

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali per l'Industria 4.0

Tesi di Laurea Magistrale

**Riduzione in situ di particelle antimicrobiche su
zeoliti naturali attraverso processi ecocompatibili**



**Politecnico
di Torino**

Relatore

Miola Marta

Piumetti Marco

Candidato

Fabio Bellotti

Anno accademico 2025/2026

ARGOMENTO DELLA TESI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è di funzionalizzare un materiale con un'elevata area superficiale specifica, con un metallo di transizione, con proprietà antibatteriche, da utilizzare come filtro per l'aria e rimuovere i batteri patogeni da essa

L'intero processo è ecocompatibile, per questo motivo si utilizzano reagenti di origine naturale e le temperature di reazione coinvolte risultano al di sotto dei 70°C.

Le particelle antimicrobiche utilizzate sono a base di rame, un metallo con buone proprietà battericide e batteriostatiche, ma con un impatto economico minore rispetto ad altri materiali, come argento e oro.

La matrice scelta è la Clinoptilolite, una zeolite, che oltre ad essere un materiale di origine naturale, presenta una buona area superficiale specifica e facilmente funzionalizzabili dai polifenoli

Gli agenti riducenti sono l'acido tannico, e l'acido gallico, due polifenoli di origine naturale, presenti in numerose qualità di piante, da secoli utilizzate per le loro proprietà antiossidanti.

Le reazioni di riduzione saranno condotte variando la concentrazione molare dell'acido tannico e variando altri parametri come il pH della soluzione, la temperatura ed il tempo di reazione, nella seconda parte si ripeteranno le reazioni utilizzando l'acido gallico come agente riducente

In questa tesi inizialmente si introducono i materiali come la famiglia delle zeoliti e i vari tipi di nano particelle, successivamente si descrive la parte riguardante la sperimentazione.

La parte sperimentale prevede la funzionalizzazione della clinoptilolite con l'acido tannico, in seguito, utilizzando diversi sali di rame, si proverà ad ottenere sulla superficie della matrice un'uniforme quantità di nano particelle a base di rame.

I campioni ottenuti sono analizzati con tecniche qualitative e quantitative, per riscontrare l'efficacia del risultato ottenuto

INDICE

1. INTRODUZIONE -----	8
1.1 MALATTIE A TRASMISSIONE AEREA -----	8
1.2 PROPRIETA' ANTIMICROMICHE DELLE NP -----	12
2 ZEOLITI-----	14
2.1 INTRODUZIONE-----	14
2.2 CLASSIFICAZIONE -----	15
2.3 PROPRIETA' E METODI DI PRODUZIONE-----	20
2.4 PROPRIETA' ANTIMICROBICHE-----	23
2.5 METODI PER LA SINTESI DELLE ZEOLITI ANTIBATTERICHE -----	24
2.6 MORFOLOGIA ,STRUTTURA E PROPRIETA' DELLA CLINOPTILOLITE -----	26
3 NANOPARTICELLE -----	28
3.1 INTRODUZIONE-----	28
3.2 CLASSIFICAZIONE NANOPARTICELLE -----	29
3.2.1 NANO PARTICELLE ORGANICHE-----	29
3.2.2 NANO PARTICELLE CERAMICHE-----	30
3.2.3 NANO PARTICELLE METALLICHE -----	32
3.3 METODI DI SINTESI-----	33
3.4 METODI FISICI -----	35
3.4.1 METODI MECCANICI -----	35
3.4.2 LASER ABLATION-----	35
3.4.3 PHYSICAL VAPOUR DEPOSITION (PVD) -----	36
3.5 METODI CHIMICI -----	36
3.5.1 CHEMICAL REDUCTION-----	36
3.5.2 NANOPARTICELLE DI RAME -----	40
4 AZIONE CATALITICA E FOTOCATALITICA DELLE NANOPARTICELLE DI RAME E DEI SUOI OSSIDI-----	43
4.1 INTRODUZIONE-----	43
4.2 NANOPARTICELLE DI RAME-----	43
4.3 REAZIONE DI FOTOCATALISI DI OSSIDI DI RAME (CuO e CuO ₂) -----	44
5 MATERIALE E METODI -----	45
5.1 MATERIALI-----	46
5.2 PREPARAZIONE DELLA CLINOPTILOLITE -----	46
5.3 RIDUZIONE NANOPARTICELLE DI RAME CON ACIDO TANNICO -----	46
5.3.1 RIDUZIONE CON DIVERSE CONCENTRAZIONI DI ACIDO TANNICO E DIVERSI PH -----	46

5.3.2 REAZIONE VARIANDO I TEMPI DI REAZIONE E LA TEMPERATURA ---	48
5.4 FUNZIONALIZZAZIONE CLINOPTILOLITE CON ACIDO TANNICO -----	48
5.5 SINTESI DI NANOSTRUTTURE DI RAME LEGATE ALLA CLINOPTILOLITE- ACIDO TANNICO -----	49
5.6 FUNZIONALIZZAZIONE CON ACIDO GALLICO -----	49
5.7 SINTESI DI NANOSTRUTTURE DI RAME LEGATE ALLA CLINOPTILOLITE- ACIDO GALLICO -----	50
5.8 METODI DI CARATTERIZZAZIONE -----	50
5.9 TEORIA DEI PROCESSI CARATTERIZZANTI -----	51
5.9.1 SEM (MICROSCOPIO A SCANSIONE ELETTRONICO) -----	51
5.9.2 SPETTROFOTOMETRO A TRASFORMATTA DI FOURIER (FTIR) -----	52
5.9.3 MICROANALISI EDS (Energy Dispersive X-raySpectroscopy)-----	54
5.9.4 TECNICA XRD -----	55
5.9.5 UV-VIS-----	55
5.9.6 PROVE ANTIBATTERICHE -----	56
SPERIMENTAZIONE -----	57
ANALISI DELLA RIDUZIONE IN SITU DEL RAME SULLA SUPERFICIE DELLA CLINOPTILOLITE FUNZIONALIZZATA -----	58
ANALISI MORFOLOGICA -----	59
ANALISI XRD-----	61
ANALISI ANTIBATTERICA -----	63
VARIAZIONE DEL PH -----	64
ANALISI MORFOLOGICA -----	65
ANALISI XRD-----	66
ANALISI UV-VIS-----	69
VALUTAZIONE DELL'USO DELL'ACIDO TANNICO COME AGENTE RIDUCENTE DEL RAME IN SOLUZIONE -----	69
ANALISI UV-VIS-----	72
ANALISI MORFOLOGICA -----	75
VALUTAZIONE DEL TEMPO E DELLA TEMPERATURA -----	76
ANALISI MORFOLOGICA -----	76
ANALISI UV-VIS-----	79
ANALISI XRD-----	79
ANALISI MORFOLOGICA TEM -----	84
ANALISI DEL CAMPIONE CLINOPTILOLITE/TA/CuSO ₄ -----	87
FUNZIONALIZZAZIONE CON ACIDO GALLICO -----	91
ANALISI MORFOLOGICA -----	96
ANALISI UV-VIS-----	97

CAMPIONE CLINO/GA/CuSO ₄ -----	98
6.7.2 EDS -----	99
ANALISI XRD-----	100
6.7.4 ALONE DI INIBIZIONE DI INIBIZIONE BATTERICA-----	101
CONCLUSIONI -----	102

1. INTRODUZIONE

L'obiettivo di questa tesi è di impartire proprietà antibatteriche a una zeolite naturale, utilizzata come materiale per la purificazione dell'aria, riducendo in situ delle nano particelle di rame, utilizzando un agente riducente di origine naturale.

Il supporto filtrante è costituito da una zeolite, precisamente dalla clinoptilolite, questo perché oltre ad avere un'elevata superficie specifica, ha la capacità di sostituire i propri cationi del reticolo cristallino, con altri cationi, questo fenomeno è detto scambio ionico.

Cationi come Ag^+ , Zn^{2+} e Cu^{2+} presentano caratteristiche antimicrobiche [1], rendendo la zeolite un supporto filtrante antibatterico.

In questo lavoro, è stata sfruttata la capacità dell'acido tannico, un riducente di origine naturale (green), una molecola che presenta diversi siti attivi riducenti, per ridurre sulla superficie della Clinoptilolite particelle di rame.

Diverse ricerche hanno utilizzato come agente antibatterico l'argento, questo elemento presenta significative proprietà antibatteriche e inoltre si riduce facilmente allo stato metallico, sotto forma di nano particelle. Tuttavia alcuni studi evidenziano una iniziale resistenza antimicrobica

Anche il rame possiede proprietà antibatteriche, sia come metallo sia come ossido, e risulta meno costoso dell'argento.

La tesi si sviluppa descrivendo brevemente i principali patogeni a diffusione aerea, la descrizione del materiale zeolitico, le caratteristiche delle nano particelle antibatteriche e infine i risultati ottenuti.

Le dimensioni delle nano particelle ottenute e la loro morfologia sono state analizzate tramite un microscopio elettronico ad emissione di campo (FESEM), che fornisce inoltre la composizione elementare del campione tramite uno spettroscopio a dispersione energetica (EDS) associato al microscopio, un diffrattometro a raggi X fornisce un'identificazione della struttura e della fase cristallina dei campioni. Uno spettrofotometro UV-VIS infine indaga sull'assorbimento delle radiazioni elettromagnetiche (nel campo del visibile ed ultravioletto) delle particelle ottenute e un test di inibizione batterica su piastra, dimostra l'effetto delle particelle su una coltura batterica. Una descrizione più dettagliata è presente nel capitolo Materiale e metodi.

1.1 MALATTIE A TRASMISSIONE AEREA

Le malattie a trasmissione aerea, da secoli causano problemi di sanità pubblica in tutto il mondo.

La prima malattia a trasmissione aerea documentata fu il morbillo, nel 9° secolo D.C. , nel corso dei secoli sono state scoperte numerosi altri patogeni , che portarono devastanti conseguenze; l'influenza “spagnola” del 1918, durante la prima guerra mondiale” causò 50 milioni di vittime.

Il virus COVID-19 colpì 700 milioni di individui e causò 7 milioni di decessi.

Nome malattia	Patogeno	Anno di scoperta
Morbillo	<i>Paramyxovirus</i> (virus)	9° secolo DC
Vaiolo	<i>Variola</i> (virus)	1796
Aspergillosi	<i>Aspergillus</i> (fungo)	1842
Tubercolosi	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (batterio)	1882
Difterite	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (batterio)	1883
Meningite meningococcica	<i>Neisseria meningitis</i> (batterio)	1887
Coccidiomicosi	<i>Coccidioides</i> (fungo)	1892
Raffreddore comune	<i>Rhinovirus</i> (virus)	1900
Pertosse	<i>Bordetella pertossi</i> (batterio)	1906
Histoplasmosi	<i>Histoplasma capsulatum</i> fungus (fungo)	1906
Influenza	Influenza virus (virus)	1918
Adenovirus	Adenovirus (virus)	1953
Varicella	Herpes (virus)	1953
Parotite	Virus della parotite	1967
COVID-19	SARS-CoV-2 (virus)	2019

Tabella 1.1 patologie a trasmissione aerea e loro agenti patogeni in ordine di scoperta [2]

Il mezzo della trasmissione degli agenti patogeni, sono le goccioline di saliva prodotte sia durante gli atti respiratori violenti come i colpi di tosse e gli starnuti sia mentre si parla.

Il comitato per il controllo delle malattie sanitarie (HICPAC) classifica le malattie a trasmissione aerea in airborne, dove le goccioline hanno dimensioni inferiori ai 5 μm , droplet, quando le goccioline hanno dimensioni uguali o superiori ai 5 μm , da contatto, quando il patogeno entra a contatto con le mucose, esempio tipico è toccarsi occhi o naso con le mani venute a contatto con superfici infette.

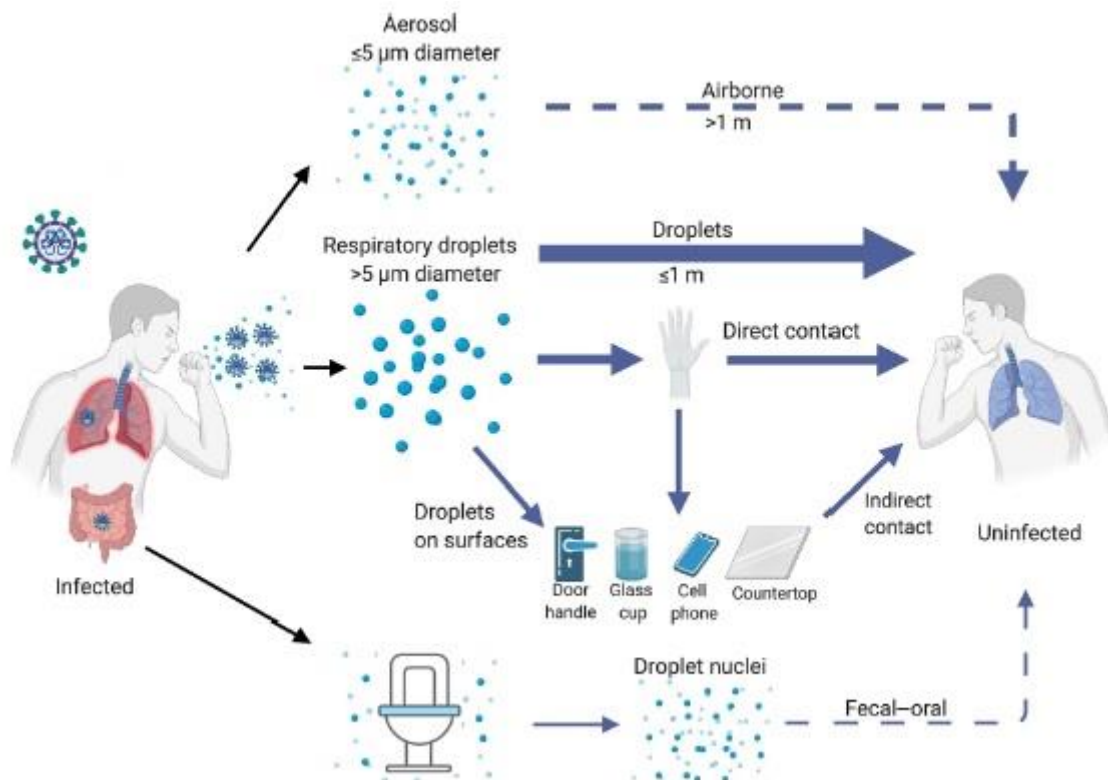


Fig1.1 Meccanismi di trasmissione di un agente patogeno [2]

Un singolo starnuto può generare più di 10^{+4} goccioline che raggiungono velocità di circa 20 m/s ,tossire produce goccioline 10-100 volte inferiore ad uno starnuto con velocità di 10 m/s ; mentre parlare produce 50 particelle al secondo con dimensioni da 0,1 a 1000 μm (Mittal et al., 2020)

La distanza raggiuntadale goccioline , tramite uno starnuto, va da 1,22 m [2] a 7-8 m [3] e l'aerosol prodotto può rimanere in sospensione anche per ore.

Un metodo per abbattere questi patogeni è l'utilizzo di filtri specifici .

In base agli standard EN1822 i filtri si dividono in HEPA (High Efficiency Particulate Air) capace di rimuovere il 99,97% di particelle di dimensione fino a 0,3 μm e in ULPA (Ultra Low Particulate Air) che rimuove il 99,999% di particelle di 0,1 μm di diametro.

Batteri , virus, funghi , si diffondono nell'aria attraverso un aerosol detto appunto bioaerosol, questo, anche se intrappolato nei filtri rimane attivo e può essere immesso nuovamente nell'ambiente.

Diverse tecniche antimicrobiche come: raggi UV , emettitori di ioni e ozono , sono utilizzati per abbattere il bioaerosol; a tale scopo la ricerca cerca di produrre sempre nuovi e più efficienti dispositivi filtranti con proprietà antimicrobiche .

Filter type	Filter material	Antimicrobial agent	Preparation method	Remarks
High efficiency air filter media (HEPA)	Fiberglass	ϵ -Polylysine and Natamycin	Dip-coating	filtration efficiency 99.998%; antibacterial efficiency 99.996%;
Fiber filter	Polyurethane	Ag/CNTs	Nebulization / aerosol process	<i>E. Coli</i> filtration efficiency ~95%; relative microbial viability < 0.2%;
Fiber filter	Polyurethane	<i>Euscaphis japonica</i> methanolic extract powder	Nebulization / aerosol process	<i>M. luteus</i> : antimicrobial efficiency ~82%; filtration efficiency ~95%;
Fiber filter	Polyethyleneterephthalate (fiber diameter = 1.5 μ m)	Propolis	Nebulization / aerosol process	bioaerosols 1.4–2.0%; Inactivation rates 54.4–75.5%;
Fiber filter	Polyurethane	Nanoparticles of <i>Sophora flavescens</i> ethanolic extract	Electro-spraying	<i>S. epidermidis</i> : Relative microbial viability = ~0%;
Polyester air filter	Polyester	PMA-capped silver nanoparticles	Layer-by-layer coating technique	<i>S. aureus</i> : reduction rate = 92.2%
Nanofiber filter (Fiber diameter = from 300-400 nm)	Sericin/PolyVinyl Alcohol (PVA)/Clay	<i>Sericin</i>	Electro-spinning	<i>E. Coli</i> : Antibacterial activity = 98.3%;

Tabella 1.2 Materiale, metodi di preparazione e rendimento dei filtri antimicrobici [4]

Ultimamente gli studi sono rivolti verso mezzi di sintesi di origine naturale per produrre nano particelle antimicrobiche, sia nano particelle metalliche sia ossidi di queste [5]

Una di queste sono le nano particelle (NP), che grazie alle loro proprietà, sostituiscono l'uso, in molti dispositivi antimicrobici, degli antibiotici che provocano effetti collaterali alla salute umana e devono essere sempre rinnovati a causa dello sviluppo dell'antibiotico resistenza batterica.

1.2 PROPRIETÀ ANTIMICROMICHE DELLE NP

Le proprietà battericide delle NP sono molteplici, grazie alle loro caratteristiche, possono modificare diverse funzionalità cellulari

STRESS OSSIDATIVO: è provocato da diverse molecole o intermedi di reazione che presentano un forte potenziale redox positivo dette ROS (Reactive Oxygen Species) i principali ROS sono: ioni superossidi $O_2^{\bullet-}$, radicali di idrossidi $OH^{\bullet}$, perossido di idrogeno H_2O_2 e molecole di ossigeno O_2 ; questi possiedono differenti livelli di attività. Ad esempio NP di CaO e MgO possono generare $O_2^{\bullet-}$, mentre NP di ZnO possono generare H_2O e radicali $OH^{\bullet}$, ma non $O_2^{\bullet-}$. [6]

Lo stress ossidativo danneggia la parete cellulare batterica, alterandone la permeabilità; le ROS possono entrare all'interno del batterio, denaturando proteine, bloccare le funzionalità degli enzimi e danneggiare il DNA.

Le NP possono produrre ROS per via foto catalitica, come il TiO_2 e lo Zn o agendo come catalizzatore e favorendo la produzione di ROS. (Barras et al., 2018)

IONI METALLICI: Le NP rilasciano ioni, questi vengono assorbiti dalla membrana cellulare, interagendo con i gruppi mercapto $-SH$, ammino $-NH$ e carbossilici $-COOH$, inattivando l'attività enzimatica.

INTERAZIONE NP E PARETE CELLULARE: La parete cellulare rappresenta un'importante barriera difensiva contro l'ambiente esterno. I batteri Gram + hanno una spessa parete cellulare composta da peptidoglicano, mentre i Gram - presentano una parete aggiuntiva esterna formata da lipopolisaccaridi e fosfolipidi. Le NP, grazie alle loro dimensioni e carica, riescono ad aderire sulla superficie della parete cellulare batterica, provocandone la lisi.

DIMENSIONE NP: Le dimensioni ridotte delle NP hanno una superficie specifica elevata, che permette di aumentare la probabilità di venire a contatto con i batteri e penetrarci all'interno.

Inoltre è stato dimostrato che alcune NP evitano la formazione del biofilm batterico e alla sua matrice di sostanze polimeriche extracellulari (EPS), sostanza autoprodotta dalle colonie batteriche, ricoprendole, come protezione da un ambiente esterno ostile, come la presenza di antibiotici.

Una ricerca [7] dimostra come le nano particelle d'argento sferiche con dimensioni di 50-65 nm, inibiscono la formazione di biofilm dell'86% della *Klebsiella Pneumonia*, dell'89% dello *S. aureus* e del 75% dell' *E. coli*.

INTERRUZIONE DELLA CATENA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI MITOCONDRIALE

Un altro meccanismo antimicrobico delle NP è l'interruzione della catena di trasporto degli elettroni all'interno del mitocondrio (ETC electron transport chain), l'elevata affinità delle NP di Ag per i gruppi tiolo (-SH) presenti sulla cisteina, bloccano le funzioni mitocondriali.

