende al 30%, lo spessore aumenta leggermente ma la deviazione standard continua ad aumentare rispetto alla composizione con il 50% di PVA. Questo risultato suggerisce che la struttura del film diventa ancora più irregolare, portando a domini proteici aggregati che introducono una significativa rugosità superficiale e un conseguente aumento dello spessore medio.

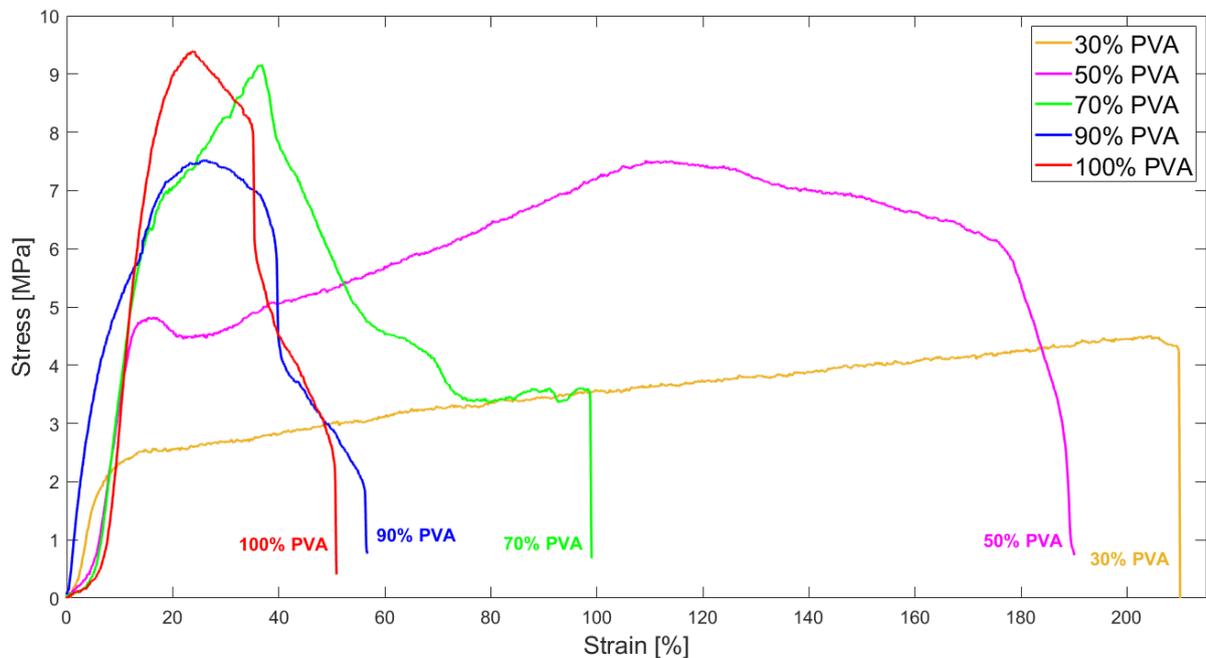
Utilizzando invece il microscopio ottico, un esempio di immagine osservata è mostrato in **Figura 4.31**. Le misurazioni hanno confermato uno spessore medio di 160  $\mu\text{m}$ , in linea con i dati forniti dal comparatore digitale.



**Figura 4.31** Immagine al microscopio ottico della sezione trasversale del film

#### 4.3.8. Dinamometria

Le prove di trazione hanno prodotto curve dinamometriche, in termini di forza in cN e allungamento in mm. Questi dati sono stati successivamente convertiti. Per ottenere in ordinata i valori della tensione in MPa, si è divisa la forza applicata per l'area della sezione trasversale del campione, determinata moltiplicando la larghezza del campione (2 mm) per il suo spessore calcolato precedentemente, mentre per determinare in ascissa i valori della deformazione in %, si è calcolato il rapporto tra l'allungamento misurato e la lunghezza iniziale tra i morsetti (1,5 cm). Le curve dinamometriche risultanti sono mostrate in **Figura 4.32**.



**Figura 4.32** Curve sforzo-deformazione dei film PVA/proteine con diverse composizioni

Le differenze nelle composizioni di PVA e proteine hanno mostrato un impatto significativo sulle proprietà meccaniche dei film. Grazie a queste misure, sono stati ricavati i principali parametri meccanici a trazione, ovvero la resistenza a trazione, cioè il valore massimo di stress registrato, la deformazione a rottura, ossia l'allungamento relativo massimo raggiunto e il modulo elastico, che rappresenta quanto un materiale si oppone alla deformazione. I risultati sono mostrati in **Tabella 4.4**.

**Tabella 4.4** Proprietà meccaniche a trazione dei film PVA/proteine con diverse composizioni

	Resistenza a trazione [MPa]	Deformazione a rottura [%]	Modulo elastico [GPa]
100% PVA	9,39	50,90	6,66
90% PVA	7,52	56,79	2,59
70% PVA	9,16	98,99	2,21
50% PVA	7,78	190,06	1,39
30% PVA	4,51	209,99	1,33

La **resistenza a trazione** rappresenta il massimo carico che un materiale può sopportare prima di rompersi, rapportato all'area della sua sezione trasversale. In generale, bisogna tenere in considerazione che questi film sono stati tenuti in ambiente condizionato umido (20 °C e 65% umidità relativa), per avere dati riferiti ad un ambiente preciso, il che potrebbe influire sui risultati in modo considerevole. Per i film di PVA puro, la resistenza a trazione è di 9,39 MPa, ovvero il valore più alto registrato, attribuibile alla struttura cristallina uniforme e stabile del PVA, che garantisce una distribuzione omogenea dello stress meccanico. Introducendo le proteine, la resistenza inizialmente cala, segnalando un'eterogeneità che peggiora la capacità del materiale di resistere allo stress, anche se con il 70% PVA, la resistenza torna ad aumentare, avvicinandosi ai valori del PVA puro. Questo risultato potrebbe suggerire che le proteine agiscono da plastificante, favorendo una distribuzione più equilibrata dello stress e una maggiore stabilità della rete cristallina. Aumentando ulteriormente la quantità di proteine, però, la resistenza diminuisce gradualmente, dato che la rete cristallina appare sempre più compromessa dalla dominanza dalle proteine.

La **deformazione a rottura** misura l'allungamento relativo del materiale al momento della rottura, fornendo una misura della sua duttilità e della capacità di assorbire deformazioni plastiche. Con l'aumento della quantità di proteine, la deformazione a rottura cresce gradualmente. In particolare, per il film di PVA, la deformazione è pari al 50,90%, riflettendo la moderata duttilità di questo polimero data dal fatto che la rete cristallina limita lo scorrimento delle catene polimeriche. Con il 10% di proteine, la deformazione sale leggermente, suggerendo un inizio di plasticizzazione che riduce la rigidità del materiale. Con l'aumento del contenuto proteico, la deformazione aumenta in modo sempre più evidente, raggiungendo il 209,99% con il 30% di PVA, grazie alla maggiore mobilità delle catene polimeriche che rende il materiale sempre più duttile.

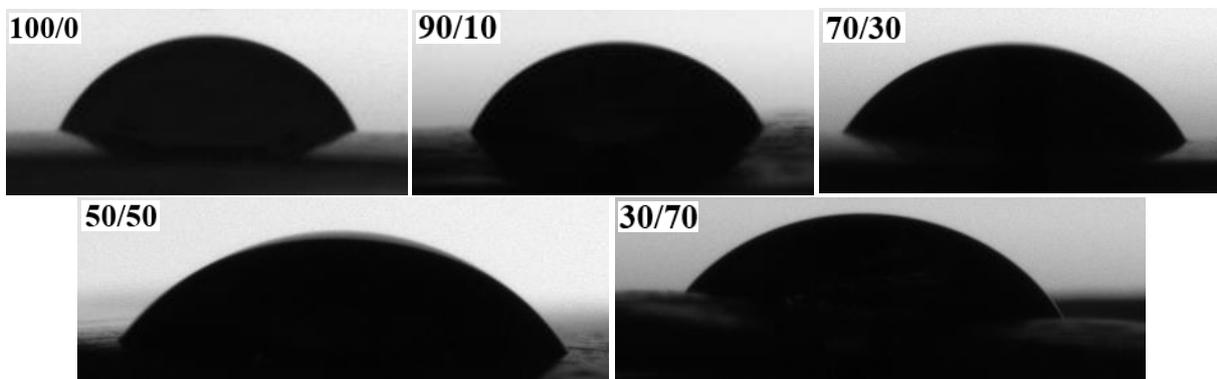
Il **modulo elastico**, noto anche come modulo di Young, quantifica la rigidità del materiale ed è definito come il rapporto tra la tensione e la deformazione durante la fase elastica, ovvero prima che si verifichino deformazioni permanenti. Il modulo elastico viene calcolato come il coefficiente angolare della porzione lineare della curva dinamometrica. Si può notare come il modulo diminuisca progressivamente con la riduzione della quantità di PVA. Con il 100% di

PVA, il film mostra elevata rigidità, garantita dalla sua struttura cristallina stabile. Con l'introduzione delle proteine il modulo scende di molto, per poi avere un graduale abbassamento, indicando un materiale sempre più morbido e meno resistente alla deformazione elastica, con una rete polimerica sempre meno rigida.

In generale, l'analisi dimostra che la composizione del materiale influisce profondamente sulle sue proprietà meccaniche. Materiali con alta percentuale di PVA offrono rigidità e resistenza, mentre composizioni con più alto contenuto proteico e quindi più elastiche, sono adatte per usi che richiedono maggiore deformabilità.