Gli ETC sono una serie di complessi proteici presenti nel mitocondrio, che attraverso reazioni redox permettono la formazione di ATP. L'ATP è l'acronimo di adenosina trifosfato, una molecola fondamentale che funge da "moneta energetica" universale per le cellule, immagazzinando l'energia rilasciata dalle reazioni metaboliche (catabolismo) e trasferendola per alimentare le reazioni che richiedono energia (anabolismo e altre funzioni cellulari). Il blocco degli ETC, inoltre causa una elevata produzione di specie ossidative (ROS), che risultano deleteri per molte biomolecole (Rosli et al., 2021)

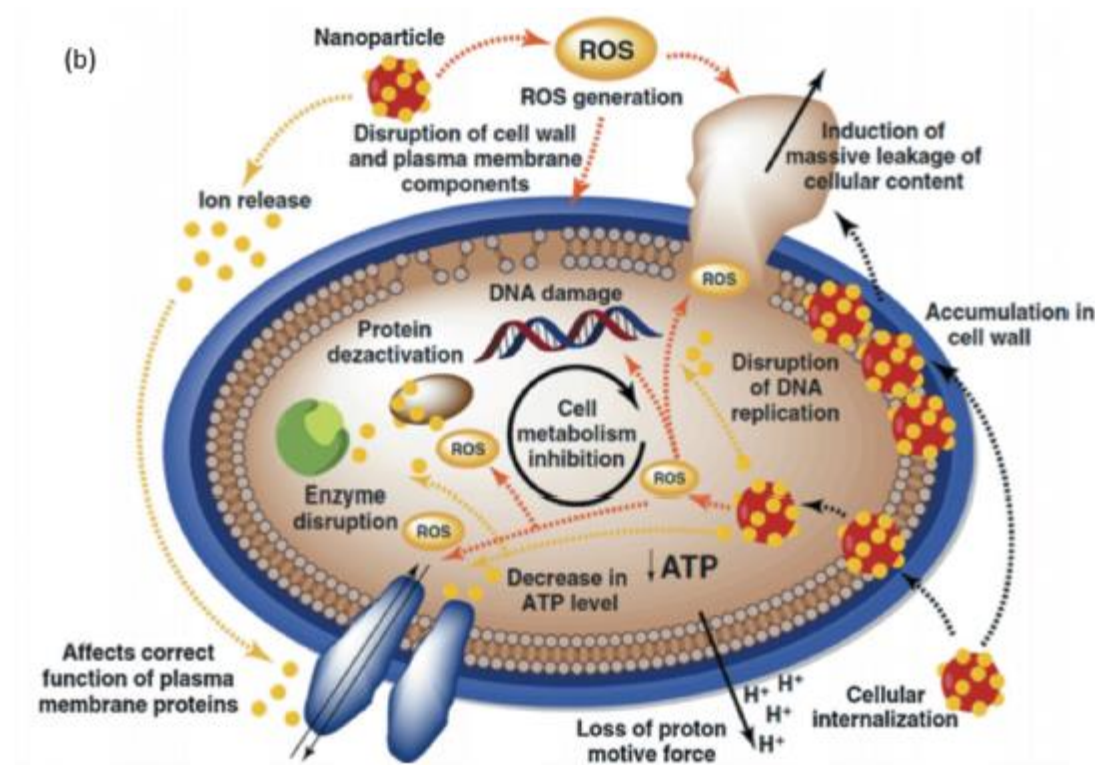


Fig 1.3 Vari meccanismi di azione antimicrobica delle NP

DENATURAZIONE DNA : Un'altra macromolecola colpita dalle NP è il DNA , un filamento a doppia elica formato da 4 basi azotate ; Adenosina (A) , Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C). Le NP oltre a danneggiare direttamente il DNA , ossidando la base azotata con il potenziale redox più basso , la Guanina, riesce anche ad inibire la replicazione del DNA stesso

In questo lavoro si utilizza, come substrato filtrante, del materiale zeolitico (la clinoptilolite) , che presenta buone capacità filtranti contro il particolato atmosferico di dimensioni ridotte ($PM_{10} \leq 10\mu m$ e $PM_{2,5} \leq 2,5\mu m$) [8] ed eliminare altre sostanze inquinanti come l' NH_3 [9].

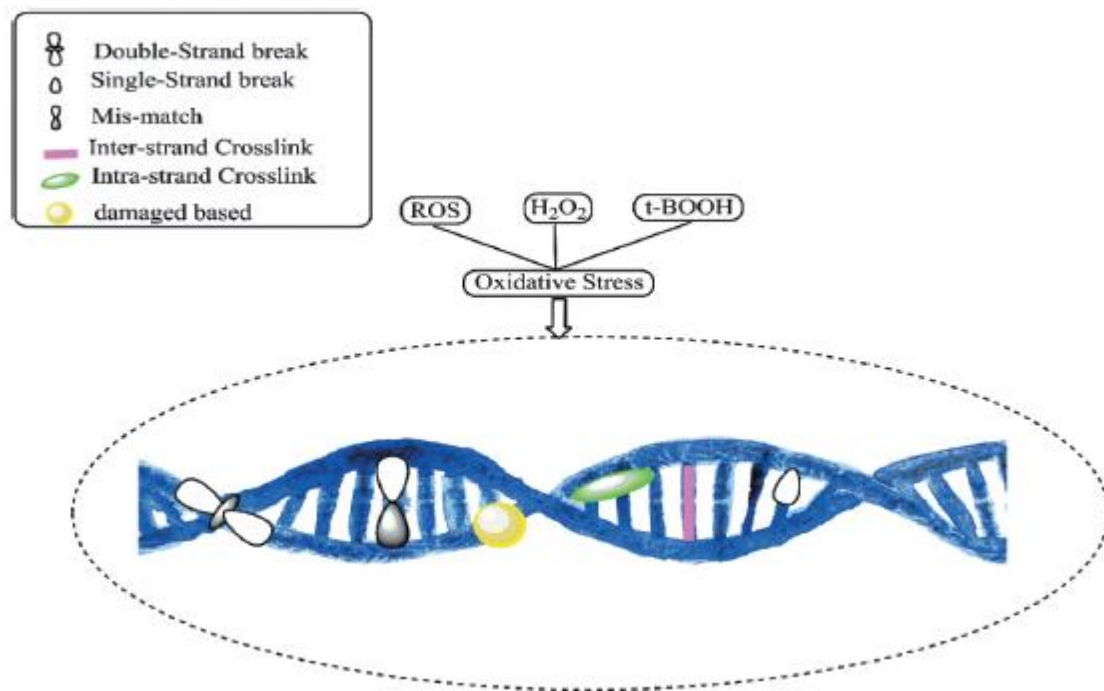


Fig 1.4 Danni provocati al DNA dagli stress ossidativo (ROS). [10]

2 ZEOLITI

2.1 INTRODUZIONE

Le zeoliti sono minerali microporosi ampiamente distribuiti in natura, formatesi in milioni di anni da cenere vulcanica sottoposta ad alte temperature e pressioni.

Axel Fredrick Cronsted scoprì la prima zeolite nel 1756 ed osservò che scaldando questo minerale si liberava una grande quantità di vapore, infatti la parola “zeolite” deriva dal greco dove ζεο (zeo) significa bollire e λιθος (lithos) significa pietra. Infatti questo particolare minerale ha l’abilità di adsorbire, sulla sua vasta area superficiale, molecole d’acqua per poi rilasciarle, quando è sottoposto ad un trattamento termico.

Durante il 19esimo secolo, le proprietà della zeolite naturale, come le capacità adsorbenti e lo scambio ionico, hanno cominciato ad essere scoperte ed essere utilizzate, mentre solo negli anni 40’ è stato possibile sintetizzare la prima zeolite sintetica con una uniforme struttura porosa.

Sono stati utilizzati diversi parametri per descrivere i sistemi porosi: la dimensione dei pori, quella dei canali e la loro direzione, e la composizione chimica, ma la dimensione e forma dei pori rimane la caratteristica più saliente. Tramite la dimensione dei pori il materiale può essere classificato come microporoso (diametro $\leq 2\text{nm}$), mesoporoso (diametro 2-50 nm) o macroporoso (diametro $\geq 50\text{nm}$);

Le zeoliti fanno parte della famiglia degli alluminosilicati cristallini microporosi, presentano una struttura tridimensionale composta da tetraedri di $[\text{SiO}_4]^{4-}$ e $[\text{AlO}_4]^{5-}$ connessi tra loro da atomi di ossigeno. Questi tetraedri rappresentano le unità primarie delle zeoliti definite TO_4 , dove T corrisponde sia a atomi di Si che di Al. I cationi e le molecole d'acqua sono situati nei pori della struttura cristallina che presentano varie dimensioni e forme in base alla zeolite considerata.

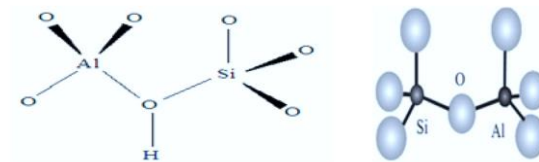


Fig 2.1 struttura atomica delle zeoliti

Le zeoliti vengono classificate in base alle loro caratteristiche: percentuale Si/Al, dimensione dei pori e struttura cristallina.

2.2 CLASSIFICAZIONE

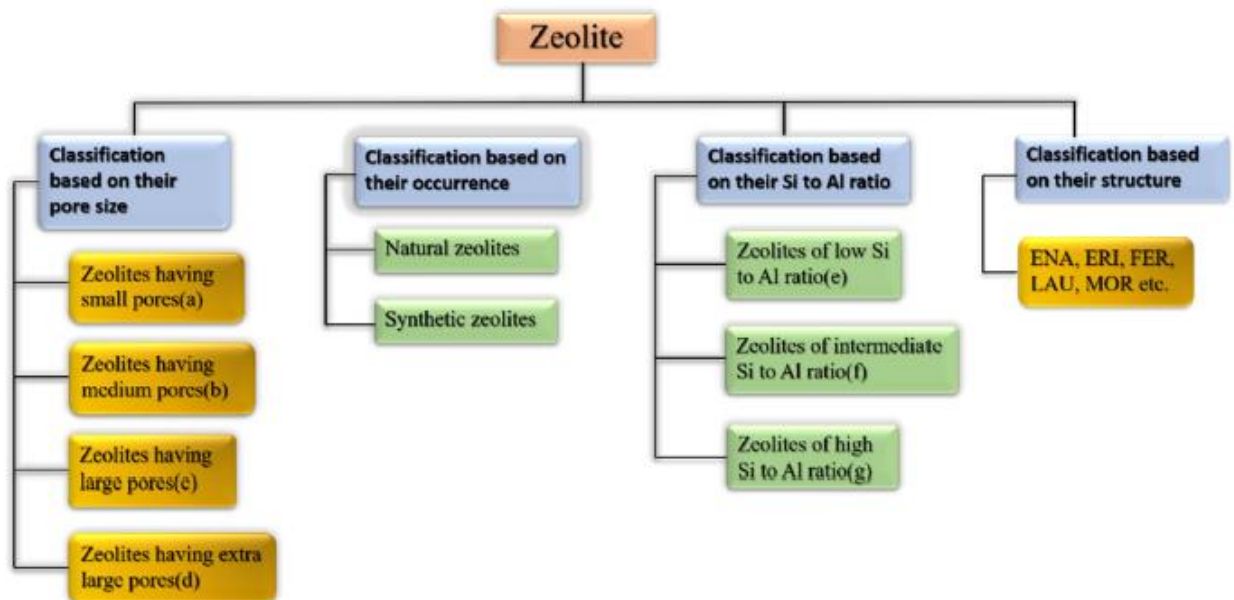


Fig 2.2 Schematizzazione della classificazione delle zeoliti

Le unità primarie (TO_4) formano strutture secondarie (SBU) che contengono 16 o più strutture tetraedriche, le SBU vengono utilizzate per organizzare tutte le strutture delle zeoliti nei sette gruppi principali della nomenclatura in uso. Queste unità si combinano tra loro per formare la struttura specifica di una particolare zeolite che viene identificata mediante un codice a tre lettere. Questa tipologia di classificazione è abbastanza convenzionale perché nella struttura ci possono essere più SBU, ma è tuttora ampiamente utilizzata.



3 (5)



4 (71)



6 (51)



8 (24)



12 (5)



Spiro-5 (2)



4-4 (4)



6-6 (10)



8-8 (3)



4-1 (13)



4-[1,1] (5)



1-4-1 (7)



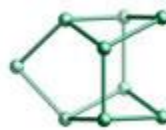
4-2 (23)



4=1 (3)



4-4- (4)



4-4=1 (3)



5-1 (25)



5-[1,1] (2)



1-5-1 (4)



5-3 (10)

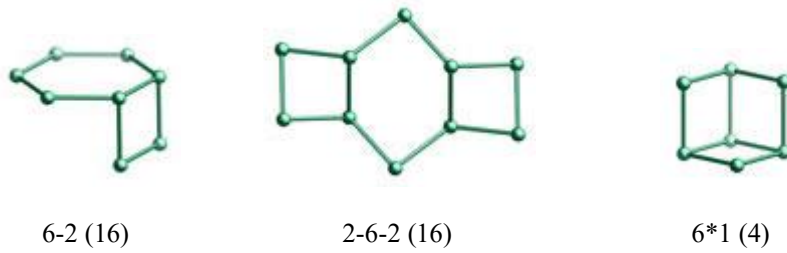
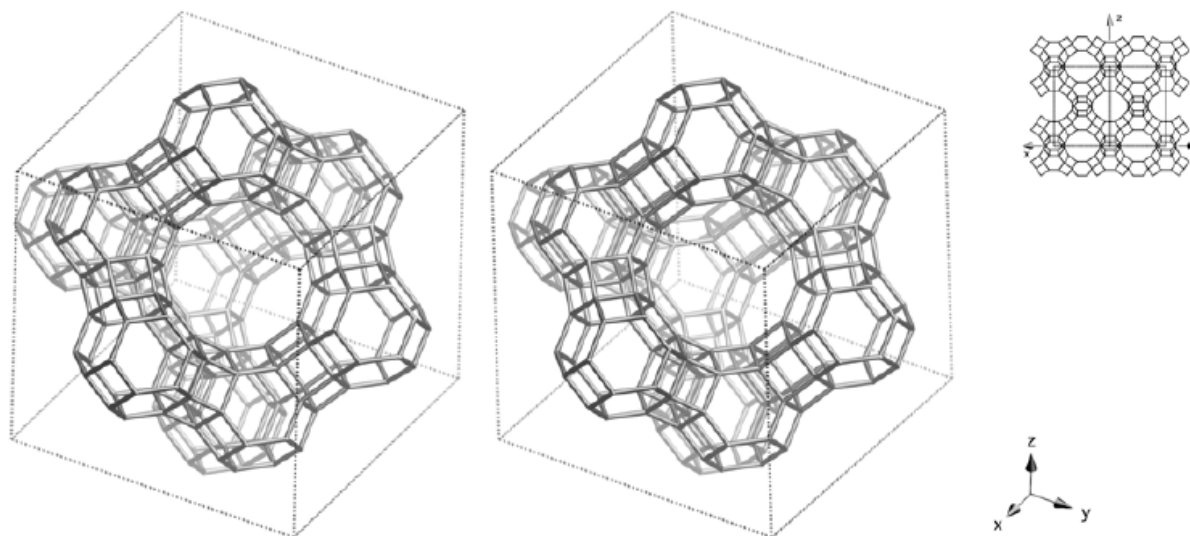


Fig 2.3 strutture delle SBU

(il numero tra parentesi indica la frequenza della presenza di queste SBU all'interno delle zeoliti[11])

L'International Zeolite Association (IZA) distingue le zeoliti e la loro struttura cristallina tramite la sequenza di 3 lettere, ad esempio: CHA chabazite, FAU Faujasite, HEU Heulandite; per ogni tipo di zeolite fornisce una serie di informazioni, come la struttura cristallina, le SBU presenti, l'area superficiale e molto altro.

Framework Type Data



framework viewed along [111] (upper right: projection down [110])

Idealized cell data: cubic, $Fd\bar{3}m$ (origin choice 2), $a = 24.3\text{\AA}$

Coordination sequences and vertex symbols:

$T_1(192,1)$ 4 9 16 25 37 53 73 96 120 145

4-4-4-6-6-12

Secondary building units: 6-6 or 6-2 or 6 or 4-2 or 1-4-1 or 4

Composite building units:

d6r

sod



Materials with this framework type:

*Faujasite^(1,2)

[Al-Ge-O]-FAU^(3,4)

[Co-Al-P-O]-FAU⁽⁵⁾

[Ga-Al-Si-O]-FAU⁽⁶⁾

[Ga-Ge-O]-FAU⁽³⁾

[Ga-Si-O]-FAU⁽⁷⁾

Beryllophosphate X^(8,9)

Dehydrated Na-X⁽¹⁰⁾

Dehydrated US-Y⁽¹¹⁾

LZ-210⁽¹²⁾

Li-LSX⁽¹³⁾

SAPO-37⁽¹⁴⁾

Siliceous Na-Y⁽¹⁵⁾

Zeolite X (Linde X)^(16,17)

Zeolite Y (Linde Y)^(18,19)

Zincophosphate X⁽⁹⁾

EMT-FAU structural intermediates:

CSZ-1⁽²⁰⁾

ECR-30⁽²¹⁾

ZSM-20⁽²²⁾

ZSM-3⁽²³⁾

Type Material Data

Crystal chemical data:	$\text{I}(\text{Ca}, \text{MgNa}_2)_{29} (\text{H}_2\text{O})_{240} [\text{Al}_{58} \text{Si}_{134} \text{O}_{384}] \text{-FAU}$ cubic, $Fd\bar{3}m$, $a = 24.74 \text{ \AA}^{(2)}$
Framework density:	$12.7 \text{ T}/1000 \text{ \AA}^3$
Channels:	$\langle 111 \rangle$ 12 $7.4 \times 7.4^{***}$

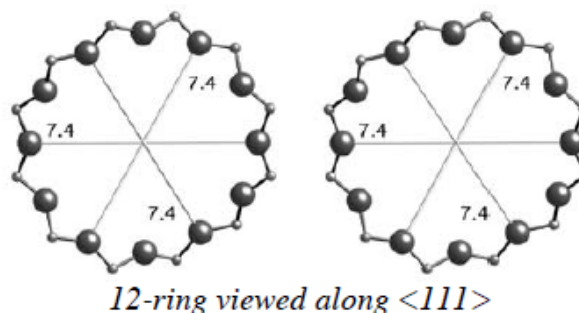


Fig 2.4 esempio di descrizione di una zeolite (Faujasite) dell'International zeolite Association (IZA)

La struttura cristallina di questo minerale presenta pori e canali di dimensioni molecolari, di forma e dimensione caratteristiche del tipo di zeolite esaminata, infatti le zeoliti sono classificate anche in base a queste caratteristiche.

La dimensione dei pori è classificata in base ad un numero n (n -ring) che indica da quanti gruppi tetraedrici è formato il poro. Un 8-ring è considerato un poro di dimensioni ridotte ($4,1 \text{ \AA}$), mentre un 10-ring è un poro medio ($5,5 \text{ \AA}$) e un 12-ring un poro di dimensioni grandi ($7,4 \text{ \AA}$).

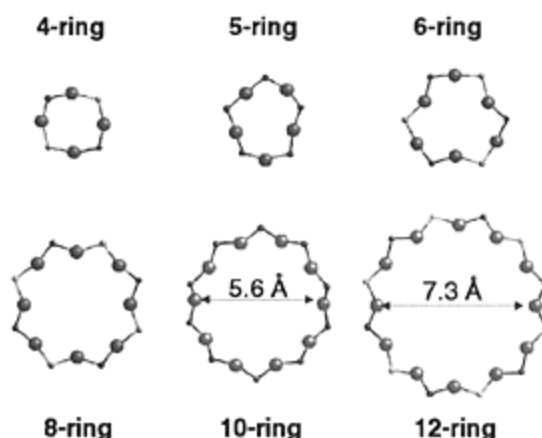


Fig 2.5 dimensione delle dimensioni e forma degli n -ring

La struttura porosa è una proprietà unica di questo materiale, che rappresenta il 98% dell'area superficiale che è dell'ordine di $300\text{-}700 \text{ m}^2/\text{g}$.

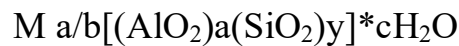
Un'ulteriore classificazione delle zeoliti è in base al tenore di silicio presente nel minerale.

Le zeoliti a basso tenore di silicio ($\text{Si}/\text{Al} \approx 1$) presentano una temperatura di decomposizione termica di circa 700°C , sono instabili in ambiente acido, hanno strutture di 4, 6 e 8 ring e sono idrofiliche; a tenori di silicio più elevati ($\text{Si}/\text{Al} \geq 10$) hanno stabilità

termica a temperature superiori a 1300°C , sono acido-resistenti,hanno strutture 5-ring e sono idrofobiche.

Le zeoliti hanno una struttura complessa, ed è servito diverso tempo per trovare una metodologia per classificarle adeguatamente.[12]

La struttura presenta una carica negativa a causa della presenza di atomi di alluminio, questa viene bilanciata da cationi esterni alla struttura molecolare. La composizione chimica generale della zeolite è:



Dove M rappresenta la quantità dei cationi alcalini o alcalino terrosi presenti, b è la valenza del catione, c è la quantità di acqua di cristallizzazione per unità di cella e a e y rappresentano il numero dei gruppi tetraedrici $[SiO_4]^{4-}$ e $[AlO_4]^{5-}$ per unità di cella. Il rapporto y/a varia da 1 a 5 in base alla struttura.

Le zeoliti sono divise in due grandi categorie: le naturali (clinoptilolite, mordenite e garronite) e sintetiche (zeolite A,P,X e Y), in totale ci sono oltre 200 tipi di zeoliti. Le zeoliti naturali presentano una migliore stabilità termica, che è proporzionale al rapporto silice/allumina. Le zeoliti sintetiche differiscono tra loro grazie al contenuto di alluminio presente nel reticolo, che influenza la struttura cristallina e la capacità dello scambio ionico.[1] [13]

2.3 PROPRIETA' E METODI DI PRODUZIONE

Scaldando le zeoliti a temperature di 350-400°C è possibile rimuovere l'acqua all'interno delle cavità e renderle capaci di assorbire molecole di piccole dimensioni, rendendo le zeoliti ottimi come "setacci molecolari". Inoltre le zeoliti hanno un' alta affinità verso le molecole polari , ad esempio alcune zeoliti assorbono preferenzialmente la CO_2 , utilizzata come filtro per purificare giacimenti di gas naturale; inoltre la capacità di assorbire cationi NH_4^+ rendono le zeoliti un ottimo candidato per purificare le acque reflue metropolitane. La chabazide e la clinoptilolite legandosi agli ioni Cs e Sr , sono utilizzati per il trattamento delle scorie nucleari e negli episodi di fallout [2]; infatti gli ioni Ca^{2+} , naturalmente presenti nelle cavità del minerale, sono sostituiti dagli ioni Cs^{2+} , che hanno un'affinità più alta verso la zeolite.

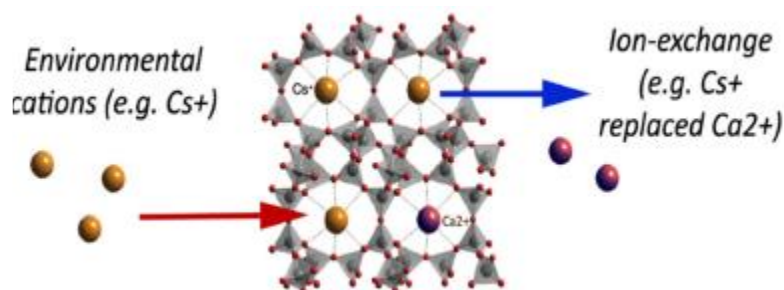


Fig 2.6 ioni Calcio che vengono sostituiti all'interno della struttura della zeolite da ioni Cesio

La capacità di scambio ionico (CEC cation Exchange capacity) delle zeoliti varia con la struttura e la dimensione degli ioni; inoltre le zeoliti naturali, data la natura anionica della

loro struttura, presentano una scarsa affinità verso inquinanti anionici e organici, ma se sottoposti a trattamenti chimico- fisici possono aumentare la loro capacità di adsorbire uno specifico inquinante o molecola. Ad esempio trattando la zeolite con un surfattante organico cationico come il esadeciltrimetilammonio bromuro (HDTMA Br) permette di assorbire coloranti organici come rosso Congo [14].