#### 4.3.9. Angolo di contatto

Per ciascuna composizione sono state effettuate diverse misure, ottenendo una media dell'angolo di contatto. In **Figura 4.33**, si vedono le foto della goccia di acqua sui film con diverse composizioni.



**Figura 4.33** Immagini dell'angolo di contatto dei film PVA/proteine con diverse composizioni (in ordine come percentuali 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70)

Dall'osservazione delle immagini si può notare che la forma della goccia si modifica progressivamente al variare della composizione del film. Questo suggerisce che la chimica superficiale del materiale condiziona l'interazione con l'acqua, influenzando l'equilibrio tra forze coesive e adesive. Nel campione di PVA puro, la goccia appare arrotondata, con un angolo di contatto elevato, indicando una scarsa affinità con la superficie e una tendenza a mantenere la forma compatta dovuta alla tensione superficiale dell'acqua. Con l'aumento della percentuale di proteine, si nota una sempre maggiore bagnabilità con la goccia che si appiattisce gradualmente, evidenziando un'alta affinità del film con l'acqua, coerente con la natura idrofila delle proteine.

Dopo aver acquisito le immagini, l'angolo di contatto è stato calcolato tramite il software Drop Shape Analysis, applicando il metodo delle tangenti. I risultati degli angoli di contatto sono mostrati in **Tabella 4.5**.

**Tabella 4.5** Angolo di contatto dei film PVA/proteine con diverse composizioni

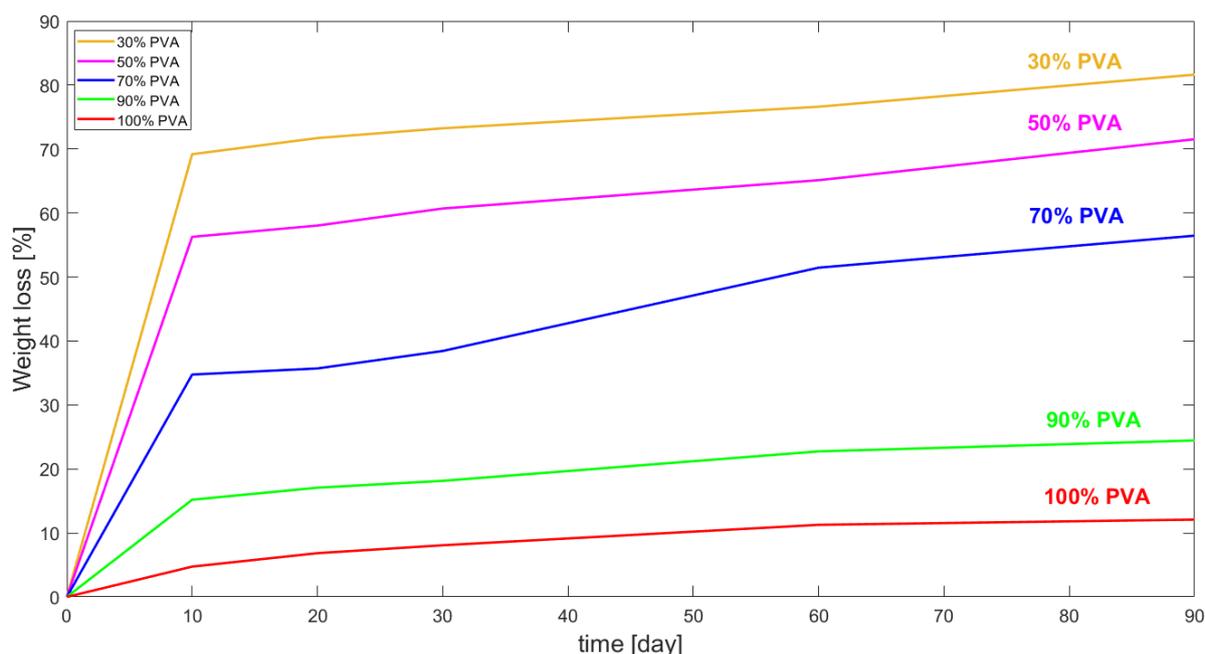
	Angolo di contatto
100% PVA	$67,6 \pm 0,41^\circ$
90% PVA	$65,6 \pm 0,54^\circ$
70% PVA	$59,7 \pm 0,67^\circ$
50% PVA	$56,1 \pm 0,80^\circ$
30% PVA	$53,7 \pm 0,95^\circ$

Come già osservato dalle immagini, si può notare che all'aumentare della percentuale di proteine, l'angolo di contatto diminuisce, indicando una maggiore idrofilia del film. Inoltre, l'incertezza della misura diventa sempre più accentuata, a causa della superficie sempre più irregolare dei film. Il film di PVA puro, pur essendo dotato di gruppi funzionali idrofili, presenta una certa componente semicristallina che potrebbe influenzarne la disponibilità sulla superficie. Nelle zone cristalline, infatti, l'impacchettamento più denso delle catene polimeriche riduce la mobilità molecolare, limitando potenzialmente l'esposizione dei gruppi idrofili. Questo fenomeno potrebbe avere un impatto diretto sulle proprietà di bagnabilità del materiale. Nei film con il 90% di PVA, il cambiamento è leggero, suggerendo che le proteine iniziano a modificare la chimica superficiale introducendo gruppi polari che favoriscono legami idrogeno con l'acqua, anche se il PVA resta predominante, mantenendo una certa resistenza alla diffusione del liquido. Con l'aumento delle proteine l'angolo diminuisce ulteriormente, grazie ai loro gruppi funzionali che facilitano l'interazione con le molecole d'acqua.

In sintesi, l'analisi dell'angolo di contatto conferma l'influenza delle proteine sulle proprietà superficiali, suggerendo potenziali ottimizzazioni per applicazioni mirate.

#### 4.3.10. Test di biodegradabilità

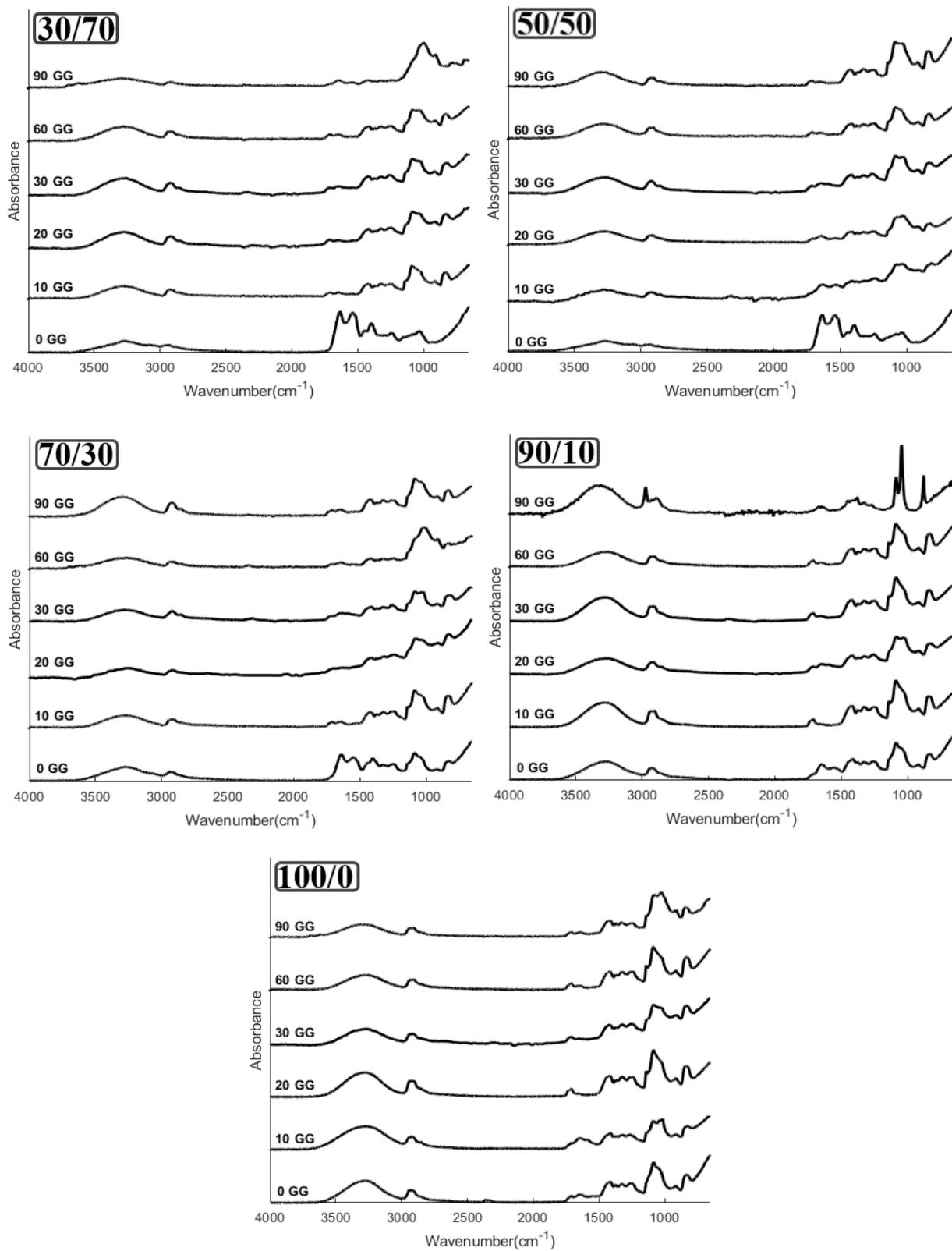
L'andamento della perdita di massa nel tempo calcolata con la formula (4.4), riportata in **Figura 4.34**, conferma che la biodegradabilità dei film dipende dalla composizione.