Le zeoliti possono anche essere sintetizzate utilizzando diversi processi fisico-chimici come: la fusione alcalina, solvo termici ,sol-gel e alkali-leaching. La caratteristica principale delle zeoliti sintetiche è la loro regolarità della struttura cristallina e della dimensione dei pori, che rende altamente riproducibili le loro proprietà catalitiche in campo industriale.

I processi solvo termici utilizzano un solvente come alcoli, glicole etilenico e altri idrocarburi ad alte pressioni e temperature utilizzando delle autoclavi; quanto si utilizza l'acqua come solvente il processo prende il nome di processo idro-termico.

Il processo idrotermico, utilizza come materiale di partenza un mix di composti contenenti alluminio (alluminati, nitrato di alluminio, solfati di alluminio) e silicio (silice, caolino), questi sono fatti reagire ad una temperatura di 90-150°C una pressione di 1-15 bar ed un tempo tra le 24 e 96 h , in base al tipo di zeolite che si vuole produrre, questo processo è a basso consumo energetico, perché permette di ottenere zeoliti a temperature meno elevate rispetto ad altri, ed inoltre è meno inquinante vista la natura del solvente. [15]

I nuclei cristallini si formano durante il processo di cristallizzazione, ma la velocità più elevata di formazione si osserva nella fase iniziale. La sintesi idrotermale delle zeoliti a circa 100 °C provoca generalmente la formazione di cristalli compresi tra 0,1 e 10 µm . A seconda dei parametri di trasformazione utilizzati, la sintesi idrotermica può produrre diversi tipi di zeoliti, tra cui chabazite, Na-P1, phillipsite, faujasite o zeolite (Y, X, A, P) . Nella sintesi idrotermica delle zeoliti devono essere presi in considerazione diversi fattori chiave:

- (a) il rapporto molare Si/Al; basso (Si/Al 5) dà diversi tipi di LTA e zeoliti X, mentre alto (Si/Al 5) dà le zeoliti beta e ZSM-5 e diversi tipi di zeolite Y;
- (b) la concentrazione appropriata di NaOH (ottimale è minore di 3 Mol /L); una concentrazione maggiore riduce la cristallinità e favorisce la formazione di impurezze;
- (c) la temperatura di cristallizzazione, che dovrebbe essere compresa tra 70 °C e 200 °C; una temperatura minore di 70 °C non è sufficiente per la sintesi dei composti cristallini;
- (d) il tempo di cristallizzazione (24-120 h). [16]

I metodi di fusione alcalina e alkali-leaching invece prevedono la decomposizione di materiali ricchi in allumina o silice, utilizzando soluzioni alcaline (es. NaOH) come attivatori di processo. Nella fusione alcalina il materiale di partenza è fuso in ambiente basico e poi sottoposto ad un trattamento idrotermico, dove con le appropriate condizioni di pressione e temperatura sia ha la cristallizzazione della zeolite.

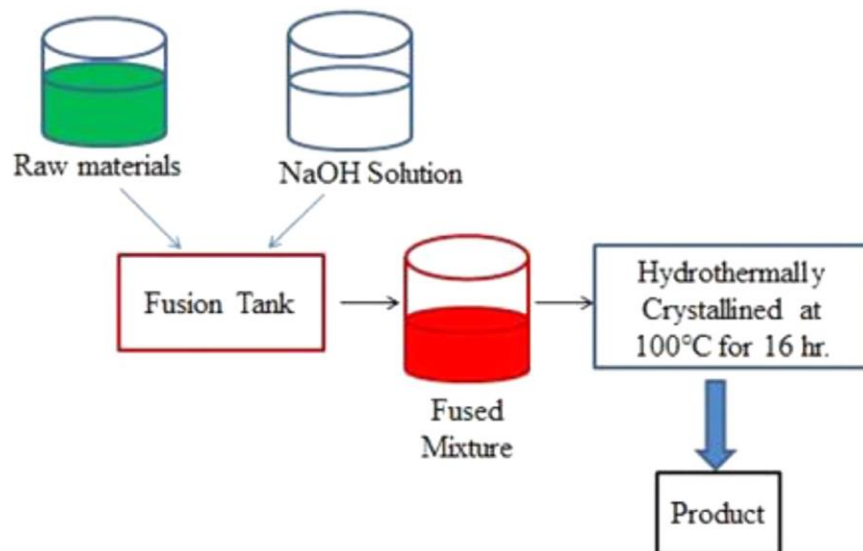


Fig 2.7 sintesi della zeolite tramite fusione alcalina

Questo metodo è influenzato da:

- Percentuale di silicio e alluminio del materiale di partenza
- La concentrazione della soluzione basica
- Temperatura
- Velocità di cristallizzazione

Il metodo Alkali-leaching è molto simile al precedente, ma la soluzione basica ha lo scopo di mantenere un rapporto ottimale di silicio e alluminio nel materiale di partenza, tramite una desalinizzazione di quest'ultimo, e la successiva fusione permette la cristallizzazione della zeolite.

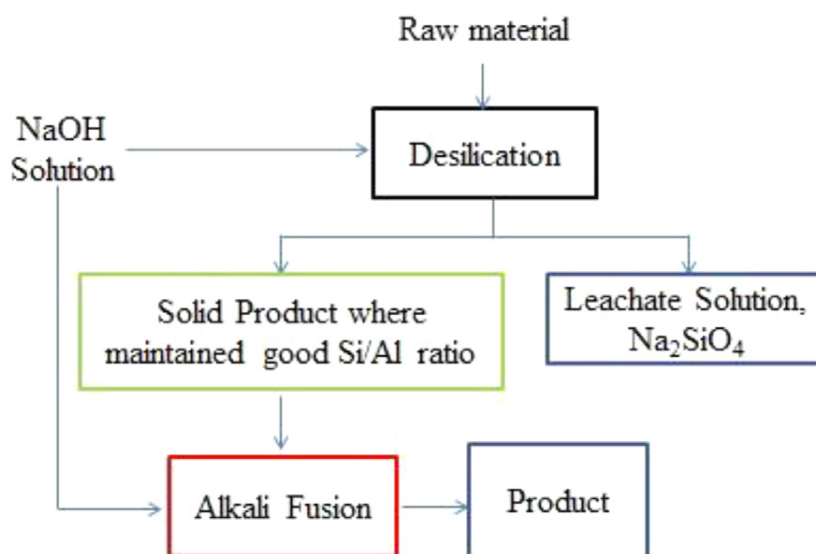


Fig 2.8 Processo di Alkali-leaching

Questo tipo di processo è influenzato da :

- Velocità di desalinizzazione
- Percentuale alluminio /silicio del materiale desalinizzato
- Temperatura di fusione
- Concentrazione dell'agente desalinizzante

- Velocità di cristallizzazione [13]

Un altro metodo di produzione di zeoliti sintetiche è il processo sol-gel, dove, i materiali di partenza utilizzati sono sali metallici (alluminato metallico e silicato metallico o silice sol) o alcossidi metallici da cui si ottiene un gel amorfo. Gli alcossidi metallici sono talvolta usati per migliorare la capacità di auto assemblaggio poiché i loro componenti organici possono combinarsi in micelle e la loro inerzia idrolitica aumenta incrementando sia le dimensioni dei componenti organici (effetto sterico) che il numero di gruppi alcolici nel ligando (effetto chelato o gabbia). Per ottenere la fase cristallina, è necessario un ulteriore trattamento idrotermale. Questo trattamento può essere effettuato con riscaldamento convenzionale o a microonde, che permette un rapido riscaldamento causando una nucleazione abbondante e una velocità di cristallizzazione breve ottenendo un prodotto con una distribuzione granulometrica stretta ed elevata purezza. [17]

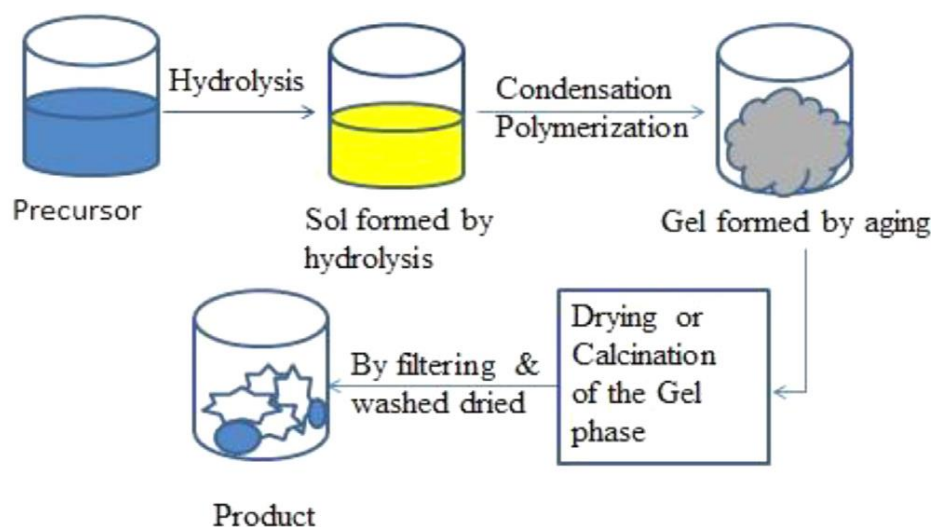


Fig 2.9 processo sol-gel

2.4 PROPRIETÀ' ANTIMICROBICHE

Come spiegato in precedenza, le zeoliti sono minerali inorganici composti da tetraedri di silice e allumina, collegati tra loro da atomi di ossigeno; questi cristalli sono detti alluminosilicati.

La sostituzione di Si^{4+} con Al^{3+} all'interno della struttura, è causa di una carica negativa netta, questa viene neutralizzata da cationi (generalmente Ca^{2+} , Na^+ , K^+) che si legano elettrostaticamente all'interno dei canali della zeolite. In determinate condizioni questi ioni sono potenzialmente scambiabili con altri cationi come: Ag^+ , Cu^+ , Zn^{2+} , Cd^+ , Sr^+ , Ba^{2+} , Li^+ , modificando le proprietà delle zeoliti naturali, conferendole caratteristiche diverse, come l'antibattericità. Numerosi materiali antibatterici perdono la loro efficacia con il tempo, per assicurare un effetto antimicrobico duraturo, materiali come le zeoliti, permettono un lento rilascio degli agenti antibatterici, conferendo un effetto costante nel tempo.

Lo scambio ionico delle zeoliti naturali necessita di un pre-trattamento che può essere un'attivazione termica, un trattamento chimico, o una combinazione di essi. Nel trattamento chimico i cationi interagiscono con le molecole d'acqua formando delle sfere d'idratazione, dove il diametro di queste sfere è inversamente proporzionale al raggio cationico; inoltre atomi divalenti presentano sfere d'idratazione di dimensioni maggiori.

rispetto agli atomi monovalenti. Questo spiega perché ioni come Ca^{2+} e Mg^{2+} hanno maggiore difficoltà ad entrare nei canali zeolitici.

Le proprietà antibatteriche della zeolite sono dovute agli ioni presenti o introdotti sulla sua superficie, infatti la sola carica negativa del minerale non è sufficiente a modificare e danneggiare la parete cellulare batterica,

Ioni di metalli di transizione come Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , presentano un ampio spettro antimicrobico ed in minime dosi sono innocui per la salute umana, specialmente gli ioni di argento sono molto utilizzati come agente antibatterico. [18]

Gli ioni Ag^+ grazie alla loro affinità verso le proteine contenenti zolfo, aderiscono alla superficie della parete cellulare batterica, denaturandola; inoltre le nano particelle di argento (AgNP) hanno l'abilità di oltrepassare la parete cellulare ed entrare nel citoplasma, generando gruppi ossidativi (ROS), che disattivano numerosi enzimi e danneggiano il DNA batterico. [19]

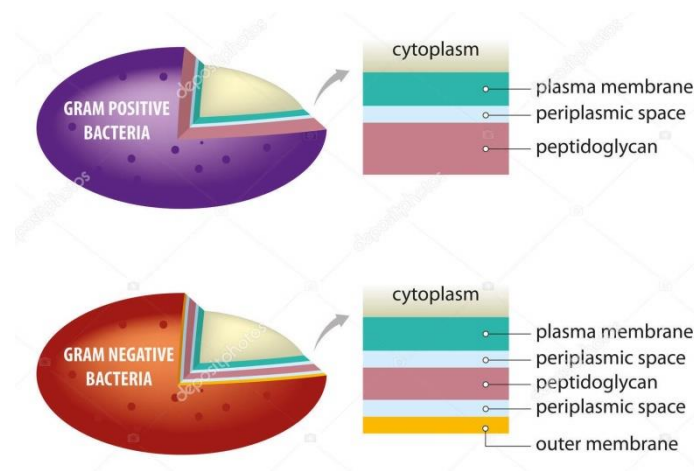


Fig 2.10 differenza tra batteri Gram positivi e Gram negativi. [20]

2.5 METODI PER LA SINTESI DELLE ZEOLITI ANTIBATTERICHE

Le zeoliti con proprietà antibatteriche si sono rivelate un materiale innovativo nella lotta contro le infezioni, in un'epoca di forte antibiotico resistenza. Elementi di transizione come: Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , hanno dimostrato un ottimo spettro di inibizione batterica e presentano una tossicità limitata nel corpo umano, e le zeoliti permettono un rilascio costante nel tempo evitando picchi tossici di questi metalli all'interno dell'organismo.

I principali metodi per conferire proprietà antibatteriche sono:

- **Scambio ionico:** gli ioni della zeolite sono scambiati con altri con proprietà antibatteriche come Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} .
- **Funzionalizzazione :** utilizzando delle opportune sostanze riducenti si introducono nano particelle sulla superficie della zeolite
- **Co-precipitazione:** la zeolite è combinata con nano composti antibatterici
- **Deposizioni tramite mezzi fisici:** attraverso l'uso di ultrasuoni o fasci laser vengono prodotte nano particelle antibatteriche all'interno della zeolite.

Un esempio di applicazione dello scambio ionico è dato da uno studio che descrive come la zeolite Y, una zeolite con un rapporto Si/Al di 2,6, subisce uno scambio cationico di

ioni Ag^+ e Zn^{2+} al posto di ioni idrogeno; le soluzioni utilizzate sono rispettivamente AgNO_3 0,1 N ad un pH di 4,2 e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 0,1N ad un pH di 5,6, che vengono sottoposte ad agitazione meccanica per 24 h a temperatura ambiente. Il risultato ottenuto è di un buon effetto antibatterico su ceppi di *Escherichia coli* e di *Staphylococcus aureus* con una bassa concentrazione di nano materiale (0,5 mg).

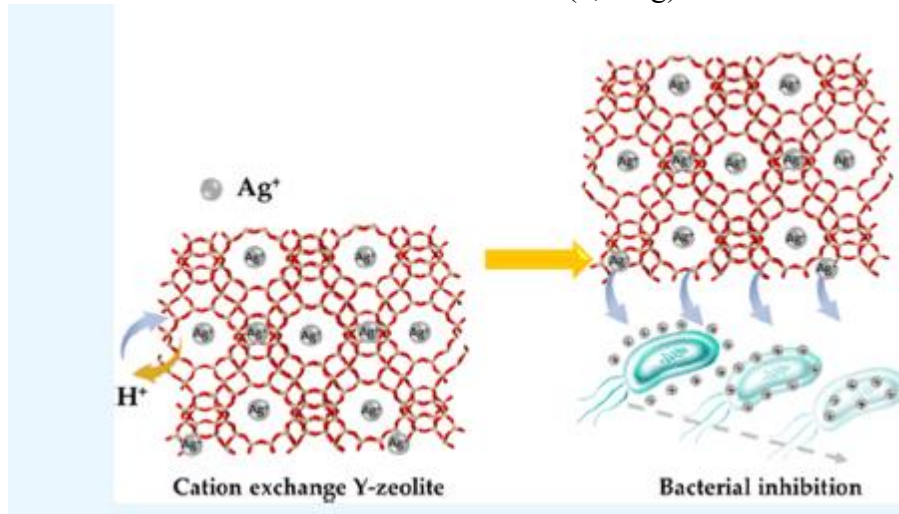
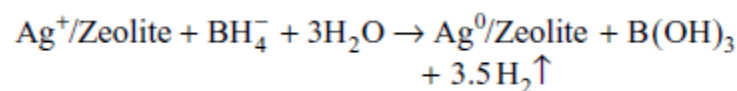


Fig 2.11 Effetto antibatterico della zeolite Y [21]

Diversi lavori sulla funzionalizzazione comprendono l'utilizzo di nanoparticelle d'argento; ad esempio, [22].l'argento sotto forma di AgNO_3 ($1 \cdot 10^{-3}$ M) viene miscelato con la zeolite per 24 h a temperatura ambiente; in seguito l'Ag è ridotto utilizzando una soluzione di NaBH_4 alla concentrazione di $4 \cdot 10^{-2}$ M ($\text{AgNO}_3/\text{NaBH}_4$ in rapporto 1:4), secondo la reazione:



Il complesso Ag/zeolite NC ha dimostrato una buona attività antibatterica contro *E.coli*, *S.dysentria*, *S. aureus* e MRSA (*Staphylococcus aureus* metilicilino resistente).

Un esempio interessante del metodo di co-precipitazione è un la produzione di nano particelle di CuO-ZnO, tramite un processo sol-gel.

lo ZnO è un eccellente agente antibatterico per via delle sua proprietà foto catalitica, che in soluzione acquosa , può convertire le molecole di ossigeno in radicali superossidi ($\bullet\text{O}_2^-$), portando alla formazione di H_2O_2 che penetra nelle pareti cellulari , uccidendo i batteri.

L'unico svantaggio è che lo ZnO ha una band gap larga che diminuisce la resa foto catalitica; il composito CuO-ZnO presenta una band gap più piccola (il 10% di CuO abbassa la band gap da 3,20 eV a 2.48eV).

Samples	Band gap(eV)
ZnO	3,39
CuO	2,04
10%CuO-ZnO	2,48
15%CuO-ZnO	2,30
20%CuO-ZnO	2,23
25%CuO-ZnO	2,12

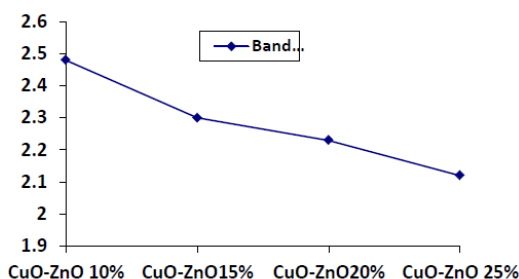


Fig 2.12 grafico e tabella dei valori di Band gap dello ZnO aggiungendo percentuali crescenti di CuO. [23]

2.6 MORFOLOGIA ,STRUTTURA E PROPRIETA' DELLA CLINOPTILOLITE

La clinoptilolite presenta una buona stabilità chimica in ambiente basico, ed è termostabile; inoltre è una zeolite naturale, che non presenta effetti tossici sia su uomini che su animali, per cui perfettamente affine ad un processo ecologicamente sostenibile, come questa sperimentazione, inoltre è una zeolite molto abbondante e quindi ad impatto economico contenuto. Molte tecnologie utilizzano la clinoptilolite per la purificazione delle acque da agenti chimici inquinanti, applicazioni biomediche [24] e la rimozione di elementi radioattivi come il ^{137}Cs ^{134}Cs , presenti dopo gli incidenti di Chernobyl [25] e Fukushima [26]

Il nome clinoptilolite deriva dalle parole greche κλινω , πτερον e λιθοζ che significa rispettivamente obliquo, piuma e pietra, la ragione di questo nome è dovuta alla configurazione monoclinale (o obliqua) del minerale ptilolite.

La clinoptilolite fa parte delle zeoliti naturali ed è stata classificata nel 1932, si trova generalmente nelle rocce sedimentarie in associazione con l'heudalite.

I cristalli di clinoptilolite hanno una forma appiattita con dimensioni di circa 200 X 74 nm caratterizzati da grani con delle facce cristalline non definite.

All'interno della struttura cristallina sono presenti due canali bidimensionali, il canale A composto da 10-ring e il canale B composto da 8-ring , distribuiti parallelamente tra loro, mentre un altro canale , il canale C è perpendicolare rispetto ai primi due e presenta dimensioni di circa 8-ring. Questi canali possono essere occupati da particolari cationi (generalmente del gruppo degli alcalini e alcalini-terrosi), che compensano la carenza di carica dovuta alla presenza di atomi di Al.

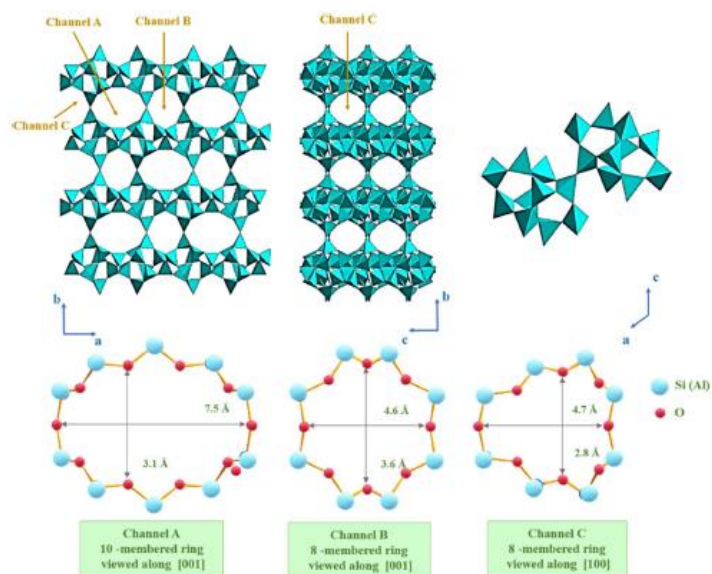
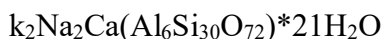


Fig 2.13 rappresentazione della struttura della clinoptilolite [27]

La formula generica della clinoptilolite è :



che mostra una selettività in base al tipo di catione adsorbito.

La clinoptilolite è presente in 3 differenti forme: la clinoptilolite K , la più abbondante, che si può trovare in depositi minerali sottomarini, mentre la clinoptilolite Na e Ca, è presente in rocce vulcaniche e sistemi idrotermali.

La clinoptilolite naturale è caratterizzata da una bassa area superficiale specifica di circa $26m^2/g$ (metodo BET a $-196^\circ C$), risultati simili sono stati rilevati in altri tipi di zeoliti; ma misure isoterme mostrano cicli d'isteresi , dovuti alla presenza di pori di dimensioni ridotte ($\leq 30\text{\AA}$), che gli atomi di N_2 non riescono ad entrarvi.

Ulteriori misure sono state condotte utilizzando CO_2 a 273 K al posto di N_2 , l'effetto sinergico tra il minor diametro delle molecole di anidride carbonica e una temperatura più elevata ($0^\circ C$) hanno consentito alla molecola di entrare nei micropori della zeolite, ricavando un valore di $240m^2/g$. [27]

La clinoptilolite modificata con elementi di transizione ha dimostrato buone proprietà antibatteriche. La zeolite contenete ioni argento, è risultata un ottimo battericida contro ceppi di *E.Coli* e *S.aureus*. [28]

Nano particelle di Cu_2O , ZnO e NiO , depositata all'interno della matrice della clinoptilolite naturale ha dimostrato sia un ottima efficacia antibatterica, che antiprotozoica (100% di efficacia contro il *Paramecium caudatum* e *Euplotes affinis*) [29] , anche le nano particelle d'oro, in percentuale del 2,3-2,8% in peso, su un supporto di clinoptilolite, hanno dimostrato un'efficacia del 90-95% su colonie di *E.coli* e *Salmonella thyphi* [30]

3 NANOPARTICELLE

3.1 INTRODUZIONE

La nanotecnologia è attualmente un ramo della ricerca in forte espansione, le dimensioni ridotte delle nano particelle (1-100 nm) influenzano le proprietà come duttilità, durezza, conducibilità e altre caratteristiche che il materiale non possiede allo stato macroscopico.

Le ragioni di questo comportamento sono da attribuire all'aumentato rapporto tra superficie e volume ed al confinamento quantico. L'incremento del rapporto tra superficie e volume ha come conseguenza, l'aumento superficiale degli atomi esposti e dei "dangling bond" che rendono la nano particella molto più reattiva chimicamente; una particella sferica, ad esempio, di 100 nm di diametro ha solo una piccola percentuale (circa 2%) dei suoi atomi costituenti, esposti sulla superficie, mentre una particella di 10 nm ha circa il 20-25% di atomi esposti. Una particella di 3 nm possiede dal 45 al 60%, incrementando notevolmente la sua reattività chimica; questo spiega come certi metalli nobili come l'Ag, Au, Pt ecc sono molto più reattivi a dimensioni nanometriche.[31]

Il grafene ad esempio, consiste in un singolo strato atomico di grafite, fu scoperto nel 2004 da Nosolov et al nell'università di Manchester [32], presenta una conducibilità di $5000 \text{ W/m} \cdot \text{K}$, che equivale a 10 volte quella del rame, ha un'elevata area superficiale, circa $2630 \text{ m}^2/\text{g}$, ha un modulo elastico di 1 TPa e uno sforzo tensile di 130 GPa, ovvero è 100 volte più resistente dell'acciaio, inoltre presenta un elevato numero di "dangling bonds" rendendolo un eccellente materiale finalizzato alla sensoristica di molecole gassose, nonché nel campo dell'elettronica.[33]

Il confinamento quantico consiste in un confinamento maggiore della funzione d'onda, comportando cambiamenti delle proprietà ottiche ed elettriche del materiale, dovuto a variazioni della struttura a bande dello stesso.

Questo confinamento è il responsabile della mobilità degli elettroni e della conseguente variazione della costante dielettrica; inoltre le soluzioni colloidali delle nano particelle presentano variazioni cromatiche in base alla dimensione delle particelle presenti. [34]

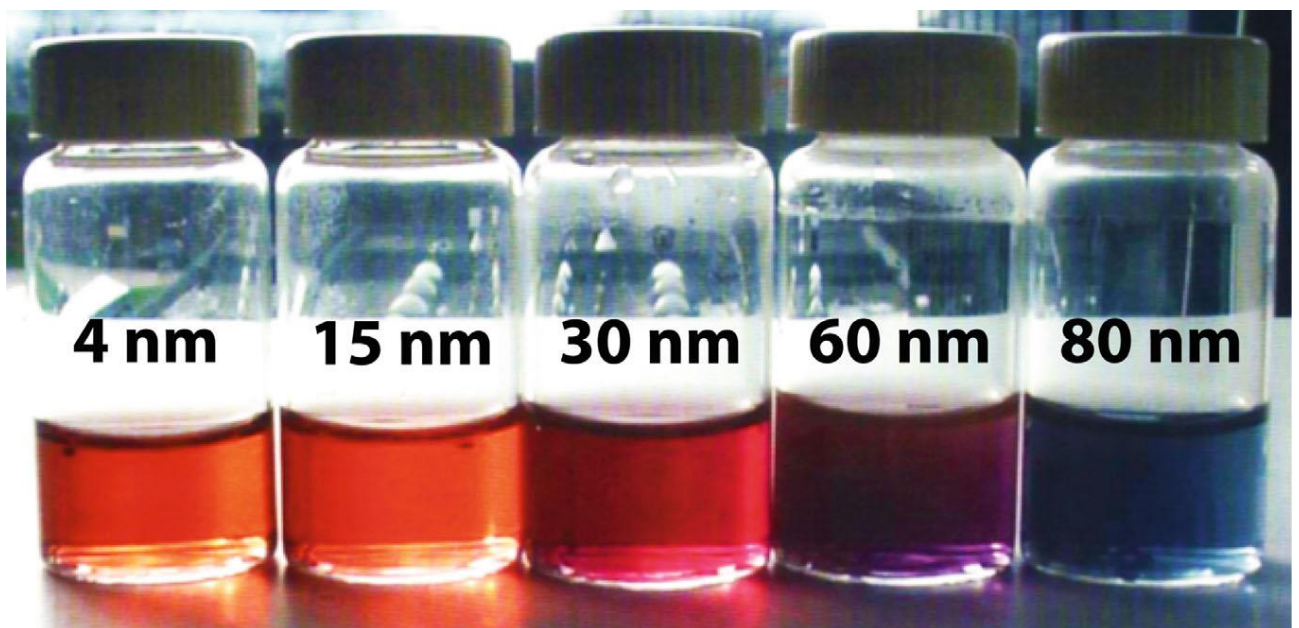


Fig 3.1 sospensione colloidale di nano particelle d'oro in acqua. Le dimensioni delle nano particelle sono indicate sui contenitori (*Courtesy F. H. Reincke, Utrecht University, 2004*)

Le nano particelle possono essere realizzate utilizzando numerosi metodi sia fisici che chimici, solitamente i processi fisici hanno un approccio “top-down” dove dal materiale bulk, si arriva a unità di dimensioni ridotte. I processi chimici, invece, sono principalmente “bottom-up” dove i singoli atomi si aggregano, generando particelle più grosse, quest’ultima tipologia di processo (riduzione, decomposizione termica, sintesi sol-gel) permette di ottenere più facilmente piccole particelle uniformi tra loro.

3.2 CLASSIFICAZIONE NANOPARTICELLE

3.2.1 NANO PARTICELLE ORGANICHE

Le nanoparticelle organiche sono piccole particelle costituite da molecole o polimeri aggregati. Questi materiali sono di grande interesse per la facilità di fabbricazione e l'ampia gamma di strutture che si possono ottenere. Queste nano particelle hanno suscitato un grosso interesse nell’industria biomedica per lo sviluppo di innovative modalità di trattamento di diverse patologie. La loro facilità di sintesi, la biocompatibilità e la loro scarsa citotossicità, hanno reso queste nano particelle come potenziali candidati per applicazioni: come drug delivery, bioimaging e phototherapy. [35]

Le nano particelle organiche possono essere prodotte in varie configurazioni come: micelle, liposomi, strutture dendritiche, ecc. Alcune particelle, come micelle e liposomi, hanno delle cavità che possono essere utilizzate come drug delivery, su determinate cellule bersaglio.

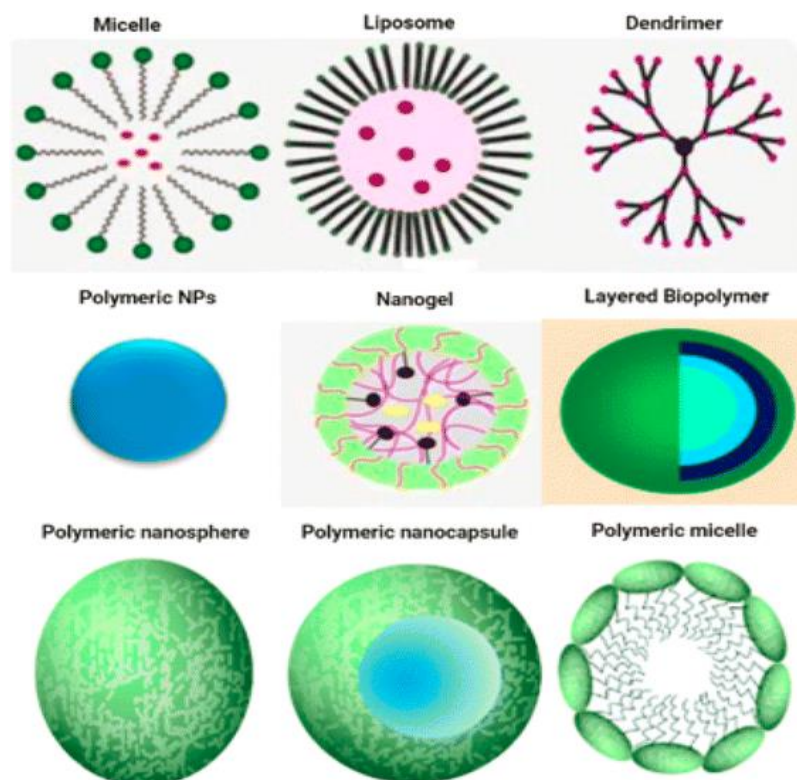


Fig 3.2 schema delle tipologie di nano particelle organiche [36]

Le nano particelle organiche sono prodotte tramite i seguenti metodi:

- Emulsificazione
- Nano precipitazione
- Essiccazione (Drying process)

Emulsificazione: il termine emulsione è definito come la miscela di due o più liquidi immiscibili o parzialmente tali. In base alla dimensione delle gocce, l'emulsione possono essere suddivise in micro-emulsioni quando le gocce sono comprese tra i 10 e 100 nm, mini emulsioni quando le gocce sono comprese tra 100 nm e 1 μ m, mentre nelle macro emulsioni le dimensioni delle gocce superano l'1 μ m.

Nell'ultima decade, le metodologie per ottenere emulsioni con gocce di dimensioni nanometriche si sono evolute, grazie allo sviluppo tecnologico dei dispositivi emulsionanti, incentivando le strategie di sintesi di nano particelle organiche.

In questa tecnica il polimero viene sciolto in un solvente volatile, immiscibile con l'acqua (cloroformio, diclorometano, ecc), la soluzione ottenuta viene emulsionata in una soluzione acquosa contenente agenti stabilizzanti. In seguito il solvente viene fatto evaporare, generalmente aumentando la temperatura e diminuendo la pressione, con conseguente precipitazione di nano particelle solide.

Nano precipitazione: detta anche deposizione interfacciale, questa tecnica si basa sulla precipitazione di un polimero preformato da una soluzione organica in una soluzione acquosa, con o senza la presenza di un tensioattivo. In questo metodo, la soluzione polimerica viene aggiunta per gocciolamento ad una soluzione non-solvente, miscibile con quello utilizzato per sciogliere il polimero. Le nanoparticelle si formano istantaneamente grazie alla rapida desolvatazione ed aggregazione delle catene polimeriche.

La precipitazione avviene all'interfaccia tra la soluzione idrofila ed il solvente organico.

Essiccazione: questa metodologia può essere sviluppata attraverso diverse tecniche: l'essiccazione a spruzzo (spray-drying), dove la sospensione di nano particelle viene atomizzata in piccole goccioline che vengono riscaldate da un flusso di aria calda; una tecnica simile è lo spray-freeze-drying, dove la sospensione di nanoparticelle viene prima nebulizzata e rapidamente congelata e successivamente sublimata sottovuoto, questo processo permette di preservare meglio la struttura delle nano particelle rispetto alla spray-drying [37]

3.2.2 NANO PARTICELLE CERAMICHE

Le nano particelle ceramiche sono sistemi inorganici con porosità caratteristiche, ultimamente sono risultate interessanti come drug vehicles, dato la biocompatibilità di alcune nano particelle come la silice, titania e allumina. Il vantaggio di queste nano particelle è la loro facilità di sintesi, permettendo di ottenere la dimensione, forma e porosità desiderata.

Le nano particelle ceramiche, hanno proprietà intermedie tra i metalli e i non metalli, presentano un alto modulo elastico, elevata durezza e buona resistenza agli ambienti corrosivi. Queste proprietà sono dovute ai loro legami, prettamente ionici e covalenti.

Le bioceramiche sono una classe avanzata di particelle ceramiche biocompatibili utilizzate come protesi ossee e dentali, queste possono essere: inerti, bioattive e

degradabili; questi materiali includono l'allumina, la zirconia, fosfati di calcio e vetri silicei. La famiglia dei calcio fosfati include l'idrossiapatite che è stabile al pH fisiologico e ha la proprietà di osteointegrarsi con la matrice ossea e per questa proprietà viene largamente utilizzato negli interventi chirurgici ortopedici.

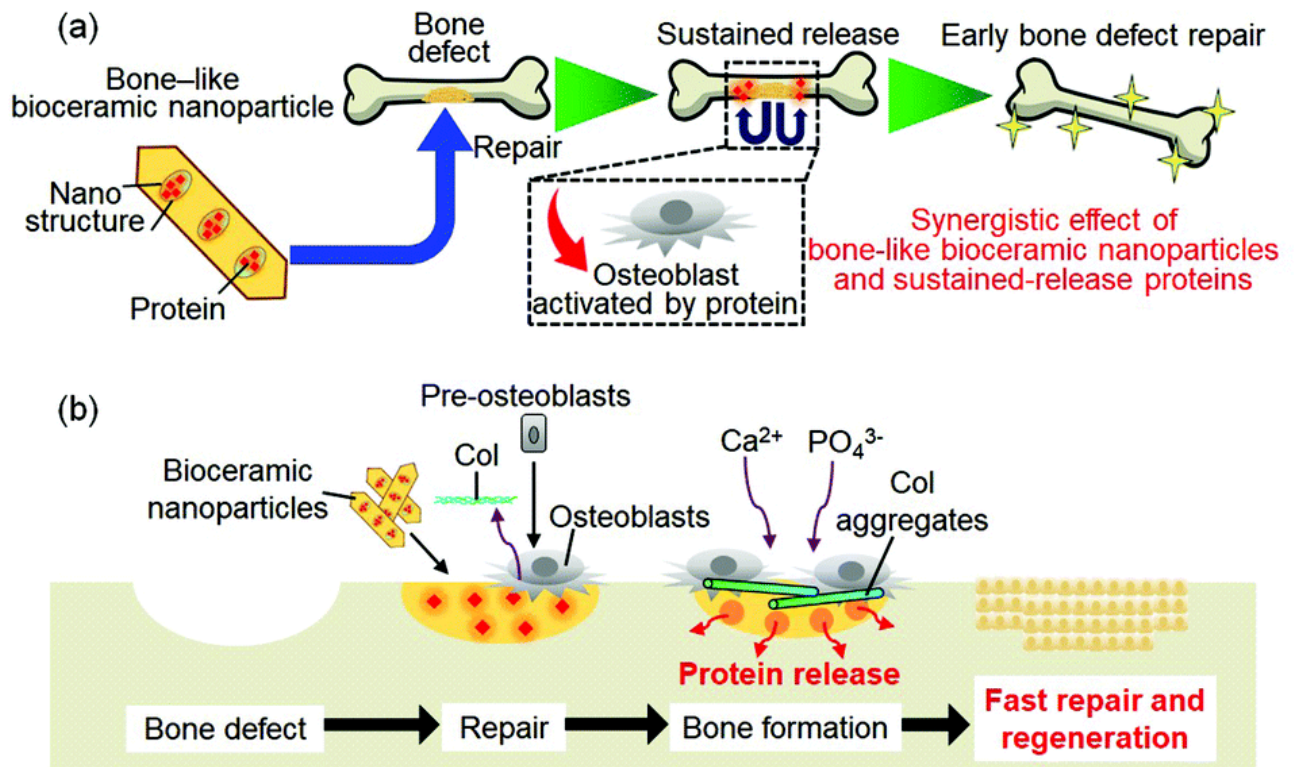


Fig 3.3 esempio di applicazione dell'idrossiapatite [38]

I minerali inorganici costituenti le ossa, sono stati determinati agli inizi del ventesimo secolo, questi sono stati identificati come un insieme di apatiti biologiche e molecole di collagene. L'idrossiapatite (HAP) fa parte del gruppo di calcio fosfati ed ha struttura chimica simile alle ossa umane ed una eccellente biocompatibilità e bioattività, come il trasporto di antigeni e farmaci chemioterapici.

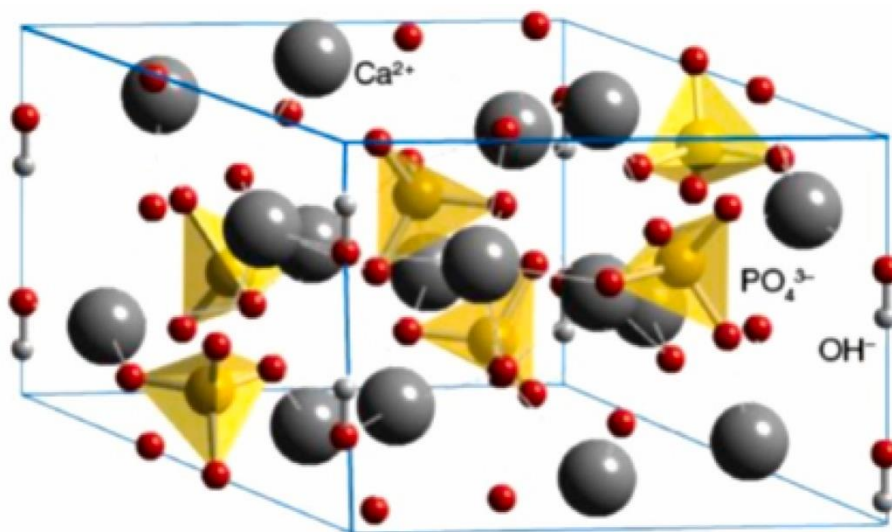
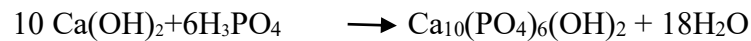


Fig3.4 struttura dell'idrossiapatite

L'idrossiapatite, comunemente, è sintetizzata tramite reazione chimica di ossidi inorganici in soluzione, secondo la:



La velocità di aggiunta dei reagenti, la temperatura di reazione ed il pH influenzano la forma, la dimensione e l'area superficiale delle nano particelle.

La velocità con il quale si aggiungono i reagenti determina la purezza dell'idrossiapatite ottenuta, la temperatura di reazione determina se i cristalli ottenuti sono monocristallini o policristallini, a temperature inferiori a 60°C i cristalli ottenuti saranno monocristallini.[39]

3.2.3 NANO PARTICELLE METALLICHE

3.2.3.1 CENNI STORICI

Fin dal IV secolo d.c. molti artigiani aggiungevano sali di metalli preziosi al vetro fuso per ottenere particolari colorazioni. Questi sali, sottoposti a riscaldamento, si scindevano in atomi, per poi riaggregarsi formando nano particelle, le quali rimanevano disperse in una matrice di ossido di silicio, producendo un materiale che assorbiva alcune lunghezze della luce visibile.

Alcune vetrate delle chiese sono un buon esempio delle prime apparizioni della nanotecnologia. In Italia, durante il XV e XVI secolo, gli artigiani producevano vasellame smaltato con una matrice vetrosa ed in seguito veniva applicata una mistura ottenuta mescolando sali d'argento e oro, ocra ed argilla; tramite un successivo riscaldamento, gli ioni metallici della mistura erano ridotti in nano particelle metalliche di 5-100 nm, fornendo al prodotto delle colorazioni particolari.

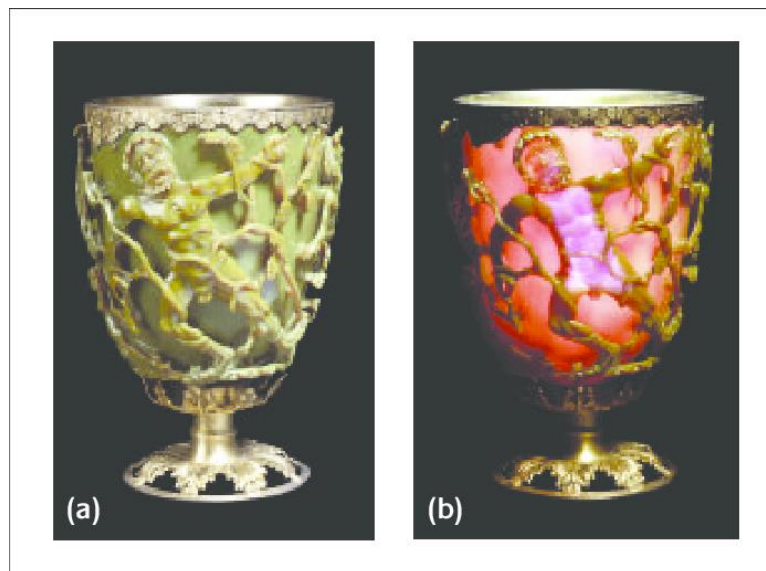


Fig 3.5 Esempio di manufatto contenente nano particelle: La Coppa di Licurgo, in vetro dicroico, che appare verde in riflessione (a) e rosso in trasmissione (b) [40]

3.3 METODI DI SINTESI

Le NP metalliche sono sintetizzate utilizzando diversi metodi fisici, chimici e biologici.

I metodi fisici permettono di evitare le contaminazioni da solvente, ma allo stesso tempo sono processi energivori e quindi costosi; i metodi chimici utilizzano sostanze chimiche per agglomerare e ridurre i Sali metallici in NP, ma queste risultano contaminate.

La sintesi biologica risulta molto interessante per via del suo approccio eco-friendly , evitando l'utilizzo di sostanze chimiche inquinanti e inoltre è energeticamente vantaggioso rispetto ai metodi fisici.