**Figura 4.34** Perdita di peso dei film PVA/proteine con diverse composizioni

Il comportamento delle curve evidenzia che i campioni con un maggiore contenuto proteico si degradano più rapidamente, probabilmente a causa della solubilità delle proteine idrofile, mentre quelli con una percentuale maggiore di PVA risultano più resistenti. In generale, si evidenzia una degradazione caratterizzata da una perdita di massa iniziale piuttosto rapida, seguita da un progressivo rallentamento. Il campione con il 30% di PVA subisce la degradazione più significativa, superando l'80% di perdita di peso dopo 90 giorni. Ciò indica che le proteine rappresentano il substrato che si degrada principalmente a causa dell'ambiente a cui è sottoposto. Il film con il 50% di PVA segue una tendenza simile, registrando una degradazione intorno al 72% dopo 90 giorni. Nonostante la maggiore quantità di PVA, la frazione proteica è ancora sufficiente a favorire una degradazione rapida. Nei campioni con il 70% di PVA, si nota una degradazione più contenuta, intorno al 56% dopo 90 giorni. La curva suggerisce una prima degradazione più rapida, legata alla perdita delle proteine seguita da un rallentamento dovuto al PVA, che sembra formare una matrice polimerica più compatta che rende il film meno suscettibile all'azione degli agenti degradativi. Il film con il 90% di PVA registra una perdita di peso molto più limitata, stabilizzandosi intorno al 25% di degradazione. Il PVA, oltre a essere più resistente, potrebbe proteggere indirettamente le proteine inglobate nella matrice polimerica. Infine, il film di PVA puro arriva ad avere una perdita di peso di solo il 12%, confermando che in queste condizioni, questo polimero risulta molto resistente. Infine, guardando gli andamenti finali delle curve, si può supporre che andando oltre i 90 giorni, i film con più proteine, per i quali non si è raggiunto un plateau, si degraderebbero ulteriormente fino ad arrivare a una degradazione pressoché completa.

Oltre al calcolo della perdita di peso, si sono analizzati gli spettri FT-IR, che sono stati registrati dopo il recupero dei vari campioni dal terreno e la loro essiccazione agli intervalli temporali precedentemente citati. I risultati per ogni composizione dei film sono mostrati in **Figura 4.35**.



**Figura 4.35** Spettri FT-IR dei film PVA/proteine con diverse composizioni in ordine come percentuali (30/70,50/50,70/30,90/10,100/0) durante diversi giorni dei test di biodegradabilità

La regione spettrale tra 3300 e 3400  $\text{cm}^{-1}$ , associata alle vibrazioni di stretching dei gruppi O-H e N-H, permette di valutare la presenza di gruppi idrossilici legati al PVA e a quelli amminici, tipici delle proteine. Nei campioni iniziali, ovvero prima di essere interrati, tutti i film mostrano una banda ben definita in questa regione, con un'intensità più alta nei campioni con un'alta percentuale di PVA, per la natura idrofila del polimero. Con il passare del tempo, nei campioni più ricchi di proteine si osserva un iniziale aumento dell'intensità della banda tra i 10 e i 30 giorni, probabilmente a causa dell'assorbimento d'acqua dovuto alla progressiva apertura della matrice polimerica, rendendo le proteine più accessibili all'azione degli enzimi microbici. Tuttavia, tra i 60 e i 90 giorni, l'intensità della banda diminuisce nei campioni più biodegradabili, indicando la degradazione in modo più incisivo sia delle proteine sia del PVA. Nei film con 90% e 100% di PVA, invece, la banda rimane abbastanza stabile, segnalando la persistenza della struttura idrofila del polimero. Le bande Amide I (1650  $\text{cm}^{-1}$ ) e Amide II (1550  $\text{cm}^{-1}$ ), indicatori della presenza di proteine, corrispondono rispettivamente alle vibrazioni di stretching del C=O nei legami peptidici e al bending N-H e stretching C-N. Nei campioni iniziali, le bande Amide I e II sono visibili in tutti i film con i due componenti, ovviamente sempre di più con l'aumentare del contenuto proteico. Dopo già dieci giorni, nei campioni con basso contenuto di PVA, si osserva una riduzione accentuata dell'intensità di queste bande, mentre nei campioni con maggiore PVA, la riduzione è più graduale, suggerendo che la matrice polimerica rallenti la degradazione. Infine, le bande tra 1000 e 1150  $\text{cm}^{-1}$ , attribuite alle vibrazioni C-O e C-H del PVA, sono definite in tutti i campioni prima dei test di biodegradabilità. Questa banda nel tempo non segue un andamento lineare, in quanto è influenzata anche dalla presenza della terra in cui sono stati effettuati i test di biodegradabilità. Nel presente studio, il suolo impiegato non è stato caratterizzato dal punto di vista microbiologico. Di conseguenza, non è possibile identificare quali microrganismi o enzimi abbiano partecipato alla degradazione dei film analizzati. Tuttavia, i materiali organici nel suolo vengono generalmente degradati da un insieme di ossidasi, idrolasi e proteasi, la cui attività dipende sia dalle proprietà del materiale sia dalle condizioni ambientali [22].

In conclusione, se si desidera un materiale altamente biodegradabile, è preferibile ridurre la percentuale di PVA. Al contrario, per una maggiore resistenza nel tempo, un contenuto più elevato di PVA garantisce una maggiore stabilità.

## 5. Conclusioni

Questa ricerca si è focalizzata sulla produzione e la caratterizzazione di film bioplastici, combinando alcol polivinilico (PVA) con proteine estratte dalle larve di *Hermetia illucens*. L'obiettivo principale è stato quello di sviluppare un materiale adattabile a diverse applicazioni che sia sostenibile e biodegradabile e che possa costituire una valida alternativa alle plastiche tradizionali, inserendo questo studio nel contesto della transizione ecologica e dell'economia circolare.

L'approccio sperimentale è partito dalla preparazione delle materie prime fino alla caratterizzazione delle proprietà dei film ottenuti. Per estrarre le proteine, si è adottata un'idrolisi controllata in autoclave, garantendo un'alta resa proteica. Successivamente, sono stati realizzati i film combinando PVA e proteine in differenti proporzioni, per valutare come la composizione influisse sulle proprietà chimiche, termiche, meccaniche, morfologiche e degradative dei materiali. Ad esempio, dall'analisi degli spettri FT-IR sono emerse le interazioni tra PVA e proteine, evidenziando la formazione di legami idrogeno che garantiscono una buona coesione della matrice polimerica, suggerendo una buona compatibilità tra i due componenti. Tuttavia, le immagini ottenute tramite microscopia SEM hanno evidenziato una distribuzione non uniforme delle proteine all'interno della matrice polimerica, con una tendenza alla formazione di aggregati nei campioni ad alta concentrazione proteica. Questa disomogeneità strutturale può influenzare le proprietà meccaniche del materiale, poiché gli aggregati fungono da zone di concentrazione degli stress. Difatti, i test meccanici hanno evidenziato una diminuzione della resistenza a trazione nei campioni con elevato contenuto proteico, sebbene in alcuni casi si sia riscontrato un aumento della duttilità. Ciò suggerisce che le proteine agiscono da plastificanti, conferendo maggiore flessibilità al materiale ma compromettendone la resistenza meccanica. Gli aggregati proteici precedentemente citati, inoltre, potrebbero influire anche sulle proprietà termiche, analizzate tramite analisi DSC e TGA, con le quali si è osservata una riduzione generale della stabilità termica e quindi anche della temperatura di fusione nei film con un contenuto proteico più elevato, confermando la natura amorfa delle proteine, che interferiscono con la cristallinità del PVA. Questo aspetto potrebbe richiedere l'uso di stabilizzanti termici per migliorare la resistenza al calore. In generale, per risolvere il problema degli aggregati proteici si potrebbe pensare di migliorare il processo di miscelazione. I test di assorbimento d'acqua hanno rivelato un aumento dell'idrofilicità con l'aumento della componente proteica. Questi ultimi risultati sono stati confermati anche dalla misura dell'angolo di contatto, che progressivamente diminuisce con una minor quantità di PVA, suggerendo che le proteine conferiscono un'elevata affinità con l'acqua. Per questo, film con un'alta percentuale di proteine potrebbero trovare impiego in applicazioni che richiedono elevata bagnabilità come adesivi biodegradabili o rivestimenti per superfici porose, tenendo però conto che in ambienti umidi, la stabilità dei film potrebbe essere compromessa. Difatti, dalle analisi effettuate, l'aumento della capacità di assorbire acqua è correlato a una riduzione della resistenza meccanica e termica. Per mitigare l'assorbimento d'acqua, si potrebbe ricorrere a trattamenti superficiali o all'uso di additivi idrofobizzanti. Infine, coerentemente con l'aumento dell'assorbimento d'acqua e con la ridotta stabilità termica e meccanica, i test di biodegradabilità, hanno dimostrato che un alto contenuto proteico accelera e garantisce la degradazione in ambiente naturale, rendendo i film ad alto contenuto proteico ideali per applicazioni a breve termine, sebbene sia necessario ottimizzare il tasso di degradazione per garantirne la durata in specifici contesti d'uso.

I risultati ottenuti confermano il potenziale delle bioplastiche a base di PVA e proteine da larve di *Hermetia illucens* come alternativa ecocompatibile alle plastiche convenzionali. Tuttavia, per una possibile applicazione su scala industriale, è necessario un miglioramento nella loro produzione, considerando delle applicazioni in particolare. Per esempio, pensando di voler

avere un miglioramento delle proprietà meccaniche, si può pensare all'integrazione di agenti reticolanti, plastificanti naturali come il glicerolo o cariche rinforzanti, che potrebbero contribuire a incrementare resistenza ed elasticità. Inoltre, tramite tecniche di miscelazione più avanzate, si potrebbe ottimizzare la dispersione proteica nella matrice di PVA, riducendo la formazione di aggregati. Infine, sarebbe fondamentale regolamentare queste bioplastiche, potendole classificare ad esempio come biodegradabili, pensando successivamente di testarle in contesti reali, come packaging biodegradabile, dispositivi biomedicali biocompatibili o film agricoli per pacciamatura che farebbero anche da fertilizzante rilasciando sostanze utili alle piante, come composti azotati. In conclusione, l'ottimizzazione di questi materiali e la loro introduzione nei processi produttivi su larga scala potrebbero rappresentare un'importante svolta per l'industria dei materiali sostenibili, contribuendo a ridurre l'impatto ambientale legato all'uso delle plastiche tradizionali.

## 6. Bibliografia

- [1] Caligiani, A., Marseglia, A., Leni, G., Baldassarre, S., Maistrello, L., Dossena, A., & Sforza, S. (2018). Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids, and chitin. *Food Research International*, *105*, 812–820.
- [2] Edea, C., Tesfaye, E., Yirgu, T., & Alewi, M. (2022). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae as a sustainable source of protein in poultry feeding: A review. *Ethiopian Journal of Agricultural Science*, *32*(1), 89–104.
- [3] Franco, A., Scieuzo, C., Salvia, R., Triunfo, M., Guarnieri, A., Catalano, M., & Falabella, P. (2021). Scarti agricoli: Da problema a risorsa grazie alla bioconversione. *Agrifoglio*, *105*(Settembre-Ottobre), 1–8.
- [4] Meneguz, M., Gasco, L., & Tomberlin, J. K. (2018). Impact of pH and feeding system on black soldier fly (*Hermetia illucens*, L.; Diptera: Stratiomyidae) larval development. *PLOS ONE*, *13*(8), e0202591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202591>
- [5] Odongo, E. E., Bbosa, W. K., & Kahunde, P. K. (2024). Black soldier fly (BSF): A sustainable solution for protein, waste management, and a circular bio-economy. *European Journal of Theoretical and Applied Sciences*, *822-834*. [https://doi.org/10.59324/ejtas.2024.2\(3\).64](https://doi.org/10.59324/ejtas.2024.2(3).64)
- [6] Bhavsar, P. S., Dalla Fontana, G., & Zoccola, M. (2021). Sustainable superheated water hydrolysis of black soldier fly exuviae for chitin extraction and use of the obtained chitosan in the textile field. *ACS Omega*, *6*(13), 8884–8893.
- [7] Barbi, S., Spinelli, R., Ferrari, A. M., & Montorsi, M. (2019). Design and environmental assessment of bioplastics from *Hermetia illucens* prepupae proteins. *Environmental Engineering and Management Journal*, *18*(10), 2123–2131.
- [8] Setti, L., Francia, E., Pulvirenti, A., De Leo, R., Martinelli, S., Maistrello, L., Macavei, L. I., Montorsi, M., Barbi, S., & Ronga, D. (2020). Bioplastic film from black soldier fly prepupae proteins used as mulch: Preliminary results. *Agronomy*, *10*(7), 933.
- [9] Gasco, L., & Zoccola, M. (2022). *Hermetia illucens* biofactory: from waste to high value technological products [Proposta di progetto di ricerca PRIN 2022, Prot. 20229T94FL]. Ministero dell'Università e della Ricerca (MUR).
- [10] Bhavsar, P., Dalla Fontana, G., Tonin, C., Patrucco, A., & Zoccola, M. (2020). Superheated water hydrolyses of waste silkworm pupae protein hydrolysate: A novel application for natural dyeing of silk fabric. *Dyes and Pigments*, *183*, 108678. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108678>
- [11] Zoccola, M. (2025, January 31). Green chemistry in the textile sector [Presentazione per conferenza]. 4th Conference of the Institute of Intelligent Industrial Technologies and Systems for Advanced Manufacturing (FUtURA), CNR STIIMA - Biella.
- [12] Wang, H., Rehman, K. U., Liu, X., Yang, Q., Zheng, L., Li, W., Cai, M., Li, Q., Zhang, J., & Yu, Z. (2017). Insect biorefinery: a green approach for conversion of crop residues into biodiesel and protein. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0986-7>
- [13] Karthikeyan Ravi, H., Degrou, A., Costil, J., Trespeuch, C., Chemat, F., & Abert Vian, M. (2020). Larvae mediated valorization of industrial, agriculture and food wastes: Biorefinery concept through bioconversion, processes, procedures, and products. *Processes*, *8*(7), 857. <https://doi.org/10.3390/pr8070857>

- [14] Asgher, M., Qamar, S. A., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2020). Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials. *Food Research International*, 137, 109625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109625>
- [15] Kuddus, M., & Roohi (Eds.). (2021). *Bioplastics for Sustainable Development*. Springer Nature Singapore. [#8203](https://doi.org/10.1007/978-981-16-1823-9)
- [16] Tian, L., Jinjin, C., Ji, R., Ma, Y., & Yu, X. (2022). *Microplastics in agricultural soils: Sources, effects, and their fate*. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 25, 100311. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100311>
- [17] Costa, A., Encarnação, T., Tavares, R., Todo Bom, T., & Mateus, A. (2023). Bioplastics: Innovation for Green Transition. *Polymers*, 15(517). <https://doi.org/10.3390/polym15030517>
- [18] Lu, S., Taethaisong, N., Meethip, W., Surakhunthod, J., Sinpru, B., Sroichak, T., Archa, P., Thongpea, S., Paengkoum, S., Purba, R. A. P., & Paengkoum, P. (2022). Nutritional composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) and its potential uses as alternative protein sources in animal diets: A review. *Insects*, 13(9), 831. <https://doi.org/10.3390/insects13090831>
- [19] Bhavsar, P. S. (2018). *Studies in Green Hydrolysis of Waste Wool* [Tesi di dottorato, Politecnico di Torino].
- [20] Amar Equipment. *Pressure Reactors & Auxiliaries* [Catalogo tecnico]. Amar Equipment Pvt. Ltd.
- [21] Barragan-Fonseca K.B. Dicke M., van Loon J.J.A. Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed - a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, Volume 3, Issue 2, Pages 105 – 120 (2017) DOI: 10.3920/jiff2016.0055
- [22] Shimao, M. (2001). *Biodegradation of plastics*. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 242-247. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00139-5)
- [23] Thermo Fisher Scientific. (2024). *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fourier-transform-infrared-ftir-spectroscopy.html> [Accessed 26 January 2025]
- [24] Kamneva, A. A., & Tugarova, A. V. (2023). Specificities of the Fourier Transform Infrared Spectroscopic Methodology and Interpretation of Spectroscopic Data in Microbiological Analyses. *Journal of Analytical Chemistry*, 78(10), 1320-1332. <https://doi.org/10.1134/S1061934823100106>
- [25] Kassem, A., Abbas, L., Coutinho, O., Opara, S., Najaf, H., Kasperek, D., Pokhrel, K., Li, X., & Tiquia-Arashiro, S. (2023). Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: Advances, challenges, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1304081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1304081>
- [26] PerkinElmer, Inc. (2005). FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR) [Nota tecnica]. PerkinElmer Life and Analytical Sciences.

- [27] PerkinElmer. (2010-2015). *A beginner's guide to thermogravimetric analysis (TGA): Frequently asked questions*. PerkinElmer, Inc. <https://www.perkinelmer.com/> [Accessed 03 February 2025]
- [28] Stagnaro, P., Luciano, G., & Utzeri, R. La calorimetria differenziale a scansione e l'analisi termogravimetrica nella caratterizzazione termica dei materiali polimerici [Dispesa accademica]. ISMAC-CNR.
- [29] Mettler-Toledo AG. (2007). *TGA/DSC 1 STARe System: Brochure*.
- [30] Klančnik, G., Medved, J., & Mrvar, P. (2010). Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation. *RMZ – Materials and Geoenvironment*, 57(1), 127–142.
- [31] Parker, M. J. *Differential scanning calorimetry*. In *Test Methods for Physical Properties*. Elsevier. PII: B0080429939000747
- [32] Ghanbari, E., Picken, S. J., & van Esch, J. H. (2023). Analysis of differential scanning calorimetry (DSC): Determining the transition temperatures, and enthalpy and heat capacity changes in multicomponent systems by analytical model fitting. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 148(5), 12393–12409. <https://doi.org/10.1007/s10973-023-12356-1>
- [33] Egerton, R. F. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer Science+Business Media.
- [34] Cheney, B. *Introduction to Scanning Electron Microscopy*. San Jose State University, Materials Engineering Department.
- [35] Voutou, B., & Stefanaki, E.-C. (2008). *Electron Microscopy: The Basics*. Physics of Advanced Materials Winter School. Aristotle University of Thessaloniki, Greece.
- [36] Leica Microsystems. *Leica DM LSP & DM LP: System Microscopes for Polarisation Techniques in Transmitted and Incident Light*. Leica Microsystems Wetzlar GmbH.
- [37] ZwickRoell GmbH & Co. KG. *ProLine Z005 to Z100 Materials Testing Machines: Product Information*.
- [38] Biolin Scientific. How to utilize contact angles in surface characterization: Static contact angles. Retrieved December 13, 2024, from <https://www.biolinscientific.com/blog/how-to-utilize-contact-angles-in-surface-characterization-static-contact-angles>
- [39] Biolin Scientific. *Wettability measurements to evaluate biocompatibility*. Retrieved December 13, 2024, from <https://www.biolinscientific.com/blog/wettability-measurements-to-evaluate-biocompatibility> [Accessed 29 January 2025]
- [40] Hyder, M. N., Huang, R. Y. M., & Chen, P. (2006). Correlation of physicochemical characteristics with pervaporation performance of poly (vinyl alcohol) membranes. *Journal of Membrane Science*, 283(1–2), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.06.045>