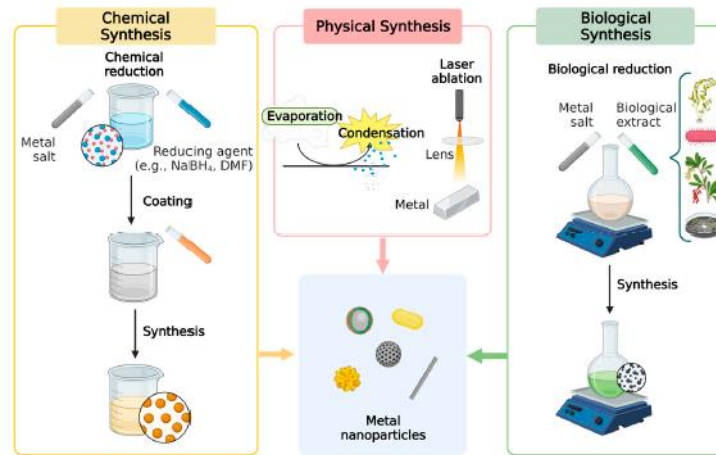


Fig 3.6 Tecniche di sintesi di NP metalliche [41]

La nucleazione è lo step iniziale della formazione della nano particella, dove ioni, atomi o molecole, si uniscono e per poi crescere , la nucleazione è un processo termodinamico , nella quale si ha la formazione di un nucleo , in una forma metastabile. Questo processo segue la legge classica della nucleazione (CNT) sviluppata da Becker and Doring che prevede un abbassamento dell'energia libera totale ΔG di Gibbs al fine di far avvenire la nucleazione secondo la:

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 |\Delta G_v| + 4\pi r^2 \gamma \quad (1)$$

Dove γ è l'energia superficiale e ΔG_v è definita come:

$$\Delta G_v = \frac{-k_B T \ln(S)}{v} \quad (2)$$

Dove T è la temperatura, k_B la costante di Boltzmann , S la solubilità e v è il volume molare.

Differenziando ΔG rispetto al raggio del nucleo r , si può ottenere il raggio critico ,

$$\frac{d\Delta G}{dr} = 0 = 8\pi r \gamma + 4\pi r^2 \Delta G_v \quad (3)$$

$$r_{crit} = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v} = \frac{2\gamma v}{k_B T \ln(S)} \quad (4)$$

Il raggio critico corrisponde alla dimensione minima alla quale una particella può rimanere in soluzione senza venire ri-dissolta.

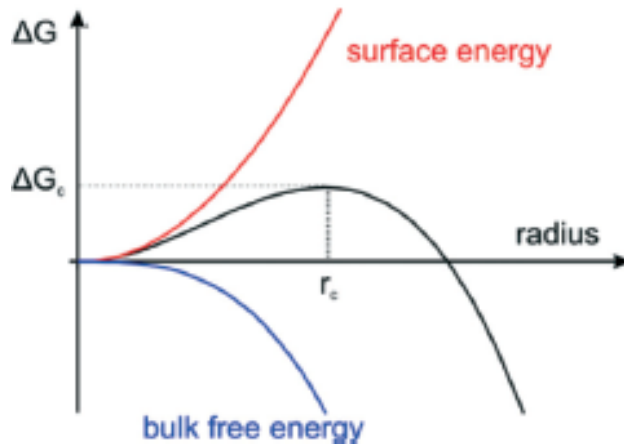


Fig 3.7 grafico della ΔG rispetto al raggio della particella [42]

$$\Delta G_{crit} = \frac{4}{3} \pi \gamma r_{crit}^2 \quad (5)$$

La velocità di nucleazione di N particelle durante un tempo t può essere descritta usando l'equazione di Arrhenius eq 6

$$\frac{dN}{dt} = A \exp\left(-\frac{\Delta G_{crit}}{k_B T}\right) \quad (6)$$

Dove A è una costante pre esponenziale, sostituendo nell'equazione 6 , l'equazione 4 e 5 si ottiene:

$$\frac{dN}{dt} = A \exp\left(\frac{16 \pi \gamma^3 v^2}{3 k_B^3 T^3 \ln(S)^2}\right) \quad (7)$$

Dall'equazione 7 possono variare tre parametri sperimentali : saturazione, temperatura e energia superficiale libera. [43]

Le nano particelle possono essere formate partendo dal materiale bulk (top-down) oppure dagli atomi costituenti (bottom-up)

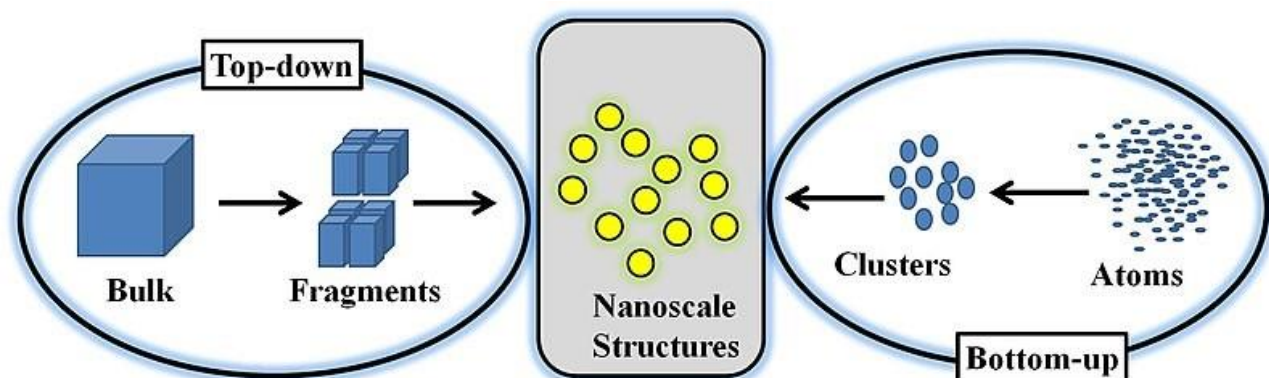


Fig 3.8 schema esplicativo sui processi Top-down e Bottom-up

I metodi per ottenere le nano particelle sono molteplici, come: processi fisici, chimici e biologici, i quali poi si suddividono in numerose sottocategorie, inoltre esistono dei metodi che non rientrano nella classificazione precedente e vengono incluse sotto la voce “other methods” . la classificazione è illustrata nello schema seguente

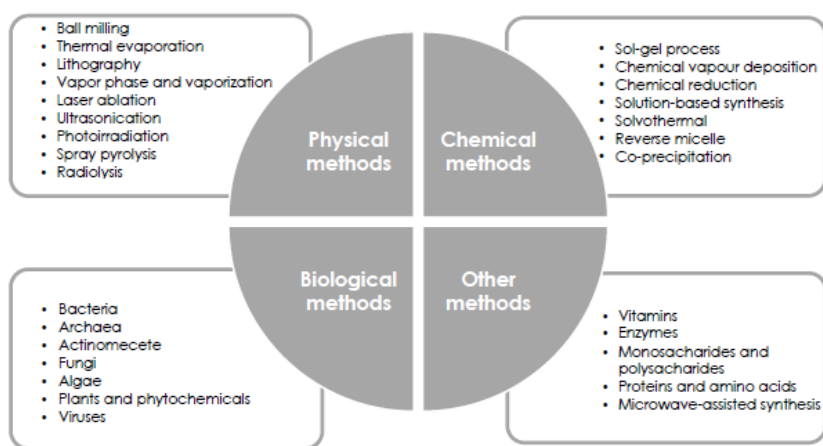


Fig 3.9 Rappresentazione dei metodi di sintesi di NP metalliche

3.4 METODI FISICI

3.4.1 METODI MECCANICI

Il processi top down più semplice è la macinazione meccanica, dove tramite un mulino a sfere si frantuma il materiale interessato; in base alla velocità di rotazione e al tempo in cui il materiale permane nel mulino si ottiene la dimensione delle particelle.

Salah et all hanno ottenuto delle particelle di ZnO con dimensioni di circa 20 nm, utilizzando un mulino a sfere ad alta energia [44]

3.4.2 LASER ABLATION

Altri processi top down sfruttano un laser per frammentare particelle in soluzione acquosa formando soluzioni colloidali. Con questa tecnica è possibile ottenere nano particelle di dimensioni fortemente dipendenti dalla lunghezza d'onda utilizzata inoltre è un processo che permette la formazione di soluzioni colloidali senza altri reagenti chimici.[45]

3.4.3 PHYSICAL VAPOUR DEPOSITION (PVD)

I metodi bottom-up formano la nano particella partendo da atomi o molecole, un processo puramente fisico è la physical vapour deposition (PVD) che sfrutta un gas inerte ionizzato, questo viene accelerato da un campo elettrico contro un target. Quando gli ioni colpiscono il target, gli atomi o molecole vengono espulse e poi depositate sul substrato.

I vantaggi di questa tecnica sono che le particelle risultanti hanno la medesima composizione del target, è una tecnica versatile per quasi tutti i materiali, l'utilizzo di un target solido permette di controllare la composizione esatta del materiale, evitando complicati processi chimici. [46]

con questa tecnica è stato possibile ottenere nanoparticelle di oro e platino di dimensioni di circa 10 nm [47]

3.5 METODI CHIMICI

3.5.1 CHEMICAL REDUCTION

Le NP metalliche hanno attirato l'attenzione, viste le loro inusuali proprietà, che risultano differenti dalla loro forma standard (bulk metal). Le proprietà chimico fisiche delle NP dipendono dalla loro dimensione, struttura e forma, per cui il controllo di questi parametri è fondamentale.

La produzione di NP metalliche prodotte attraverso riduzione chimica coinvolge sali dei metalli selezionati ed un opportuno riducente, ovvero la sostanza chimica che trasforma gli ioni in metallo. Il solvente utilizzato può essere acquoso o di natura organica, utilizzato nel caso in cui il metallo è particolarmente sensibile all'ossidazione.

La sintesi delle NP consiste in tre passaggi:

1. Durante la reazione redox gli elettroni dell'agente riducente vengono trasferiti agli ioni metallici, formando il metallo:



2. Processo di nucleazione, dove gli atomi di metallo collidano tra loro formando la particella
3. Aggiunta di uno stabilizzatore, evita alle nano particelle di aggregarsi tra loro

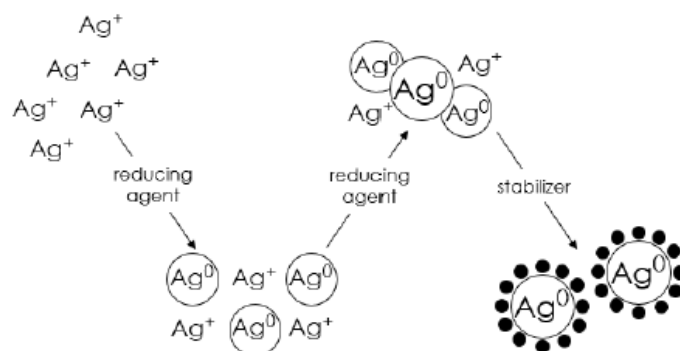


Fig 3.10 schema della riduzione chimica di nano particelle (in questo caso si è utilizzato l'argento come esempio)

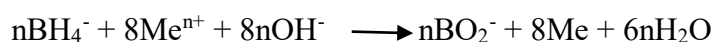
Gli atomi metallici, prodotti attraverso la riduzione chimica, sono insolubili nel liquido e quindi si aggregano in cluster detti nuclei; il numero e la dimensione dei nuclei dipendono

dipendono da parametri come: la concentrazione del soluto, il potenziale redox della reazione, la temperatura, la viscosità del solvente e la sua tensione superficiale.[48]

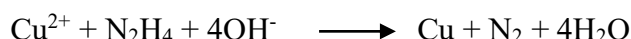
3.5.1.1 AGENTE RIDUCENTE

La scelta del riducente è ampia e dipende dalla termodinamica della reazione redox ed in molti casi è strettamente condizionato dal pH della soluzione.

Il boro idruro di sodio (NaBH_4) è uno dei più forti riducenti, utilizzato per la formazione di nano particelle di oro. Argento, palladio, rodio, ecc. Per un generico ione metallico positivo la reazione di riduzione è la seguente :



un altro agente riducente è l'idrazina (N_2H_4) , che ha dimostrato proprietà riducenti anche a temperatura ambiente [49] nella sintesi di nanoparticelle di rame (CuNP) secondo la:



Le nanoparticelle ottenute hanno una dimensione di 2-10 nm , mentre la soluzione di partenza del rame è di 0,0147 nM di Cu^{2+} e 7,062 mM di idrazina.

Un'altra tipologia sono gli agenti riducenti organici, che, in alcuni casi si comportano anche da agenti surfattanti, come l'idrochinone, alcol secondari, acido ascorbico, acido gallico, citrati , ecc.[50]

Nanoparticelle di rame sono state ottenute utilizzando dell'acido ascorbico per ridurre una soluzione di CuSO_4 , secondo la:



Variando parametri come pH, temperatura e concentrazione dell'acido, si ottengono morfologie diverse.[51]

La variazione del pH , produce nanoparticelle di rame con diverse dimensione e morfologia, utilizzando come agente riducente NaBH_4 , il pH ottimale per ottenere particelle con dimensione da 1,5 a 3 nm, è un pH di 11, a valori più bassi il Cu tende ad agglomerare , mentre a valori maggiori si ottengono particelle di dimensioni più elevate.

Nel caso dell'acido ascorbico come agente riducente, si nota una diminuzione della dimensione incrementando il pH da 3 a 6,5 ; questo è dovuto al maggior effetto riducente dell'acido ascorbico a valori di pH più alti.

Anche la temperatura di reazione è un parametro fondamentale, utilizzando l' NaBH_4 , non si ha la formazione di nano particelle a temperature inferiori ai 50°C , mentre a 60°C la formazione delle nano particelle di rame avviene con una dimensione media di 30 nm ; a 70°C le dimensioni aumentano fino a 70 nm.

Utilizzando l'acido ascorbico come riducente, la variazione di temperatura non influisce sulla dimensione delle particelle , ma passando da 85°C a 60°C si ha la progressiva formazione di Cu_2O . [52]

3.5.1.2 GREEN METHOD

I termini come “Greentech” e “Cleantech” sono ormai utilizzati comunemente, la maggiore attenzione rivolta all’inquinamento dei processi produttivi, ha spinto a ricercare processi sempre più ecosostenibili.

Inoltre i prodotti emergenti hanno bisogno di cambiare metodi produttivi sia per abbassare i costi di produzione e per trovare materie prime meno costose.

Per tutte le precedenti ragioni, la “green nanotechnology” è definita come una tecnologia per produrre nano particelle o nano materiali utilizzando processi biologici, che coinvolgono l’utilizzo di microbi, piante, virus o loro prodotti come: proteine e lipidi. Oggigiorno, sono stati ottimizzati metodi per creare nanoparticelle green, con una ben definita composizione chimica, dimensione e morfologia.

Molte piante contengono sostanze organiche con proprietà riducenti e stabilizzanti (capping agents), per la produzione di nano particelle metalliche, queste possono essere: polifenoli, acidi fenolici, alcaloidi, zuccheri, terpeni, ecc. La conformazione e concentrazione di queste sostanze determinano la dimensione e la forma delle nano particelle prodotte.

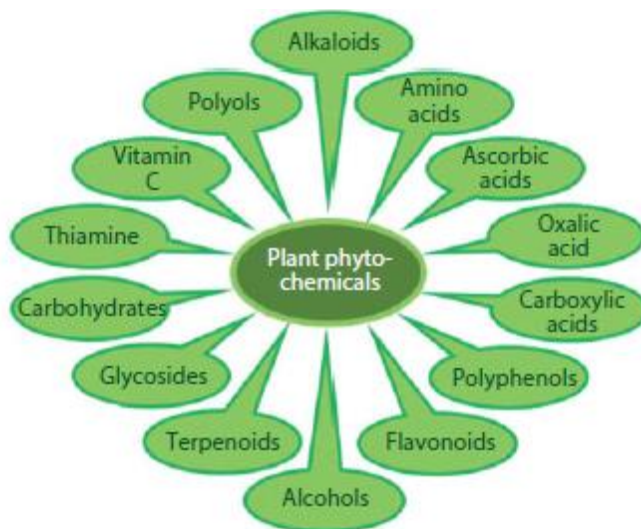


Fig 3.11 sostanze organiche presenti nelle piante, che intervengono nei processi di riduzione delle NP

La sintesi delle NP utilizzando estratti di piante avviene semplicemente, l’estratto della pianta e la soluzione contenente gli ioni metallici vengono mescolate e dopo un certo tempo si assiste ad una variazione del colore della soluzione, indice che la reazione di riduzione è in corso. Questa sintesi può essere divisa in 3 parti:

1. Attivazione: gli ioni metallici entrano in contatto con le molecole organiche, causando una variazione del loro stato di ossidazione mono o divalente, ad uno stato di ossidazione pari a zero
2. Crescita: gli atomi metallici coalescono tra loro, aumentando il volume della NP, assumendo morfologie diverse (cubi, sfere, esagono, ecc.) variando la stabilità termodinamica.
3. Terminazione: la NP raggiunge una dimensione stabile arrestando l’aumento del volume, grazie anche agli agenti stabilizzatori contenuti nell’estratto della pianta.

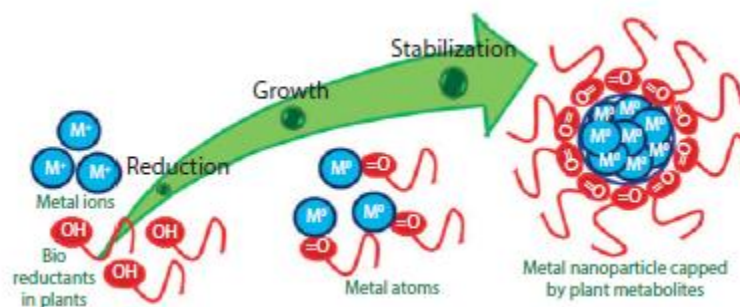


Fig 3.12 processo di sintesi della NP

I parametri come il pH e la temperatura sono molto importanti per il prodotto finale, il primo causa un'alterazione di carica superficiale dell'agente riducente, variando la capacità di chelazione e riduzione dello ione metallico e di conseguenza altera la morfologia e la dimensione della NP prodotta.

La temperatura altera le proprietà della NP durante il processo di sintesi, alte temperature incrementano la cristallinità della NP sintetizzata e la velocità di nucleazione delle stesse.[53]

L'agente riducente utilizzato in questo lavoro è l'acido tannico, è stato largamente studiato per le sue proprietà antiossidative, antimutageniche e anticancerogene. Il glucosio occupa la posizione centrale nella struttura del polifenolo, ed ai gruppi ossidrilici, sono attaccati uno o più gruppi derivanti dall'acido gallico.

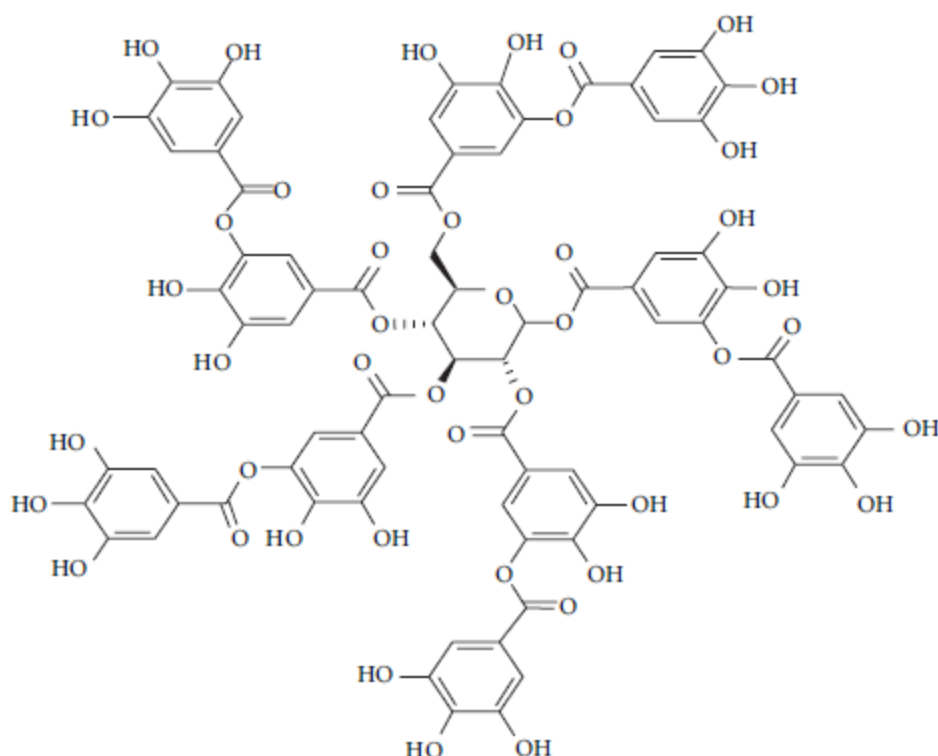


Fig 3.13 struttura molecolare dell'acido tannico ($C_{76}H_{52}O_{46}$)

Al suo pH naturale, acido, presenta un basso potere riducente, mentre a pH alcalini, i gruppi gallici sono in grado di ridurre gli ioni argento in soluzione, ma hanno allo stesso

tempo uno scarso potere stabilizzante, portando alla formazione di aggregati in soluzione. Il glucosio invece presenta buone capacità stabilizzanti a pH alcalini, queste caratteristiche rendono l'acido tannico ideale sia come riducente che come stabilizzante a pH alcalini.

I gruppi fenolici prendono parte alla riduzione formando chinoni e donando elettroni.

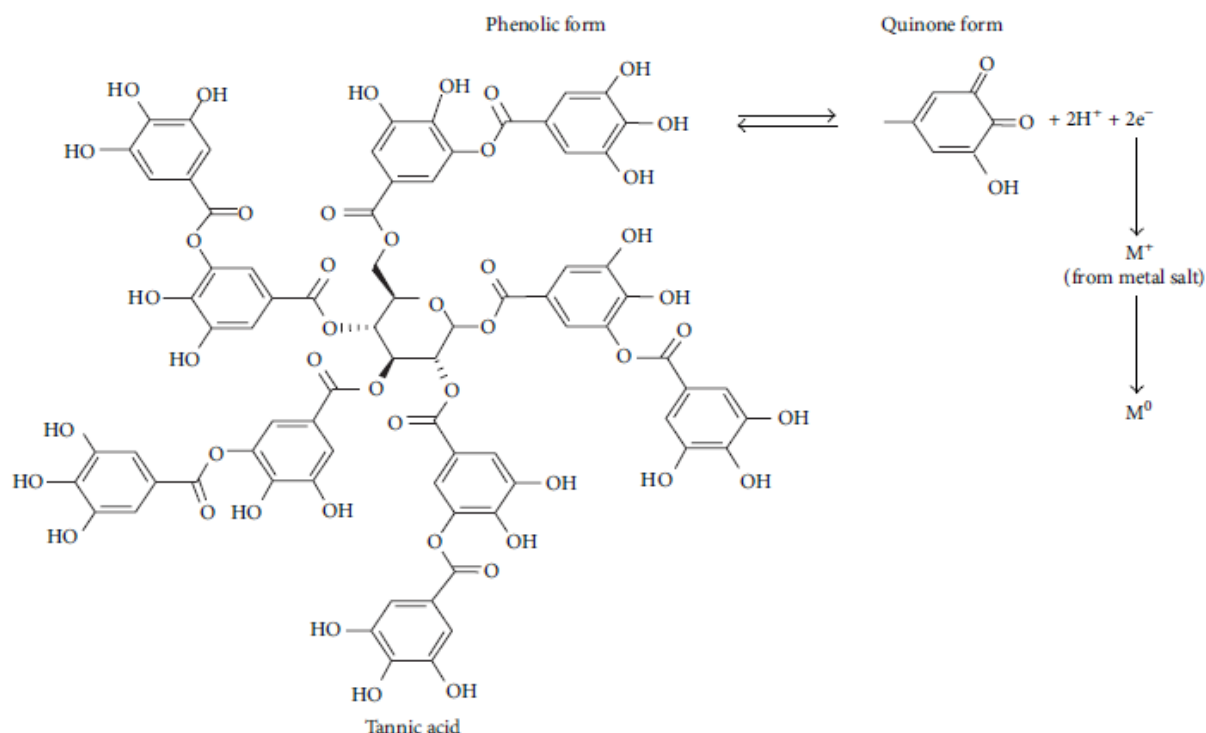


Fig 3.14 meccanismo di reazione dell'acido tannico come riducente degli ioni metallici, i gruppi fenolici vengono ossidati a chinoni cedendo gli elettroni agli ioni metallici in soluzione [54]

3.5.2 NANOPARTICELLE DI RAME

Negli ultimi anni le nanoparticelle di rame (CuNP) hanno attirato l'attenzione per via del loro basso costo rispetto alle nanoparticelle d'oro e d'argento, ma anche per le loro qualità catalitiche e conducibilità elettrica superiore. Le CuNP possono essere sintetizzate usando tecniche fisiche (ball milling, physical vapour deposition) e chimiche (liquid-phase chemical reduction, chemical deposition, elettrochemical and hydrothermal methods).

I metodi biologici per ottenere le CuNP risultano più favorevoli in termini energetici, e inoltre non producono sostanze inquinanti, questo tipo di NP sono ottimi

Antimicrobici: sono stati testati come inibitori di crescita su *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, con buoni risultati.

Antinfiammatori: inibiscono la denaturazione delle proteine, causa del processo infiammatorio, soprattutto dell'albumina (il potere inibitorio della denaturazione dell'albumina del CuNP è del 88,54% mentre quello dell'aspirina classica è del 94,23%), limitano il rilascio di neutrofili nel sito di infiammazione.

Antidiabetici: inibiscono enzimi come l' α -amilasi e α -glicosidasi, rallentando la digestione dei carboidrati e riducendo i picchi glicemici dopo i pasti. [55]

Antitumorali: utilizzati sia come NP che come "carrier" queste nanoparticelle hanno dimostrato ottime proprietà antitumorali, come nano particelle di ossido di rame (CuO NP) sono studiate per combattere il cancro al seno, mentre nanoparticelle di

dietiltiolo carbamato di Cu ($\text{Cu}(\text{DDC})_2$) sono state studiate per combattere il cancro alla prostata e prevenire metastasi.[56]

Solfato di Rame (CuSO_4), cloruro di rame (CuCl_2) e acetato di rame ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), sono utilizzati di solito come precursori delle CuNP, con determinate procedure per ottenere il prodotto voluto, gli agenti riducenti più utilizzati sono: NaH_2PO_2 , N_2H_4 e NaBH_4 , naturalmente il metodo di sintesi ed il riducente utilizzato influenzerà le proprietà delle CuNP ottenute.[57]

Di seguito una tabella i risultati ottenuti con varie sostanze chimiche

Cu salt	Reducing Agent	Capping agents pH agents	Dimension	Shape	UV-Vis
Copper(II) sulphate pentahydrate	2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate	Na_2CO_3 Methanol	15–30 nm	Nearly spherical	380 nm
Copper(II) sulphate pentahydrate	Hydrazine	Ascorbic Acid Chitosan NaOH	35–75 nm	Sferical	589 nm
Copper(II) sulphate pentahydrate	Ascorbic acid		45 nm	Sferical	266 nm— 100°C 269 nm— 300°C
Copper(II) chloride	Hydrazine hydrate	Sodium dodecyl sulphate Ammonia solution	15–100 nm	Sferical	566 nm
Copper(II) nitrate	Cetyl trimethyl ammonium bromide	Isopropyl alcohol	16 nm	Spherical	551 nm
			23 nm	Hexagonal	572 nm
			37 nm	Spherical	553 nm
Copper(II) sulphate pentahydrate	Sodium borohydride	Ascorbic acid Polyethylene glycol	4–10 nm	Spherical	562 nm
Copper(II) sulphate pentahydrate	Sodium borohydride	Ascorbic acid Sodium hydroxide	10 nm	Cubic	320 nm

Tab 3.1 Riduzione dei Sali di Cu tramite diverse sostanze chimiche , dimensioni e forme ottenute e picchi nello spettro UV-VIS

Per finalità mediche si preferisce utilizzare metodi di riduzione che rilasciano meno sostanze tossiche, i principali agenti riducenti consistono in estratti di piante fatte reagire con diversi sali di Rame.

Used Substances	Size	Shape	UV-VIS References
Copper(II) sulphate pentahydrate Citrus lemon fruits	28 nm	Spherical	579 nm
Extract of <i>O. sanctum</i> leaves Copper(II) sulphate pentahydrate	122.7 nm	Spherical	586 nm
Extract of <i>Rhuscoraria</i> L. fruits extract Copper(II) sulphate pentahydrate	70 nm	Spherical	568 nm
Extract of the flower <i>Milletta pinnata</i> Copper acetate solution	23-1.1 nm	Spherical	378 nm
Leaf extract of <i>Ageratum houstonianum</i> Mill. Copper(II) chloride	80 nm	Cubic, hexagonal, rectangular	326 nm
Green tea extract Copper(II) chloride 15–	30 nm	Spherical	580 nm
<i>Ginko biloba</i> L. leaf Copper(II) chloride	15–20 nm	Spherical	560–580 nm
<i>Magnolia kobus</i> leaf Copper sulphate pentahydrate	45–110 nm	Spherical	560 nm
<i>Syzygium aromaticum</i> bud Copper(I) acetate	12 nm	Spherical	580 nm
<i>Azadirachta indica</i> leaf Copper(II) chloride	48 nm	Cubic	560 nm
Ripened <i>Duranta erecta</i> fruit Copper(II) sulphate pentahydrate	76 nm	Spherical	588 nm
<i>Tilia</i> extract Copper(II) sulphate pentahydrate	27.6 nm	Spherical	563 nm
<i>Punica granatum</i> peel Copper(II) sulphate pentahydrate	15–20 nm	Spherical	585 nm
Copper(II) sulphate pentahydrate Cetyl trimethyl ammonium bromide Extract of seedless dates	78 nm	Spherical	576 nm

Tab 3.2 Formazione di CuNP tramite Green Reduction

4 AZIONE CATALITICA E FOTOCATALITICA DELLE NANOPARTICELLE DI RAME E DEI SUOI OSSIDI

4.1 INTRODUZIONE

Le reazioni catalitiche omogenee utilizzando metalli, sono state ampiamente utilizzate in passato, ma questo tipo di reazioni sono risultate costose e poco ecosostenibili.

Nell'ultima decina di anni, sono stati utilizzati metalli del gruppo IB (Au, Ag, Cu, ecc) per reazioni catalitiche eterogenee, che risultano meno costose ed eco solidali; questi tipi di metalli inoltre, presentano dei picchi di assorbimento nel range della luce visibile, dovuta alla loro risonanza plasmonica superficiale (LSPR).

L'esposizione ad un determinato valore della luce visibile, causa un'eccitazione elettronica, che trasferisce energia alle molecole adsorbite sul metallo, causando una trasformazione chimica delle stesse.

4.2 NANOPARTICELLE DI RAME

Il rame è il meno caro dei metalli del gruppo IB, ma le nano particelle tendono ad ossidarsi molto velocemente.

E' stato dimostrato che il nitrato di titanio (TiN) può prevenire l'ossidazione del nano particelle di rame CuNP [58], il processo prevede l'aggiunta di nano particelle di TiN di circa 30 nm ed aumentare la temperatura a 300°C in ambiente saturo di H₂.

Questo tipo di nano particelle riescono a catalizzare la reazione di epossidazione degli alcheni, con conseguente formazione di aldeidi.

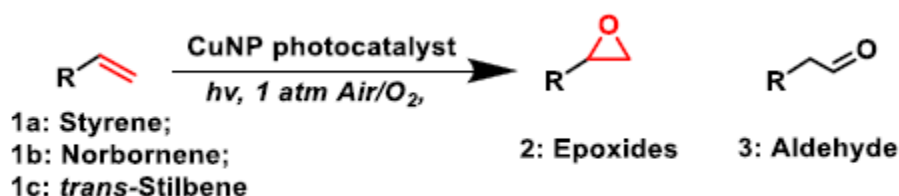


Fig 4.1 Reazione di catalisi di gruppi epossidici da alcheni

La reazione è possibile grazie all'interazione del legame π con gli orbitali del rame, abbassando l'energia del livello LUMO non occupato ed aumenta il livello dell'orbitale occupato HOMO, questo è dovuto alla formazione di un complesso tra gli orbitali d del rame e degli orbitali π alchenici.

Le CuNP possono inoltre interagire con altre soluzioni ossidanti (H₂O₂), aumentando il rendimento della reazione.

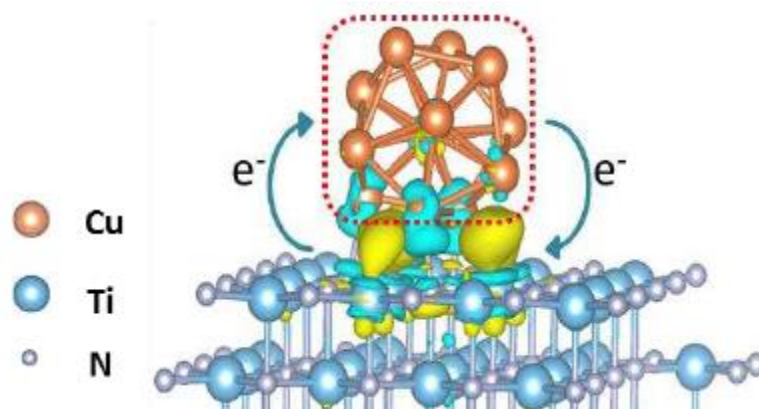


Fig 4.2 Struttura e densità di carica del CuNP /TiN

4.3 REAZIONE DI FOTOCATALISI DI OSSIDI DI RAME (CuO e Cu₂O)

Le NP di rame presentano un picco di assorbimento ad una lunghezza d'onda pari a 580 nm, mentre le CuO NP hanno un picco a 260nm, le particelle possono essere paragonate ad un semiconduttore di tipo p con una band gap di 1,76 eV a temperatura ambiente.

Le NP di Cu₂O hanno anch'esse proprietà foto catalitiche e possono essere associate ad un semiconduttore di tipo p con una band gap di 2,17 eV, proprietà foto catalitiche e nessuna tossicità [59].

Studi recenti hanno dimostrato la capacità delle NP di Cu₂O di degradare il p-cloronitrobenzene [60].

Sono state utilizzate diverse morfologie di Cu₂O per degradare il colorante rosso congo, dove si è evidenziato che i piani 111 presentano un'area superficiale maggiore e sono più attivi nel processo di fotodegradazione rispetto ai piani 100.[61]

Microsfere di Cu₂O ricoperte da nano particelle di Cu sono state utilizzate per foto degradare il blu di metilene, la lunghezza d'onda utilizzata è di 565 nm e permette la fotodegradazione del blu di metilene dell'88% in 60 minuti, grazie alle nano particelle di Cu che assorbendo maggiormente la luce visibile, trasferiscono più energia, per effetto SPL, al Cu₂O il quale produce elettroni (e-) e vacanze (h+) [62].

Nanoparticelle ZnO e TiO₂ presentano buone proprietà fotocatalitiche soprattutto per rimuovere gli inquinanti organici difficilmente biodegradabili (POPs), queste due categorie di nano particelle possono ossidare e quindi degradare composti organici con alto tasso di azoto, molecole organiche aromatiche, pesticidi, ecc. per queste ragioni sono ottimi candidati per eliminare inquinanti dalle acque reflue [63].

Lo ZnO, un semiconduttore di tipo n, presenta una band gap di 3,37 eV corrispondente ad un assorbimento vicino allo spettro UV, anche il TiO₂ presenta un'assorbimento efficace a valori minori di 388 nm che corrisponde al 3-5% dello spettro solare [64]. L'utilizzo di lampade UV è sia dispendioso in termini economici che potenzialmente pericoloso per l'ambiente, dato che utilizza vapori di Hg.

Per ovviare a questo problema si è sintetizzato un composto ternario Cu/Cu₂O/ZnO, che un'azione foto catalitica nello spettro della luce visibile. La radiazione elettromagnetica

incidente genera elettroni nella banda di conduzione del Cu₂O (semiconduttore di tipo P) che vengono trasferiti nella banda di conduzione dello ZnO (semiconduttore di tipo N)

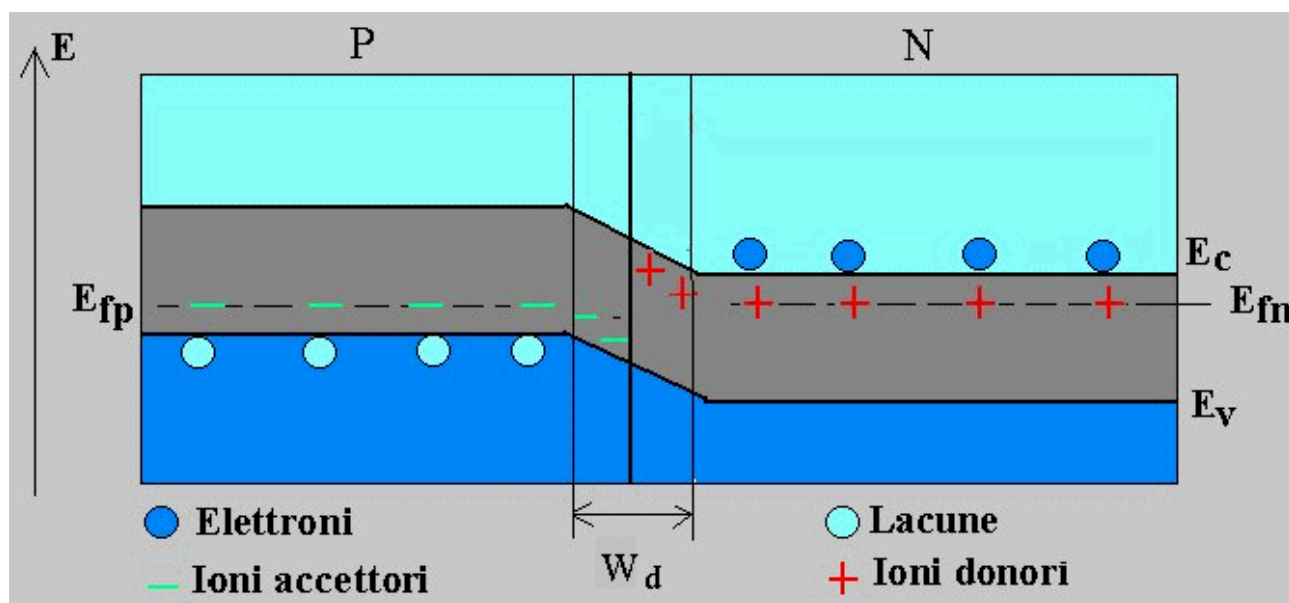


Fig 4.3 schema di una giunzione P-N

Il Cu gioca un ruolo fondamentale producendo elettroni, grazie all'effetto SPR che possono essere trasferiti nella banda di conduzione dello ZnO, questo composto ternario è stato utilizzato per degradare il blu di metilene in soluzione acquosa utilizzando solo luce visibile [65].

5 MATERIALE E METODI

Questo lavoro di tesi riguarda un processo green di riduzione in situ di nano particelle di rame sulla superficie della Clinoptilolite, una zeolite naturale. Lo studio si basa sulle conoscenze acquisite da un precedente lavoro del gruppo di ricerca in cui si è utilizzato l'acido tannico per ridurre in situ sempre sulla Clinoptilolite nano particelle d'argento [66]

Dopo la funzionalizzazione della clinoptilolite con l'acido tannico, questa è stata immersa, a temperatura ambiente e con agitazione meccanica, con diverse soluzioni contenenti 3 tipologie di sali di rame:

- Acetato di rame
- Solfato rameico
- Nitrato rameico

I campioni ottenuti sono stati analizzati utilizzando diverse tecniche (FESEM, EDS, XRD), al fine di verificare la riduzione del rame. Per valutare la formazione delle nanoparticelle di rame o ossido di rame, si è anche analizzata la reazione tra acido tannico e Sali di rame in soluzione, valutando l'influenza di parametri quali la temperatura, il pH e il tempo di reazione sulle caratteristiche morfologiche delle nano particelle e sul loro grado di riduzione.

5.1 MATERIALI

La clinoptilolite proviene dall'Inghilterra precisamente da Heiltropfen Lab, l'acido Tannico (TA) e l'acido gallico (GA) sono utilizzati come agenti riducenti, per variare il pH sono stati utilizzati NaOH e K_2CO_3 , mentre come sali di rame sono stati utilizzati $CuSO_4$, $Cu(NO_3)_2$ e $Cu(CH_3COO)_2$, tutti i reagenti sono stati acquistati da Merck (Darmstadt, Germania)

5.2 PREPARAZIONE DELLA CLINOPTILOLITE

La clinoptilolite viene preliminarmente ridotta in polvere per mezzo di un mulino a sfere ad una frequenza di 20 Hz e per un tempo di 2 minuti.



Fig 5.1 a) Clinoptilolite grezza b) mulino a sfere utilizzato per macinare la clinoptilolite

La polvere ottenuta viene lavata con H_2O , per rimuovere eventuali contaminanti e centrifugata 12000 RPM per 5 minuti, questa operazione viene ripetuta per 3 volte.

5.3 RIDUZIONE NANOPARTICELLE DI RAME CON ACIDO TANNICO

5.3.1 RIDUZIONE CON DIVERSE CONCENTRAZIONI DI ACIDO TANNICO E DIVERSI PH

Per comprendere meglio il grado di riduzione delle nano particelle di rame con l'acido tannico, sono state eseguite delle misure utilizzando due diversi Sali di rame $CuSO_4$ e $Cu(NO_3)_2$, diverse concentrazioni di acido tannico 0,006M e 0,026M e diversi pH 8,5 e pH11:

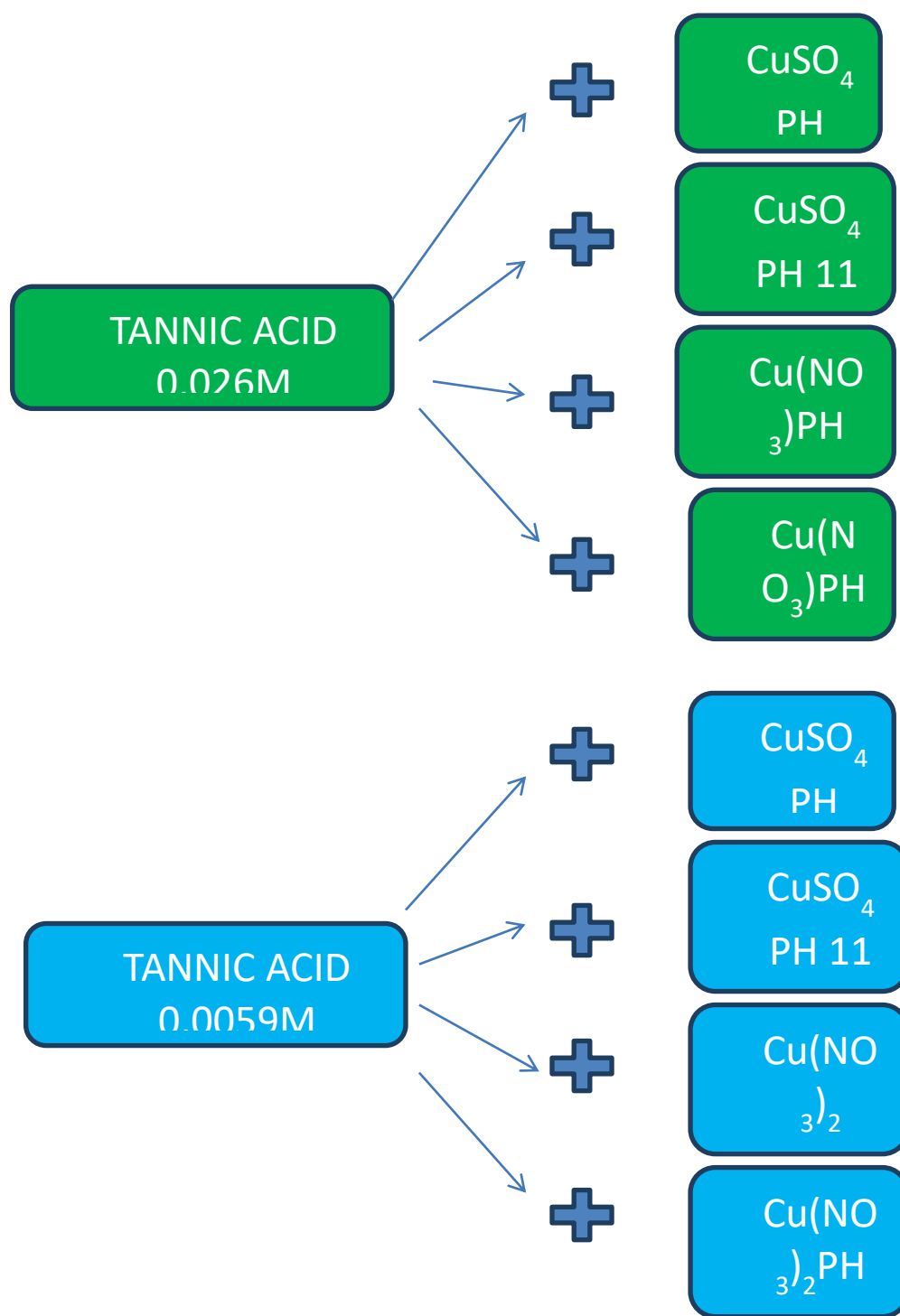


Fig 5.2 diverse prove di riduzione delle nano particelle di rame utilizzando diverse condizioni

Oltre a variare le concentrazioni, ulteriori prove di riduzione delle nano particelle di rame sono state eseguite variando parametri come la temperatura e il tempo di reazione dell'acido tannico in soluzione con il rame.