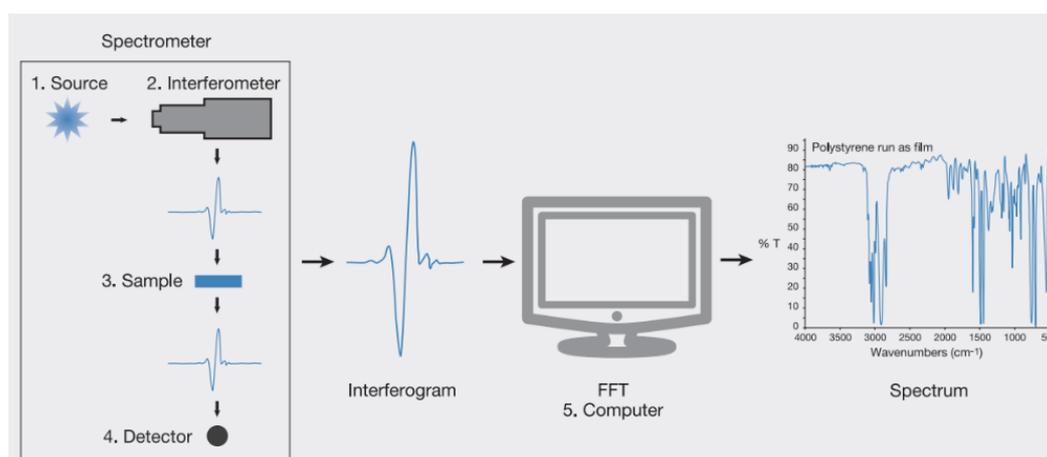
## A. Appendice - Cenni teorici sulle tecniche di analisi utilizzate

### A.1. Spettrometro a Infrarossi con Trasformata di Fourier (FT-IR)

#### A.1.1. Principio

La spettroscopia a infrarossi con trasformata di Fourier si basa sull'interazione della radiazione infrarossa con le molecole del campione. Quando un fascio di radiazione attraversa il materiale, le molecole al suo interno assorbono questa energia e i loro legami chimici vibrano a frequenze caratteristiche. Questo fenomeno genera uno spettro caratteristico, che fornisce informazioni sulla composizione chimica del campione. Questa tecnica consente di riconoscere i componenti chimici, e valutando l'intensità dei picchi di assorbimento, di determinare la concentrazione e confrontare il campione con standard di riferimento.

L'analisi FT-IR segue il processo mostrato in **Figura A.1**. Per prima cosa c'è l'**emissione della radiazione infrarossa** da una sorgente a corpo nero, come barre di silicio, ovvero un oggetto ideale che emette radiazioni elettromagnetiche in funzione della sua temperatura assorbendo completamente tutta la radiazione che lo colpisce, senza rifletterla né trasmetterla, e restituisce energia in modo uniforme su tutte le lunghezze d'onda. A seguire, avviene la **modulazione nell'interferometro**, dove il fascio viene diviso, modulato tramite interferenza e codificato in un unico segnale come interferogramma, ossia un diagramma che rappresenta l'intensità della radiazione infrarossa in funzione della posizione dello specchio mobile nell'interferometro. Successivamente c'è l'**interazione col campione**, dove la radiazione attraversa il materiale, con specifiche frequenze assorbite in base alla sua composizione. A questo punto c'è la **rilevazione del segnale**, in cui il rivelatore misura l'interferogramma, che viene **tradotto** in uno spettro. Infine, facendo un confronto con lo spettro di fondo si cerca di **diminuire il rumore**, garantendo un risultato il più possibile pulito [23].



**Figura A.1** Processo strumentale FT-IR

La spettroscopia FT-IR sfrutta quindi un interferometro per ottenere l'interferogramma di un segnale, ovvero lo spettro, tramite l'applicazione di una **trasformata di Fourier**, che rende possibile l'analisi simultanea di tutte le frequenze, eliminando la necessità di scansioni lente e

potendo ottenere l'intero spettro in pochi secondi, con una riduzione del rumore attraverso la somma di più scansioni [24].

La trasformata di Fourier è quindi un elemento matematico fondamentale che converte un segnale nel dominio temporale, in uno spettro di frequenza. In analisi matematica, la trasformata di Fourier di un segnale  $X(t)$  avviene mediante la formula (A. 1). Il modulo del segnale  $A(f)$  nel dominio delle frequenze, ossia lo spettrogramma, contiene informazioni su tutte le frequenze del segnale temporale in quanto rappresenta l'ampiezza delle sinusoidi.

$$A(f) = \int X(t) \exp(-i2\pi ft) dt \quad (\text{A. 1})$$

Nella realtà, l'interferogramma campiona  $N$  punti, che costituiscono il segnale discreto  $X(k)$ , ed effettua la trasformata di Fourier discreta (DFT) tramite la formula (A. 2). I coefficienti di  $A(r)$  prendono il nome di numero d'onda.

$$A(r) = \sum_{k=0}^{N-1} X(k) \exp\left(-i2\pi \frac{k}{N} r\right) \quad (\text{A. 2})$$

Inoltre, la trasformata è ottimizzata tramite algoritmi efficienti come la Fast Fourier Transform (FFT), che scompone iterativamente la DFT di un segnale in trasformate più piccole sfruttando la periodicità e la simmetria dei termini esponenziali. Questo approccio rende il processo rapido e preciso, permettendo di acquisire tutti i dati contemporaneamente.

Lo spettro FT-IR è rappresentato graficamente come mostrato in **Figura A.2**, con l'assorbimento sull'asse verticale e la frequenza espressa come numeri d'onda in  $\text{cm}^{-1}$  sull'asse orizzontale. I picchi corrispondono alle frequenze assorbite dai legami molecolari. Lo spettro copre una gamma di numeri d'onda tra  $14.300$  e  $20 \text{ cm}^{-1}$ , con la maggior parte delle vibrazioni molecolari concentrate nella regione del medio infrarosso ( $400 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$ ). Si possono distinguere diverse zone, tra cui la **regione dei legami singoli** ( $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ ), dove troviamo vibrazioni stretching, ovvero con variazione della lunghezza dei legami, di gruppi come O-H (alcoli e acidi carbossilici), N-H (ammine e ammidi) e C-H (idrocarburi). Successivamente, si presenta la **regione dei legami tripli** ( $2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ ), che comprende vibrazioni stretching come quelle dei legami  $\text{C}\equiv\text{C}$  (alchini) e  $\text{C}\equiv\text{N}$  (nitrili). Inoltre, si ha la **regione dei legami doppi** ( $2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ), in cui sono presenti le vibrazioni stretching di legami  $\text{C}=\text{C}$  (alcheni),  $\text{C}=\text{O}$  (aldeidi, chetoni, acidi carbossilici, ammidi ed esteri) e N-H bending, ovvero con cambiamenti negli angoli tra i legami. Infine, si può identificare una **regione fingerprint** ( $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), che rivela dettagli molecolari unici, in cui si trovano vibrazioni di bending di legami C-H (alcani) e O-H (alcoli e fenoli). Tutte queste vibrazioni avvengono a frequenze che dipendono dalla massa degli atomi e dalla rigidità dei legami.

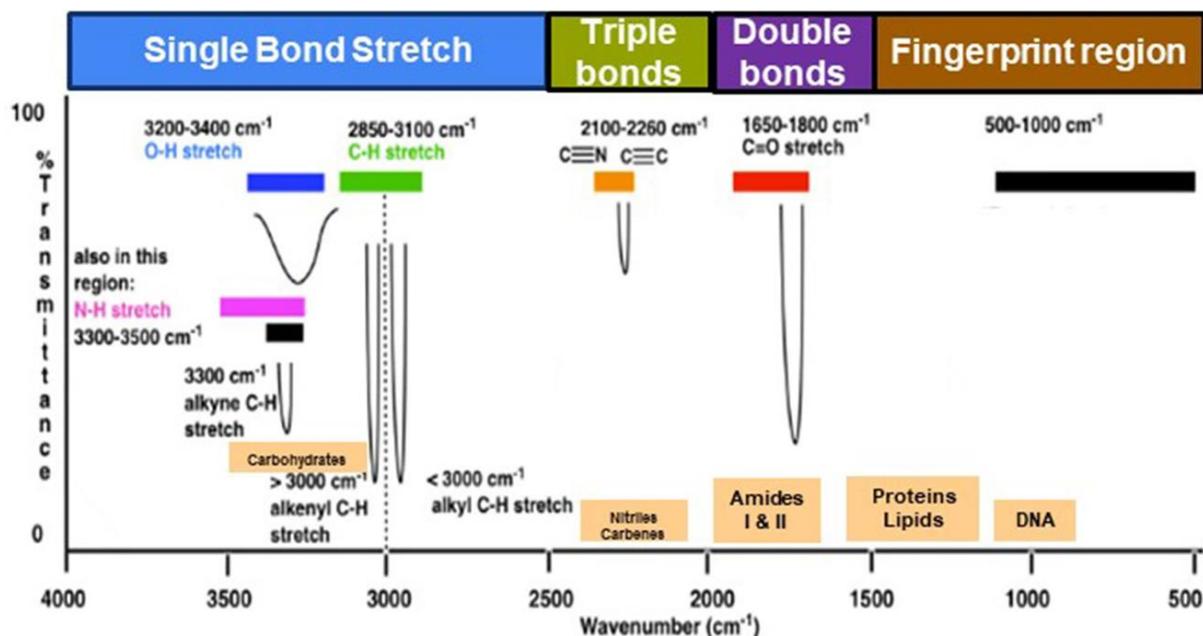


Figura A.2 Valori di assorbimento nell'infrarosso tipici per vari tipi di legami

L'interpretazione corretta dello spettro, oltre a basarsi sulla posizione dei picchi, si concentra sull'intensità dei picchi, per cui l'altezza riflette la quantità relativa del gruppo funzionale, e sulla forma dei picchi. Ad esempio, si possono osservare picchi larghi quando gruppi funzionali simili, come i carbonili, sono presenti nella stessa molecola ma legati a strutture chimiche diverse, come negli acidi, negli esteri o nelle aldeidi [25].