5.3.2 REAZIONE VARIANDO I TEMPI DI REAZIONE E LA TEMPERATURA

Il sale di rame scelto per la sperimentazione è il CuSO_4 0,1M mentre la soluzione di acido tannico utilizzata ha concentrazione pari a 0,026M. Per la prima sperimentazione la soluzione è stata scaldata per 3 h ad una temperatura di 60°C , mentre la seconda sperimentazione è avvenuta a temperatura ambiente, ma è stata sottoposta ad agitazione meccanica per 24 ore.

5.4 FUNZIONALIZZAZIONE CLINOPTILOLITE CON ACIDO TANNICO

A 600mg di clinoptilolite vengono aggiunti 20 ml di acido tannico 0,006M, il pH iniziale è di 4.08, la soluzione viene quindi tamponata con K_2CO_3 0,1M fino ad un pH di 8.5 per deprotonare i gruppi ossidrilici dell'acido tannico e permettere la funzionalizzazione. Il processo di funzionalizzazione viene realizzato a temperatura ambiente per 3 ore, agitando la soluzione meccanicamente tramite un roller.

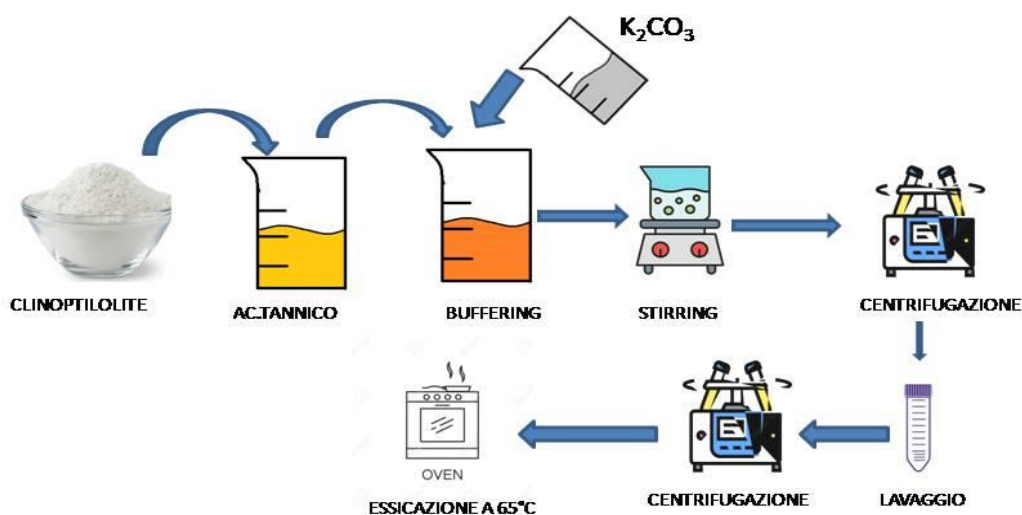


Fig 5.3 schema del processo di funzionalizzazione della clinoptilolite con acido tannico

Sucessivamente la clinoptilolite viene lavata e centrifugata a 12000 RPM con H_2O bi-distillata ed essiccata a 65°C fino ad eliminazione di ogni traccia d'acqua.

5.5 SINTESI DI NANOSTRUTTURE DI RAME LEGATE ALLA CLINOPTILOLITE-ACIDO TANNICO

I Sali di rame utilizzati sono:

- Acetato rameico $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0,1M
- Nitrato rameico $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,1M
- Solfato rameico CuSO_4 0,1M

A 200mg di Clinoptilolite+acido tannico vengono aggiunti 10ml di soluzione di Sali di rame 0,1 M e il pH viene portato a 8.5 utilizzando K_2CO_3 ; la soluzione viene lasciata in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente in assenza di luce, vista la fotosensibilità dell'acido tannico, successivamente viene centrifugata lavata e fatta asciugare in forno a 65°C

5.6 FUNZIONALIZZAZIONE CON ACIDO GALLICO

Lo stesso protocollo è stato eseguito utilizzando l'acido gallico a due diverse concentrazioni (1 mg/mL e 10 mg/mL). Le soluzioni sono state tamponate con K_2CO_3 fino a raggiungere un pH di 8.5 e successivamente lasciate reagire per 3 ore a temperatura ambiente.

L'avvenuta funzionalizzazione della clinoptilolite con l'acido gallico è evidente e dal saggio colorimetrico Folin&Ciocalteu.

Il test di Folin-Ciocalteu (F&C) viene impiegato per la quantificazione del contenuto totale di polifenoli. Si basa su una reazione redox tra il reagente di Folin-Ciocalteu (acido fosfomolibdico e acido fosfotungstico) e i polifenoli: questi ultimi riducono gli acidi, determinando la formazione di ossidi di molibdeno e tungsteno, responsabili della caratteristica colorazione blu. L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione di polifenoli e viene misurata tramite spettrofotometro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Giappone) a 760 nm. I valori di assorbanza sono stati convertiti in concentrazione utilizzando una curva di calibrazione basata sull'acido gallico (GA). Per questo studio, il test è stato condotto sulle polveri di zeoliti funzionalizzate con la concentrazione più alta di GA (10 mg/mL).

In accordo con il protocollo, lavorando sotto cappa a flusso laminare, ciascun campione è stato posto in un contenitore scuro con 8 mL di acqua bidistillata, 0,5 mL di reagente F&C e 1,5 mL di Na_2CO_3 (20% p/v in acqua bidistillata), lasciando reagire per 2 h. Allo stesso modo, sono state analizzate le soluzioni di uptake, aggiungendo a 2 mL di soluzione di funzionalizzazione, 6 mL di acqua bidistillata, 0,5 mL di reagente F&C e 1,5 mL di Na_2CO_3 . Una prima conferma della presenza di polifenoli è data dalla colorazione blu della soluzione. Successivamente, le soluzioni ottenute sono state analizzate tramite spettrofotometro UV a 760 nm. [67]

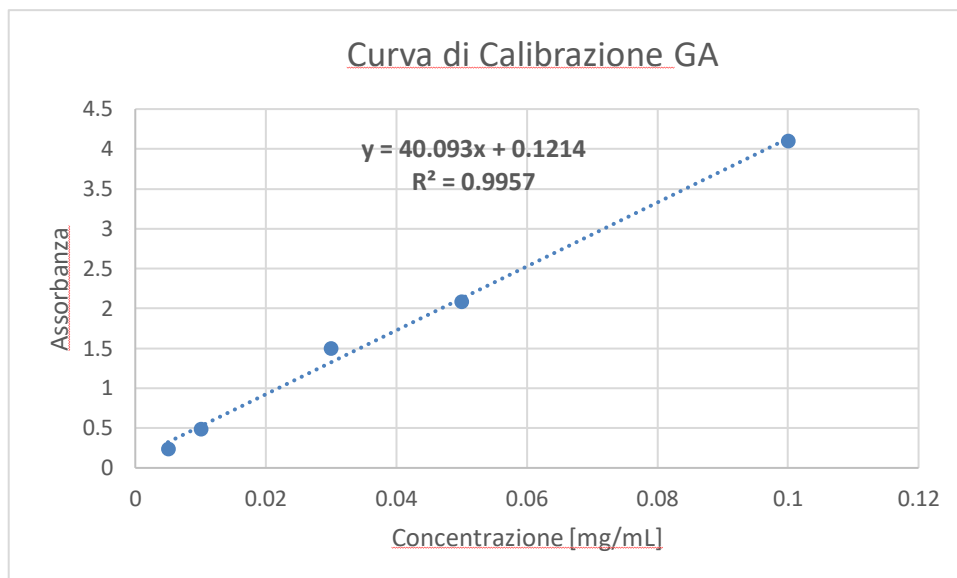


Figura 5.4. Curva di Calibrazione di GA

5.7 SINTESI DI NANOSTRUTTURE DI RAME LEGATE ALLA CLINOPTILOLITE-ACIDO GALLICO

La polvere di clinoptilolite funzionalizzata con acido gallico è stata immersa in una soluzione acquosa 0.1 M di CuSO_4 . Il pH è stato successivamente regolato a 11 mediante aggiunta di NaOH e la soluzione è stata lasciata reagire per 3 h a temperatura ambiente.

5.8 METODI DI CARATTERIZZAZIONE

La caratterizzazione morfologica è stata eseguita utilizzando un microscopio elettronico a scansione di campo (FESEM-EDS SUPRATM 40, Zeiss and Merlin Gemini Zeiss) equipaggiato con una sorgente a raggi X Energy Dispersive X-ray Spectrometry (FESEM-EDS SUPRATM 40, Zeiss and Merlin Gemini Zeiss and MIRA3 XMH, TESCAN), un microscopio elettronico a trasmissione (HR-TEM, Talos ThermoScientific) con un e-gun di LaB6, operante a 200 kV. La struttura cristallina è stata studiata utilizzando un diffrattometro a raggi X (XRD, Bragg–Brentano X'pert Philips diffractometer), utilizzando una geometria di camera Bragg Brentano e una radiazione incidente corrispondente al Cu-K α , il range 2θ è compreso tra 30° e 90° . I legami molecolari sono stati studiati grazie ad uno spettrofotometro a trasformata di Fourier (ATR-FTIR, Nicolet iS 50 Spectrometer ThermoScientific, Milan, Italy) e ad uno spettrofotometro UV-VIS (UV-VIS spectrophotometer UV-2600 Shimadzu).

5.9 TEORIA DEI PROCESSI CARATTERIZZANTI

5.9.1 SEM (MICROSCOPIO A SCANSIONE ELETTRONICO)

La microscopia elettronica sfrutta l'interazione tra un fascio di elettroni e gli atomi che compongono il campione. L'utilizzo degli elettroni permette di superare il limite risolutivo della microscopia ottica tradizionale, permettendo di raggiungere risoluzioni nanometriche.

Il SEM permette di ottenere una maggiore profondità di campo e, utilizzando un detector EDS, tecnica spiegata successivamente, permette di ottenere informazioni composizionali del campione.

Il SEM è costituito da alcuni da diversi componenti essenziali:

- Sorgente di elettroni: che si suddividono in termoioniche o ad emissione di campo.

La prima sfrutta l'effetto termoionico, ovvero l'emissione di elettroni quando la sorgente viene scaldata, questa è composta o da esaboruro di lantanio (LaB_6) o esaboruro di cerio (CeB_6).

Le sorgenti ad emissione di campo (FEG), dove l'emissione degli elettroni è causata da un forte campo elettrico esterno, permettono di ottenere risoluzioni più elevate rispetto alle sorgenti termoioniche, questo perché le dimensioni del fascio generato sono già molto ridotte, circa 10 nm, quindi non c'è bisogno di un'ulteriore sistema di focalizzazione. L'emissione di elettroni avviene senza bisogno di fornire calore, dunque la temperatura di lavoro è quella ambiente e grazie all'effetto punta si possono ottenere campi elettrici molto elevati con potenziali modesti, ma questa configurazione necessita di un vuoto molto spinto ($P < 10^{-11}$ mbar), perché la punta si ossida facilmente.

- Una colonna costituita da lenti elettrostatiche o elettromagnetiche che permettono di focalizzare il fascio elettronico.
- Un porta campioni
- Un sistema di vuoto, che deve garantire un livello di vuoto adeguato per evitare che i fasci elettronici collidano con molecole di gas, con le quali andrebbero ad interagire, ottenendo immagini rumorose, non permettendo una risoluzione ottimale e rischiando la contaminazione del campione e il danneggiamento delle sorgenti.

I segnali utilizzati dal microscopio elettronico sono:

- elettroni retro diffusi (BSE): ovvero elettroni che nascono da un'interazione elastica tra gli elettroni del fascio e gli atomi costituenti il campione. I BSE permettono di ottenere un'immagine nella quale le scale di grigio è funzione della composizione del campione.

Le zone più scure corrispondono agli elementi con peso atomico più basso, mentre quelle chiare ad elementi a peso atomico maggiore, perché gli elettroni vengono maggiormente riflessi, restituendo un segnale maggiore.

- Elettroni secondari (SE): elettroni che vengono emessi in seguito a urti anelastici, nella quale parte dell'energia viene persa, per cui gli elettroni secondari presentano energie più basse rispetto agli elettroni retro diffusi. L'immagine ottenuta dagli

elettroni secondari, non fornisce informazioni composizionali, ma maggiori dettagli superficiali, restituendo un'immagine con caratteristiche tridimensionali.

- Raggi X: permettono di identificare gli elementi che costituiscono il campione.

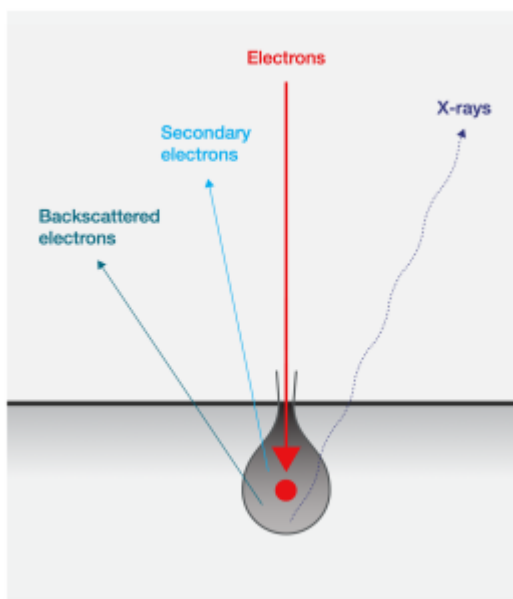


Fig 5.5 Interazione tra gli elettroni generati dal SEM ed il campione

Il microscopio a trasmissione elettronica (TEM) sfrutta la medesima tecnologia del SEM, ma gli elettroni attraversano il campione, che deve essere molto sottile, ~ 150 nm.

Gli elettroni vengono focalizzati da lenti elettromagnetiche e poi raccolti su uno schermo fluorescente.

Il TEM permette di ottenere immagini con risoluzioni quasi atomiche su campioni cristallini, questo perché minimizza la diffusione degli elettroni dovuti a fenomeni di back scattering ,

5.9.2 SPETTROFOTOMETRO A TRASFORMATATA DI FOURIER (FTIR)

La Spettrofotometria ad infrarosso a trasformata di Fourier (FT-IR) fornisce informazioni strutturali del materiale, attraverso l'interazione di una radiazione nel campo dell'infrarosso col materiale stesso. Mediante l'interpretazione dello spettro IR ottenuto è possibile:

- l'identificazione di gruppi funzionali all'interno di molecole o di strutture e come sono legati ad esse
- il riconoscimento dei materiali presenti, tramite comparazione con database
- valutare la resa e il tipo di prodotti formati al termine o durante una reazione.

E' una tecnica versatile sia per quanto riguarda materiali di natura organica che inorganica. E' indicato prevalentemente per analisi di tipo qualitativo. Lo strumento

permette analisi nel campo che cade tra il visibile e la regione delle microonde, con lunghezze d'onda comprese tra 0,74 μm e 300 μm .

Lo spettro IR viene generalmente suddiviso in tre regioni: vicino, medio e lontano IR, in relazione alla luce visibile.

Uno spettro IR, per convenzione, presentano nelle ascisse i numeri d'onda, ovvero il reciproco della lunghezza d'onda espresso in cm^{-1} :

$$W=1/\lambda \quad (5.1)$$

Dove W sono i numeri d'onda espressi in cm^{-1} , e λ è la lunghezza d'onda.

E' interessante notare come i numeri d'onda risultino proporzionali all'energia della radiazione tramite la:

$$E=hcW \quad (5.2)$$

Dove E è l'energia in Joules, h è la costante di Plank ($6,63 \cdot 10^{-34}$ Joules/sec), c è la velocità della luce ($3 \cdot 10^{10}$ cm/sec) e sono i numeri d'onda in cm^{-1} .

Le ordinate sono rappresentate dall'assorbanza, una unità adimensionale, che indica la quantità di radiazione assorbita dal campione, l'assorbanza è definita come:

$$A=\log(I_0/I) \quad (5.3)$$

Dove A è l'assorbanza, I_0 è l'intensità della radiazione incidente e I l'intensità della radiazione misurata, l'assorbanza è proporzionale alla concentrazione della soluzione tramite l'equazione seguente:

$$A=\epsilon lc \quad (5.4)$$

In questa equazione ϵ è l'assorbività molare o coefficiente di assorbimento molare, è una grandezza che dipende dal tipo di solvente, dalla lunghezza d'onda utilizzata e dalla specie chimica analizzata. l è il cammino ottico ovvero lo spessore della soluzione contenuta nella cuvetta espressa in cm, c è la concentrazione molare della soluzione misurata in mol/L.[68]

L'interazione della radiazione IR con le molecole causa una variazione dei movimenti vibrazionali, causando una variazione di dipolo. Ogni molecola presenta $3N-6$ modalità di movimenti vibrazionali, dove N rappresenta il numero di atomi della molecola e $3N-5$ in caso di molecole lineari.

Ad esempio una molecola d'acqua avrà: $3 \times 3 - 6 = 3$ moti vibrazionali

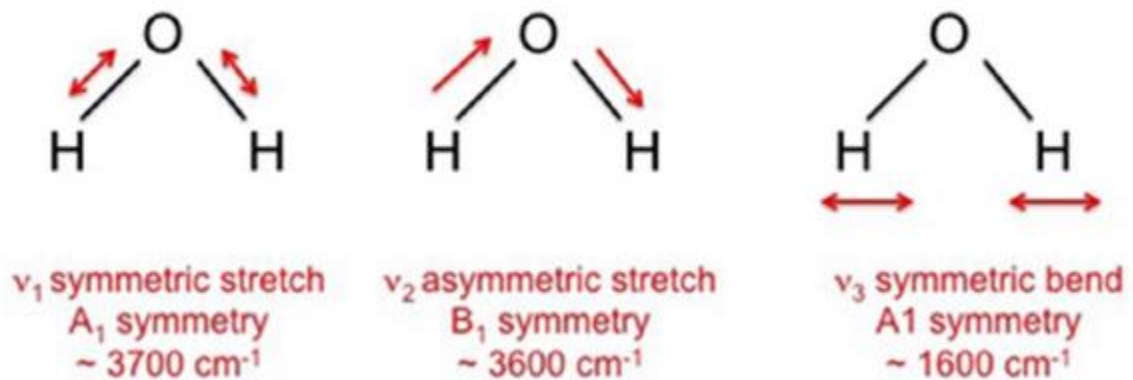


Fig 5.6 moti vibrazionali di una molecola d'acqua [69]

5.9.3 MICROANALISI EDS (Energy Dispersive X-ray Spettroscopy)

Questa tecnica consiste nell'analisi dei raggi X emessi dagli atomi del campione causata dall'interazione col fascio di elettroni emesso dal microscopio SEM. L'EDS è una tecnica comunemente utilizzata nella microscopia elettronica perché veloce, accurata e non distruttiva che consente di conoscere la composizione elementare del campione analizzato.

L'analisi che viene prodotta può essere sia dell'area che in quel momento viene ingrandita, oppure, fermando la scansione del fascio elettronico, di un punto di interesse sulla superficie del campione (microanalisi). Dato che la porzione di spazio eccitata dal fascio elettronico, che produce lo spettro X, è un intorno del punto di pochi micron, il SEM+EDS è un potente mezzo di indagine su solidi chimicamente disomogenei a scala microscopica.

5.9.4 TECNICA XRD

La diffrazione a raggi X (XRD - X-raydiffraction) è una tecnica analitica che fornisce delle informazioni sull'identificazione della struttura e delle fasi dei materiali cristallini.

La XRD può essere usata per identificare dei singoli cristalli e mostrare la loro struttura. I geologi considerano la tecnologia XRD particolarmente utile visto che può essere usata per identificare i cristalli presenti in una combinazione di elementi come i minerali nella roccia. Per i minerali con formule e strutture variabili come le argille, il metodo XRD è il migliore per la loro identificazione e la determinazione della loro proporzione in un campione.

Durante l'analisi XRD, un fascio a raggi X viene diretto verso un campione e l'intensità diffusa viene misurata in funzione della direzione in uscita. Per convenzione, l'angolo compreso tra le direzioni dei fasci in ingresso e in uscita viene denominato 2θ , o 2-theta.

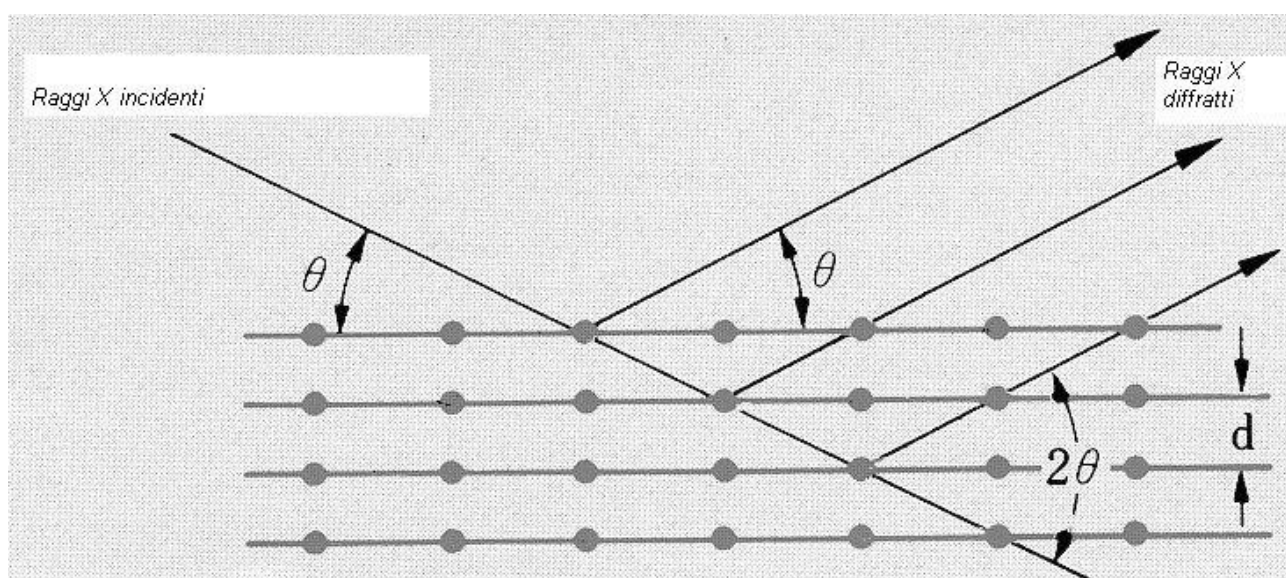


Fig 5.7 rappresentazione della diffrazione dei raggi X

In riferimento al campione più semplice possibile, costituito da piani di carica separati da una distanza d , viene osservata un'interferenza costruttiva (intensità diffusa maggiore) quando la Legge di Bragg viene soddisfatta: $n\lambda = 2d \sin \theta$.