#### A.1.2. Riflessione totale attenuata (ATR)

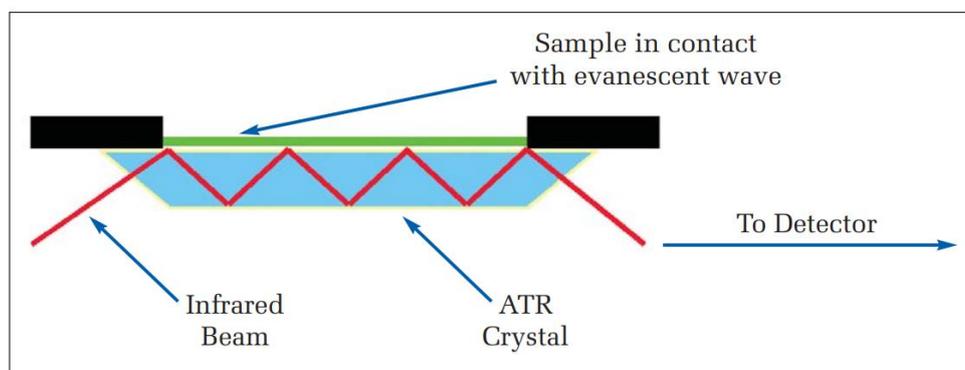
La tecnologia ATR (Attenuated Total Reflectance) è una tecnica utilizzata nella spettroscopia FT-IR che consente di analizzare con facilità materiali solidi, liquidi o viscosi.

Il sistema ATR ha diversi componenti, tra cui il **crystallo ATR**, realizzato con materiali ad alto indice di rifrazione, come il diamante, che è estremamente resistente, il germanio, che offre una penetrazione più superficiale adatta per campioni assorbenti e lo zinco seleniuro (ZnSe), il quale è più economico e utilizzabile per liquidi e paste, ma meno resistente. Prima e dopo ogni analisi è necessario eseguire la pulizia del crystallo, utilizzando solventi come metanolo per evitare contaminazioni. Inoltre, è necessaria una **fonte di pressione**, che garantisce un contatto uniforme tra campione e crystallo. Infine, è fondamentale lo **spettrometro FT-IR**, che raccoglie i dati e utilizza la trasformata di Fourier per elaborare lo spettro infrarosso. Per l'acquisizione dello spettro, si parte con uno spettro di background, registrato su crystallo pulito. Successivamente, il campione viene analizzato ottenendo lo spettro finale, che mostra le regioni di assorbimento IR caratteristiche.

In particolare, in un sistema ATR, un crystallo, trasparente agli infrarossi, viene posto a contatto diretto con il campione. La radiazione infrarossa colpisce la superficie interna del crystallo a un angolo maggiore di quello critico e rimbalza più volte sulla superficie a contatto, rimanendo confinato all'interno del crystallo, così da ottenere una riflessione interna totale. In questo modo, si genera un'onda evanescente che si propaga al di fuori del crystallo e penetra nel campione, assorbendo energia alle lunghezze d'onda che corrispondono alle vibrazioni molecolari. L'energia residua, che non viene assorbita dal campione, torna nel raggio riflesso e viene

rilevata per generare lo spettro infrarosso, che riflette le proprietà chimiche del materiale. Tutti questi passaggi sono rappresentati in **Figura A.3**.

Questa tecnologia presenta diversi vantaggi, tra cui una facile preparazione del campione, affidabilità e accuratezza, grazie al contatto diretto con il cristallo. In aggiunta, si ha un'ampia versatilità, potendo rilevare anche quantità minime di sostanza, oltre a un risultato ottenibile in soli pochi minuti. [26]



**Figura A.3** Riflessione multipla dell'ATR

## A.2. Analizzatore termogravimetrico (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica che consente di analizzare le variazioni di massa di un campione in funzione della temperatura e del tempo, inserendo il campione in una fornace sottoposta a un profilo termico controllato. Il risultato dell'analisi si presenta sotto forma di un termogramma, permettendo di osservare processi come l'evaporazione di solventi, la decomposizione termica o reazioni chimiche.

Un sistema TGA si compone di diversi elementi, tra cui una **ultramicrobilancia analitica** estremamente sensibile, capace di rilevare variazioni di massa con una precisione di pochi microgrammi e una **fornace**, che provvede al riscaldamento del campione, posizionato in un crogiolo, realizzato in materiale resistente come l'allumina in questa tesi, e sottoposto a un programma termico specifico. Infine, si ha un **gas di purga**, ovvero un flusso costante di gas, come azoto o aria, che crea l'ambiente necessario per l'analisi. Le termobalance possono essere progettate con una geometria verticale o orizzontale, come nel modello utilizzato in questa tesi, che è dotato di una bilancia a guida parallela, ovvero il campione è posizionato orizzontalmente. Inoltre, il design orizzontale del forno riduce al minimo le turbolenze convettive, per assicurare una distribuzione uniforme del calore e misurazioni accurate [27].

Il risultato è una curva termica che mostra come la massa del campione in % varia in funzione della temperatura e del tempo. Eventi come la perdita d'acqua, la decomposizione o l'ossidazione si manifestano attraverso cambiamenti di pendenza sulla curva.

Le curve generate dalla TGA consentono di determinare parametri caratteristici come la  $T_{onset}$ , ovvero la temperatura di inizio degradazione, calcolata dall'intersezione tra le tangenti al punto di scostamento dal peso iniziale e al punto di flesso della curva e la  $T_{10\%}$  e  $T_{50\%}$ , corrispondenti rispettivamente alla perdita del 10% e del 50% della massa iniziale del campione [28]. A queste si accompagna spesso una curva derivata (DTG), che consente un'analisi più dettagliata. In essa, si evidenziano punti critici come la **temperatura di inizio perdita di peso  $T_o$** , che indica il momento in cui il cambiamento di peso diventa significativo e la **temperatura di picco  $T_{peak}$** , temperatura alla quale si registra la massima velocità di degradazione, visibile come un minimo

nella curva, segnalando una trasformazione significativa nella composizione del campione. Questi parametri sono utili per confrontare materiali o identificare le temperature critiche di utilizzo sicuro.

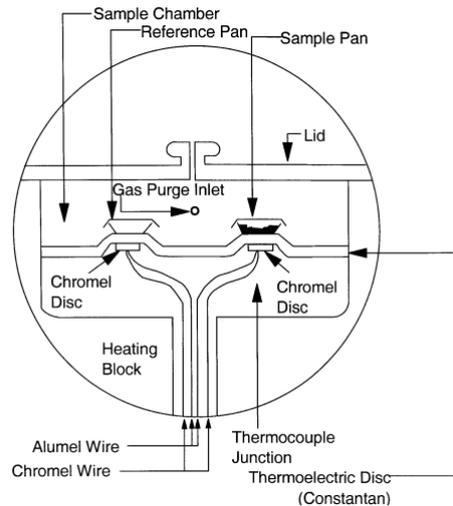
Per ottenere risultati affidabili, è necessario provvedere alla pulizia del forno e dei crogioli, riscaldandoli fino a temperature molto elevate, come 900°C, per eliminare ogni traccia organica. Inoltre, sarebbe necessaria una calibrazione regolare. In aggiunta, un'analisi TGA richiede una precisa preparazione del campione. Il **peso del campione** deve essere compreso tra 5 e 20 mg per garantire risultati omogenei, mentre in alcuni casi, come per campioni prettamente proteici, bisogna avere quantità prossime a 1 mg per avere risultati veritieri. Inoltre, il materiale deve essere posto uniformemente al fondo del crogiolo, massimizzando l'esposizione al gas, che nel caso di questa tesi è stato azoto, in quanto si è interessati alla degradazione dei materiali al variare della temperatura. Dopo aver posto il crogiolo con dentro il campione sulla bilancia della TGA, all'interno della fornace, si può aprire il gas impostandone il flusso volumetrico. Inoltre, tramite software, si può fissare il range di temperatura e la velocità di riscaldamento, per poi iniziare le prove. [29]

### *A.3. Calorimetro a scansione differenziale (DSC)*

La calorimetria a scansione differenziale è una tecnica analitica utilizzata nel campo dell'analisi termica. Consente di studiare le proprietà termiche dei materiali monitorando le variazioni di energia che avvengono durante processi di riscaldamento o raffreddamento.

La DSC si basa sul confronto del flusso di calore tra un campione e un materiale di riferimento inerte, che si trovano in crogioli all'interno dello strumento, entrambi sottoposti a un programma di temperatura programmato. Questi due elementi vengono riscaldati o raffreddati contemporaneamente, seguendo velocità predefinite. Lo strumento registra la differenza di temperatura tra campione e riferimento, che viene convertita in un segnale di flusso di calore. I dati vengono rappresentati come una curva, in cui il flusso di calore in W/g, ovvero la quantità di energia trasferita per grammo di campione, è riportato in funzione della temperatura e del tempo. Questa curva consente di identificare fenomeni termici come fusione, cristallizzazione, transizioni vetrose o altre variazioni termodinamiche [30].

Come detto in precedenza, la DSC registra la differenza di temperatura tra campione e riferimento e lo fa con una cella di misura a disco, che serve per trasferire calore ai campioni e ai riferimenti. Questi sono posizionati su zone rialzate del disco in costantana, mentre la parte inferiore è dotata di un wafer di chromel, il quale, insieme alla costantana, forma una termocoppia, che misura le temperature di campione e riferimento. Il sistema è inserito in un forno a temperatura controllata, che garantisce riscaldamenti e raffreddamenti uniformi, oltre a condizioni isoterme, grazie anche a un gas che viene utilizzato per distribuire uniformemente il calore nella camera del campione. Questo tipo di cella è rappresentato in **Figura A.4**.



**Figura A.4** Schema di una cella DSC a flusso di calore con un sistema di misura a disco

Il calore trasferito è misurato in base alla differenza di temperatura tra il campione e il riferimento e alla resistenza termica del disco  $R_D$ , come mostrato nella formula (A.3) [31].

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{\Delta T}{R_D} \quad (\text{A.3})$$

La curva DSC fornisce informazioni dettagliate sul comportamento termico dei materiali.

Si possono identificare delle transizioni termiche andando a vedere **picchi endotermici** ( $\Delta H > 0$ ), rappresentativi di un assorbimento di calore, che indicano processi come fusione alla temperatura di fusione ( $T_m$ ), legato alla rottura di strutture cristalline, oppure **picchi esotermici** ( $\Delta H < 0$ ), rappresentativi di un rilascio di calore, segnalano fenomeni come la cristallizzazione alla temperatura di cristallizzazione ( $T_c$ ).

Focalizzandosi su un picco, si può individuare l'**Onset**, ovvero il punto in cui la curva inizia a deviare dalla linea di base, segnalando l'inizio di una transizione. Questo è spesso preso come punto per visualizzare la temperatura di transizione. In seguito, si trova il **Peak**, ovvero il massimo del picco, che è il punto in cui il processo di transizione è alla massima velocità. Infine, si ha l'**Endset**, cioè il ritorno della curva alla linea di base, che indica la fine della transizione. [32]

L'area sotto il picco è proporzionale al cambiamento di entalpia del processo, ovvero la quantità di energia termica assorbita o rilasciata da un sistema durante una trasformazione a pressione costante.

Esistono altri parametri di un materiale che si possono calcolare con questa tecnica, tra cui il grado di cristallinità  $X_c$ , usando l'entalpia di fusione  $\Delta H_m$  rispetto al valore teorico di un cristallo perfetto  $\Delta H_m^0$ , usando la formula (A.4).

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \quad (\text{A.4})$$

Inoltre, si può calcolare la capacità termica specifica  $C_p$ , che indica la quantità di calore necessaria per aumentare di un grado Celsius la temperatura di un grammo di una sostanza a pressione costante, e si può misurare conoscendo la differenza tra il flusso di calore del campione e quello della linea di base  $\Delta Q$ , la velocità di riscaldamento  $R$  e la massa del campione  $m$ , usando la formula (A. 5).

$$C_p = \frac{\Delta Q}{R \cdot m} \quad (\text{A. 5})$$

L'assenza di transizioni termiche in un determinato intervallo di temperatura indica la stabilità del materiale.

La DSC può essere soggetta ad artefatti, che rendono difficile l'interpretazione dei dati e possono comprometterne l'accuratezza. Questi artefatti possono derivare sia dallo strumento, sia dalla preparazione del campione. Per esempio, dei movimenti del crogiolo possono generare segnali non reali nel grafico, oppure delle interferenze ad alta frequenza possono sovrapporsi al segnale utile. Un altro errore può essere l'asimmetria campione-riferimento. Infine, un trasferimento di calore non uniforme tra forno, crogiolo e campione può causare errori. Per correggere questi artefatti esistono strumenti che integrano sensori di riferimento per migliorare la precisione del segnale. Inoltre, una calibrazione regolare elimina errori sistematici. Infine, una scelta adeguata dei materiali, come l'uso di crogioli con alta conducibilità termica, riduce gli effetti di resistenza non uniforme [30].

#### *A.4. Microscopio elettronico a scansione (SEM)*

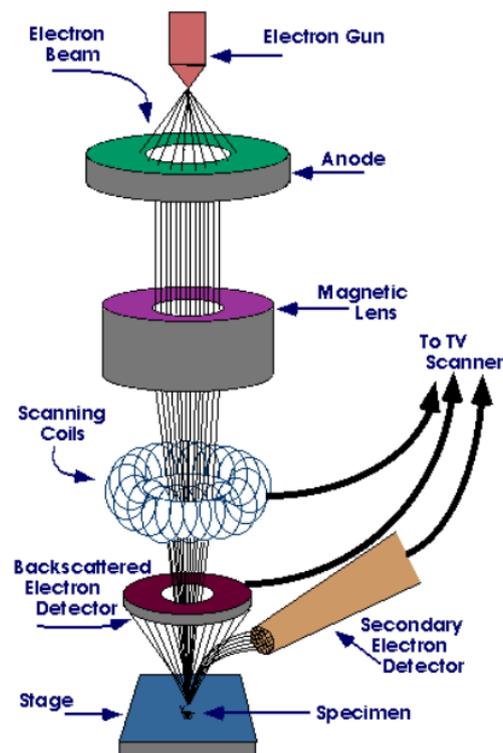
##### *A.4.1. Principio*

La microscopia elettronica a scansione è una tecnica di analisi che sfrutta un fascio di elettroni per esaminare la superficie di materiali solidi con una risoluzione molto elevata. In questo modo, è possibile analizzare le proprietà morfologiche di un campione.

Il microscopio elettronico a scansione usa un fascio di elettroni primari per esaminare la superficie di un campione. Gli elettroni, generati da una sorgente, vengono accelerati attraverso un campo elettrico e concentrati in un punto estremamente piccolo, noto come "probe". Questo fascio viene poi spostato sul campione mediante bobine di scansione che ne controllano il movimento. L'interazione tra il fascio di elettroni e il campione genera **elettroni retro-diffusi (BSE)** da collisioni elastiche, ovvero senza perdere energia, tra il fascio e i nuclei degli atomi, **elettroni secondari (SE)**, generati tramite interazioni anelastiche e provenienti dagli strati superficiali del campione, e **raggi X caratteristici**, cioè emissioni elettromagnetiche prodotte da transizioni energetiche negli atomi del campione, utili per analisi chimiche. Questi segnali vengono catturati da specifici rivelatori e vengono elaborati per produrre immagini bidimensionali ad alta risoluzione, con una qualità che dipende dalla densità di scansione e dalla capacità del sistema di mantenere una focalizzazione precisa. Questa tecnica presenta alcuni vantaggi come l'essere un'analisi molto versatile, oltre ad avere una risoluzione estremamente elevata, fino alla scala nanometrica. Si presentano però anche degli svantaggi, come i costi elevati per la necessità di alto vuoto o per una preparazione laboriosa per campioni non conduttivi. Su quest'ultimo aspetto, un campione può essere conduttivo, ovvero analizzabile direttamente, non conduttivo, rendendo necessario applicare un rivestimento di metallo per evitare accumuli di carica, e biologico, che richiede disidratazione, poiché l'acqua evaporerebbe nel vuoto, compromettendo il campione [33].

#### A.4.2. Componenti

Il SEM è composto da diversi elementi interconnessi mostrati in **Figura A.5**, tra cui la **sorgente di elettroni**, che genera il fascio elettronico per emissione termoionica riscaldando un filamento di tungsteno a circa 2700 K. A questa temperatura, gli elettroni vengono emessi e accelerati verso il campione grazie a una differenza di potenziale. Inoltre, si ha una **colonna ottica**, che contiene lenti elettromagnetiche e bobine di scansione che focalizzano e spostano il fascio sulla superficie del campione. In aggiunta si ha una **camera del campione**, che mantiene il campione in alto vuoto, essenziale per impedire che le molecole gassose interferiscano con il fascio e che avvenga l'ossidazione del filamento di tungsteno ad alte temperature. Per raggiungere queste pressioni, si utilizzano una pompa meccanica per il pre-vuoto e una pompa turbomolecolare per il vuoto finale. Il campione è posizionato su uno stadio mobile, controllabile lungo gli assi x, y e z e regolabile in rotazione e inclinazione attraverso un Dual Joystick. In aggiunta si ha un **sistema di rivelazione**, che include rivelatori di SE, rilevati tramite un sistema con carica positiva per evidenziare la topografia superficiale e di BSE, per analisi compositive basate sul numero atomico, ovvero gli elementi più pesanti appaiono più luminosi. Infine, si ha un **sistema di controllo e visualizzazione**, che consiste in strumenti digitali, che sincronizzano il movimento del fascio con la formazione dell'immagine come risultato delle interazioni tra il fascio elettronico e il campione [34].



**Figura A.5** Colonna SEM [35]

## A.5. Microscopio ottico

Il microscopio ottico è un dispositivo che ingrandisce le immagini dei campioni con diverse risoluzioni, grazie a un sistema di lenti che rifrangono la luce visibile.

Alla base del funzionamento di un microscopio ottico c'è la rifrazione della luce. Una sorgente luminosa invia luce al campione attraverso un condensatore, che distribuisce la luce uniformemente sul campione. Dopo aver attraversato il campione, la luce passa attraverso una serie di lenti che amplificano l'immagine, rendendola visibile tramite gli oculari.

L'illuminazione include una lampada alogena per un'illuminazione uniforme e un contrasto ottimale. Inoltre, si trova un piatto rotante a 360°, essenziale per orientare i campioni, dotato di marcatori e clip di fissaggio che riducono le vibrazioni per avere immagini stabili. Infine, è presente un sistema di messa a fuoco che permette di regolare la posizione delle lenti rispetto al campione per ottenere un'immagine nitida, rendendo visibili i dettagli altrimenti sfocati [36].

## A.6. Dinamometro

La dinamometria è una tecnica di misurazione meccanica che analizza il comportamento meccanico dei materiali, permettendo di valutarne la resistenza in diverse condizioni di carico, come trazione, compressione e flessione, attraverso la misura di forza, deformazione e altre grandezze correlate.

Il dinamometro è composto da diversi componenti, tra cui un **telaio rigido a due colonne**, che garantisce stabilità durante le prove e un controllo preciso del movimento della traversa, che è possibile regolare. Inoltre, è dotato di un **motore asincrono** con freno di mantenimento, che consente di avere vibrazione e rumore minimo, essenziali per questa tipologia di prove.

È presente un **controllo elettronico** che provvede all'acquisizione rapida dei dati, per catturare eventi critici come le rotture, oltre a provvedere alla correzione dei parametri in tempo reale per garantire movimenti precisi della traversa. In aggiunta, c'è un **sistema di misurazione**, dato dalle celle di carico per la determinazione delle forze. Queste rientrano nella categoria dei trasduttori, poiché convertono una grandezza fisica, in questo caso la forza, in un segnale elettrico misurabile. Inoltre, all'interno di queste celle, sono presenti degli estensimetri, ovvero strumenti in grado di rilevare le deformazioni indotte dalla forza applicata. Il segnale analogico prodotto viene amplificato per migliorarne l'intensità e successivamente convertito in formato digitale, rendendolo adatto all'elaborazione da parte del software. Infine, è presente anche un **sistema di sicurezza**, che consente di prevenire movimenti fuori dai limiti prestabiliti, oltre a un pulsante di emergenza, per arrestare rapidamente il sistema.

Questa apparecchiatura può essere utile per il calcolo di parametri come modulo elastico, resistenza e deformazione a rottura ed è adatta a una vasta gamma di materiali, garantendo robustezza e conformità agli standard [37].

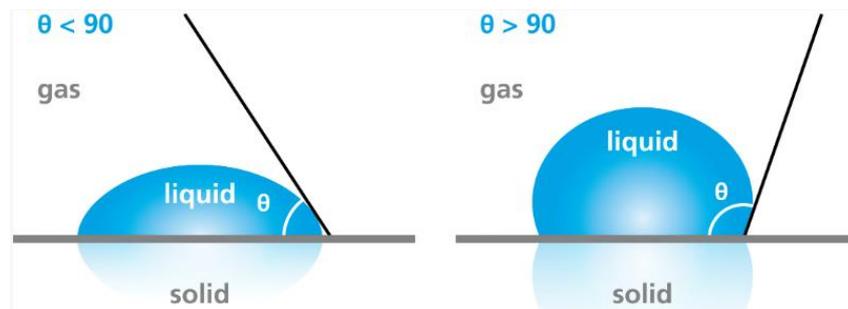
## A.7. Goniometro ottico

### A.7.1. Principio

L'angolo di contatto è un parametro che serve per comprendere come una superficie solida interagisca con un liquido. Per calcolare l'angolo di contatto si può utilizzare un goniometro ottico, che utilizza una telecamera per catturare l'immagine di una goccia posta sulla superficie e, con l'aiuto di un software, analizza il profilo della goccia per calcolare l'angolo. L'angolo di contatto offre una misura diretta della bagnabilità, ovvero la capacità di un liquido di aderire e

diffondersi su una superficie solida, determinata dall'equilibrio delle tensioni superficiali tra solido, liquido e gas. Tale angolo riflette l'equilibrio delle forze che agiscono sul bordo della goccia, ovvero le forze di coesione del liquido e le forze di adesione tra il liquido e il solido.

Si identificano **superfici idrofile** se si misurano angoli inferiori a  $90^\circ$ , indicando che il liquido tende a diffondersi facilmente e che c'è una buona interazione tra il liquido e il solido e quindi segnalando un'alta bagnabilità. Si identificano invece **superfici idrofobiche**, se si misurano angoli superiori a  $90^\circ$ , indicando che il liquido si raccoglie in gocce compatte, mostrando una scarsa bagnabilità [38]. Graficamente si può rappresentare questa differenza come mostrato in **Figura A.6**.



**Figura A.6** Angolo di contatto per un materiale idrofilo (a sinistra) e idrofobico (a destra)

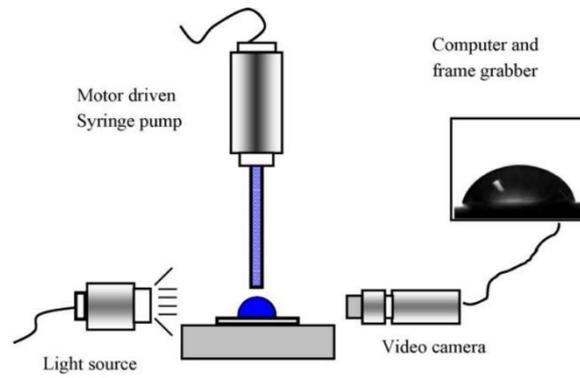
La misurazione dell'angolo di contatto fornisce quindi informazioni che possono servire per valutare biocompatibilità, uso di rivestimenti o struttura dei materiali. Difatti un angolo di contatto stabile segnala una superficie omogenea, mentre variazioni di esso possono indicare impurità o difetti [39].

#### A.7.2. Misurazione e valutazione

L'angolo di contatto è l'angolo formato dalla tangente al profilo di una goccia di liquido nel punto in cui tocca la superficie solida, e riflette un equilibrio tra le tensioni superficiali delle tre fasi coinvolte, ovvero solido, liquido e gas.

Questo può essere statico, se si misura quando la goccia è in stato di equilibrio e il punto di contatto tra le tre fasi resta stabile. Questo è il parametro più comunemente utilizzato per analizzare la bagnabilità e viene misurato con il metodo della goccia sessile analizzando il profilo tramite un sistema ottico, osservando il bordo della goccia e la superficie solida e fornendo una valutazione rapida e non distruttiva [39].

Inoltre, si possono misurare anche angoli di contatto dinamici, ovvero di avanzamento, rilevato quando il liquido si espande sulla superficie, o di recessione, misurato quando il liquido si ritira. La differenza tra questi angoli, nota come isteresi dell'angolo di contatto, fornisce indicazioni sulla rugosità e sull'uniformità chimica del materiale. Un'isteresi marcata può indicare superfici irregolari o contaminate [38].



**Figura A.7** Schema della misurazione dell'angolo di contatto con goccia sessile

Per il deposito controllato della goccia di liquido sulla superficie del solido si usa una siringa in acciaio, collegata a un sistema motorizzato e programmabile, con il quale è possibile regolare con estrema precisione il volume della goccia. I dati vengono elaborati con un software di analisi delle immagini, e le misurazioni vengono ripetute per garantire l'affidabilità dei risultati [40].



## **Ringraziamenti**

Desidero esprimere la mia gratitudine alla Prof.ssa Sara Dalle Vacche e alla Dott.ssa Marina Zoccola per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto. Un ringraziamento va anche ai colleghi del CNR di Biella, e in particolare ad Ashish, Anastasia e Giulia che con pazienza e disponibilità mi hanno insegnato e aiutato nel lavoro. Grazie ai miei amici, sia a chi mi è accanto da anni sia a coloro che ho avuto la fortuna di conoscere più di recente. Il loro affetto e la loro presenza hanno reso questa esperienza universitaria più leggera e piacevole. Un ringraziamento va a tutti i miei parenti, e in particolare a mia cugina Gege, che in diversi modi mi hanno fatto sentire la loro vicinanza e il loro affetto. Un grazie profondo va ai miei genitori, che mi hanno sempre sostenuto in ogni scelta e incoraggiato a dare il meglio di me stessa. E un pensiero speciale alla mia cagnolina Betty, che con la sua semplice presenza ha saputo regalarmi serenità anche nelle giornate più impegnative. Infine, un ringraziamento particolare a Dario, forse la persona che più di tutte mi ha supportato e, soprattutto, sopportato durante questo percorso. La sua vicinanza è stata fondamentale nei momenti di difficoltà e crescita. Concludo questi ringraziamenti con la consapevolezza che il traguardo raggiunto non è solo il frutto del mio impegno, ma anche del sostegno delle persone che mi hanno accompagnato lungo il cammino. A tutti loro va il mio più sincero grazie.