5.9.5 UV-VIS

Le tecniche spettroscopiche sono basate sullo scambio di energia che si verifica fra l'energia radiante e la materia. In particolare, la spettrofotometria di assorbimento è interessata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm).

La legge che permette di calcolare la concentrazione del campione dal suo assorbimento è definita legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (5.5)$$

Dove:

A= Assorbanza

ϵ = coefficiente di estinzione molare (specifico per ogni sostanza)

d =cammino ottico (cm)

c = concentrazione (mol/l)

lo spettrofotometro utilizzato è uno a doppio raggio, che permette di azzerare l'effetto dovuto al solvente.

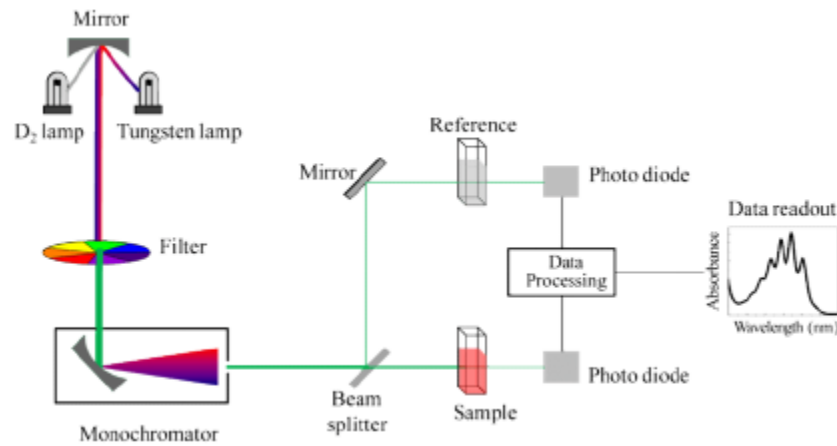


Fig 5.8 schema di uno spettrofotometro a doppio raggio

5.9.6 PROVE ANTIBATTERICHE

Sono state condotte delle prove per constatare, attraverso alone di inibizione, l'efficacia dell'effetto antimicrobico delle nanoparticelle di rame sulla superficie zeolitica.

Il ceppo batterico utilizzato è lo *Staphylococcus epidermidis*, un ceppo non patogeno, ma che fornisce indicazioni sull'effetto antibatterico del materiale.

Il primo step è preparare una soluzione contenente il ceppo batterico, per fare questo si prende una provetta di soluzione fisiologica sterile, adatta ad una valutazione torbidimetrica (BD PHOENIX ID BROTH) e si verifica mediante strumento ottico che l'indice di McFarland sia pari a 0.

Successivamente da una piastra, nella quale è stato cresciuto il ceppo batterico per 18-24 h, si preleva qualche colonia batterica e si introduce nella soluzione fisiologica sterile, si agita la soluzione e si valuta il valore di torbidità, che deve corrispondere a 0,5 McFarland che corrisponde ad una concentrazione di circa $1-2 \cdot 10^8$ di colonie formanti unità (CFU). [70]

Il test viene realizzato su una piastra agar, nella quale è cresciuto uniformemente il ceppo batterico, per ottenere questo si impregna un cotton-fioc nella soluzione 0.5 McFarland, in seguito il cottonfioc viene passato su una piastra MuellerHinton realizzando dei passaggi molto fitti. Al termine del primo passaggio la piastra viene ruotata di 45° e successivamente di 90° e si ripete la procedura; infine si passa il cotton-fioc sui bordi della piastra 2-3 volte.

I campioni, sotto forma di polvere, vengono pressati tramite un pastigliatore, affinché questi presentino le medesime dimensioni ed il risultato sia confrontabile.

Al termine della preparazione della piastra il campione da analizzare viene adagiato sulla piastra con la superficie antibatterica a contatto con la piastra (e quindi con i batteri) e il tutto viene incubato 20-24 h a 35°C . Al termine dell'incubazione si osserva e si misura

l'eventuale formazione di una alone (zona di inibizione) intorno al campione, all'interno della quale i batteri non hanno proliferato

6 SPERIMENTAZIONE

La funzionalizzazione della clinoptilolite con l'acido tannico è confermata mediante uno spettrofotometro operante nello spettro infrarosso (FTIR), [66].

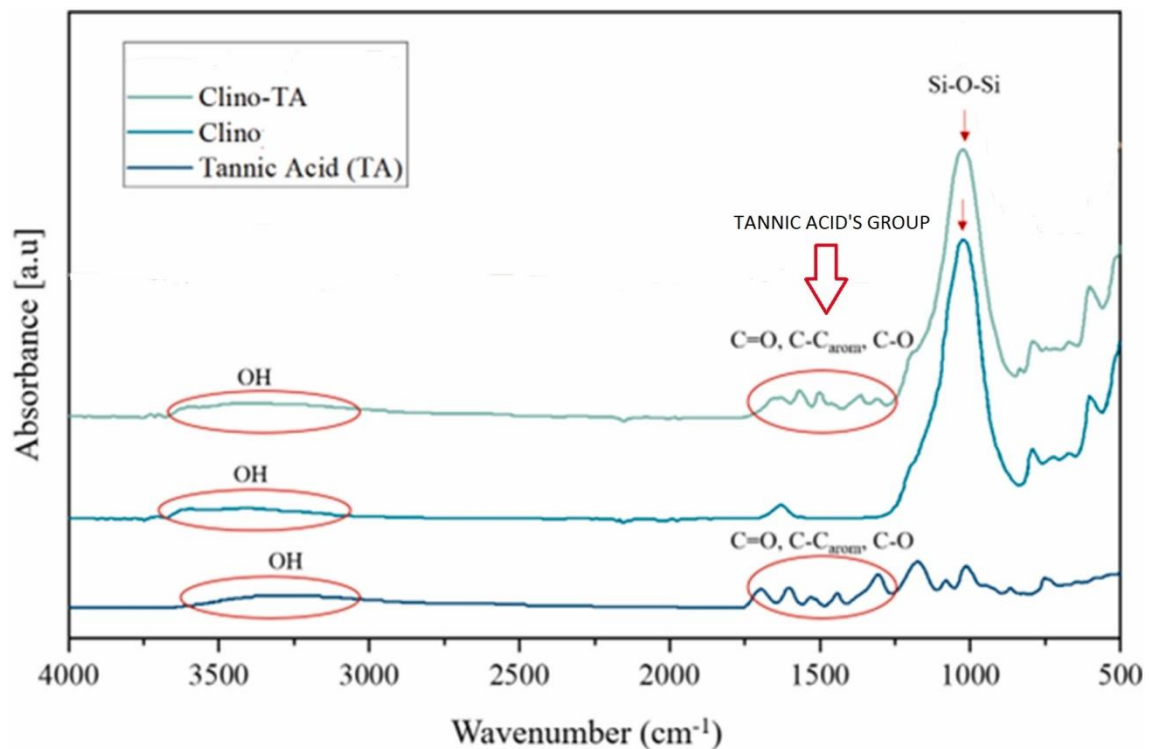


Fig 6.1 grafico FTIR che evidenzia la funzionalizzazione dell'acido tannico sulla superficie della clinoptilolite[66]

Lo spettro FTIR della Clino-TA evidenzia la presenza di gruppi C=O, C-C e C-O, presenti nell'acido tannico, il picco a 1085 cm^{-1} , caratteristico della clinoptilolite, è attribuito al legame Si-O-Si.

Per la sintesi delle nanoparticelle di rame, inizialmente sono stati impiegati 3 tipi di Sali di rame, per ottenere una riduzione in situ sulla superficie della clinoptilolite funzionalizzata con acido tannico.

Le concentrazioni delle specie chimiche, il pH (8,5) utilizzato per le reazioni di riduzione e il protocollo della reazione di funzionalizzazione sono tratte da [66]

I Sali di rame utilizzati sono:

Acetato rameico $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0,1M

Nitrato rameico $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,1M

Solfato rameico CuSO_4 0,1M

Mentre la concentrazione di acido tannico è di 0,006 M

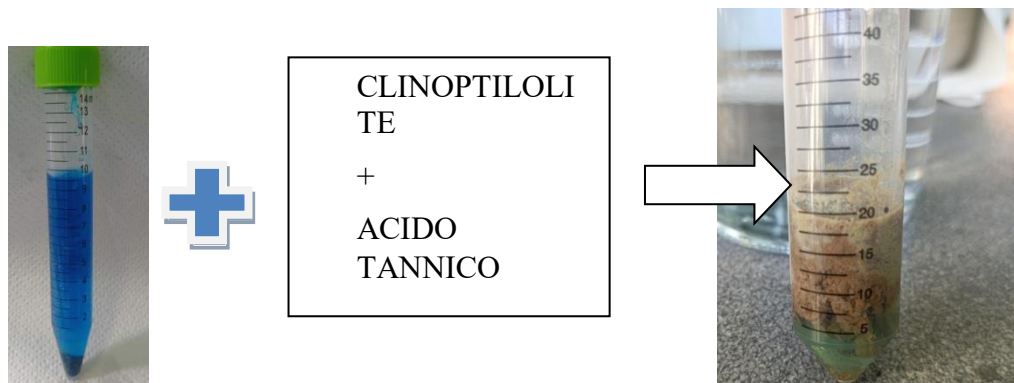


Fig6.2 la soluzione contenente rame dopo l'aggiunta della clinoptilolite funzionalizzata, forma un precipitato di colore marrone scuro, indice di una reazione di riduzione

6.1 ANALISI DELLA RIDUZIONE IN SITU DEL RAME SULLA SUPERFICIE DELLA CLINOPTILOLITE FUNZIONALIZZATA

Ad ogni 200mg di Clinoptilolite funzionalizzata con acido tannico vengono aggiunti 10ml di soluzione dei diversi tipi di Sali di rame con concentrazione 0.1M; le soluzioni vengono tamponate con K_2CO_3 0,1M fino ad un PH di 8,5 per deprotonare l'acido tannico e permettere la riduzione in situ, agitate per 3 ore a temperatura ambiente in assenza di luce, vista la fotosensibilità dell'acido tannico e successivamente centrifugate, lavate e fatte asciugare in forno a 65°C.

Dopo l'aggiunta della zeolite funzionalizzata, si forma subito una soluzione colloidale di colore marrone scuro, indice di una reazione tra le polveri funzionalizzate e la soluzione di Sali di Cu.

I campioni ottenuti vengono caratterizzati morfologicamente mediante un microscopio elettronico a scansione (FESEM). La polvere viene fissata su un supporto di tape di carbonio.

6.1.1 ANALISI MORFOLOGICA

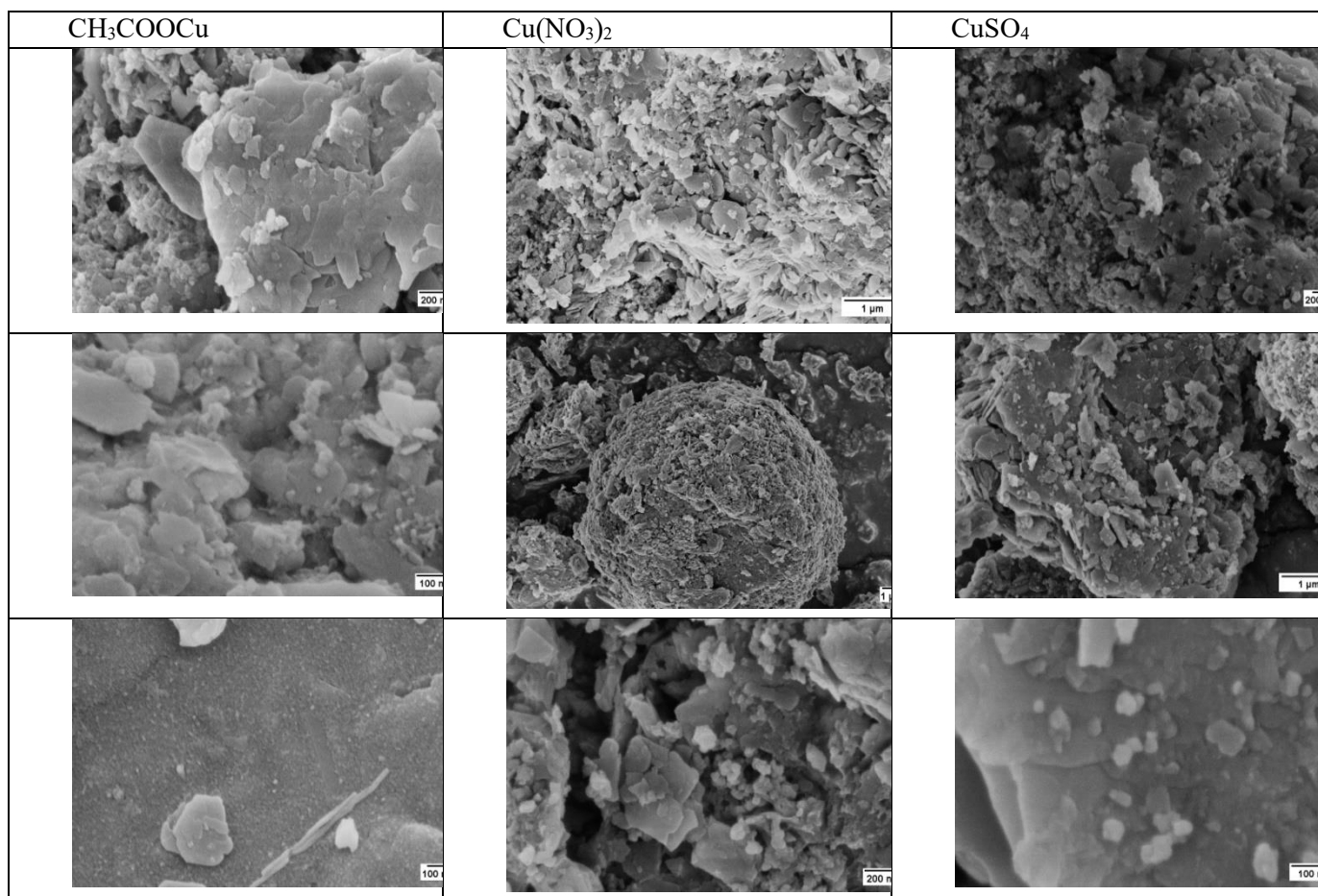


Fig6.3 immagini FESEM della clinoptilolite funzionalizzata dopo l'aggiunta dei Sali di rame

Le immagini della morfologia dei vari campioni ottenuti tramite il FESEM, mostrano delle nano particelle di varia forma, che risultano simili alle particelle della zeolite, risulta quindi complicato distinguere le nano particelle di rame.

Una misura EDS permette una caratterizzazione composizionale qualitativa identificando i vari elementi presenti sui campioni. Di seguito si riportano le analisi EDS effettuate, con uno spettro di esempio (fig 6.4) e l'analisi quantitativa degli elementi (fig 6.5).

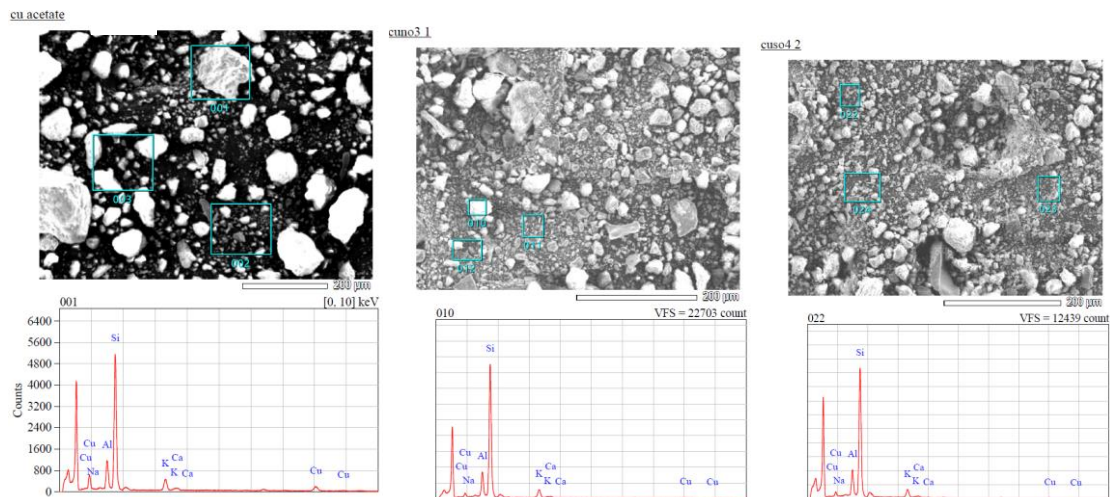


Fig.6.4 Analisi EDS ottenuti dalla reazione tra clinoptilolite funzionalizzata e 1) Acetato di rame 2) Nitrato di rame 3) Solfato di rame

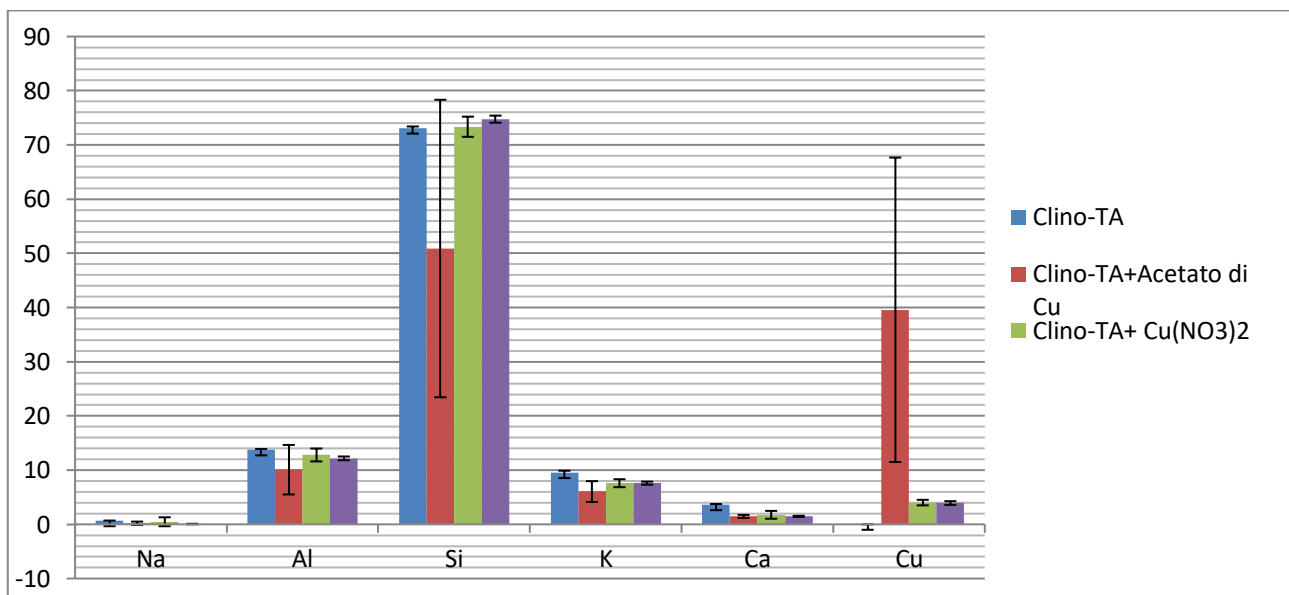


Fig 6.5 Grafico della percentuale degli elementi presenti nei 3 campioni di Clinoptilolite-TA trattati con i diversi Sali di rame e solo Clinoptilolite-TA per confronto

Il campione di Clinoptilolite-TA fatto reagire con l'acetato di rame presenta un gran quantitativo di Cu ma barre di errore molto ampie, dovute probabilmente alla precipitazione di fasi ricche in Cu sulla superficie.

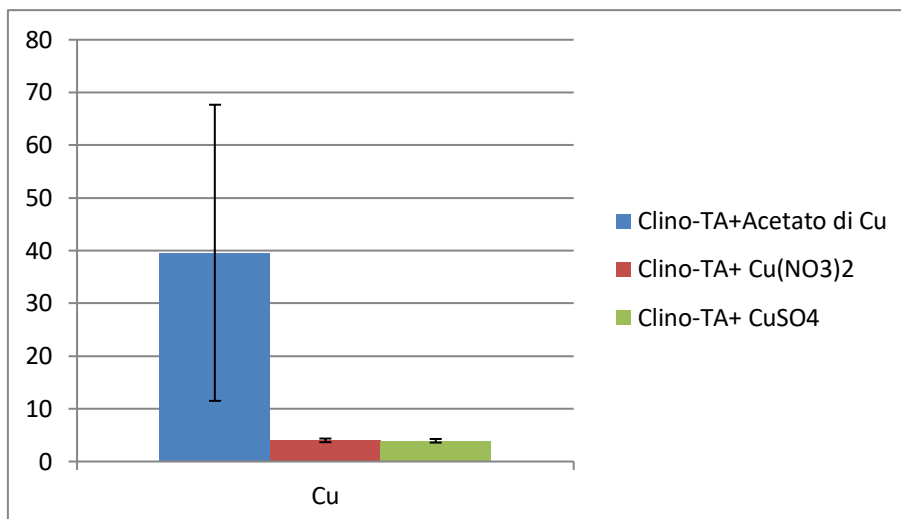


Fig6.6 grafico della quantità di Cu nei 3 diversi campioni

6.1.2 ANALISI XRD

Le analisi ai raggi X (XRD) permettono di individuare la presenza di fasi cristalline formatesi sulla superficie della zeolite.

Il primo campione analizzato è la clinoptilolite

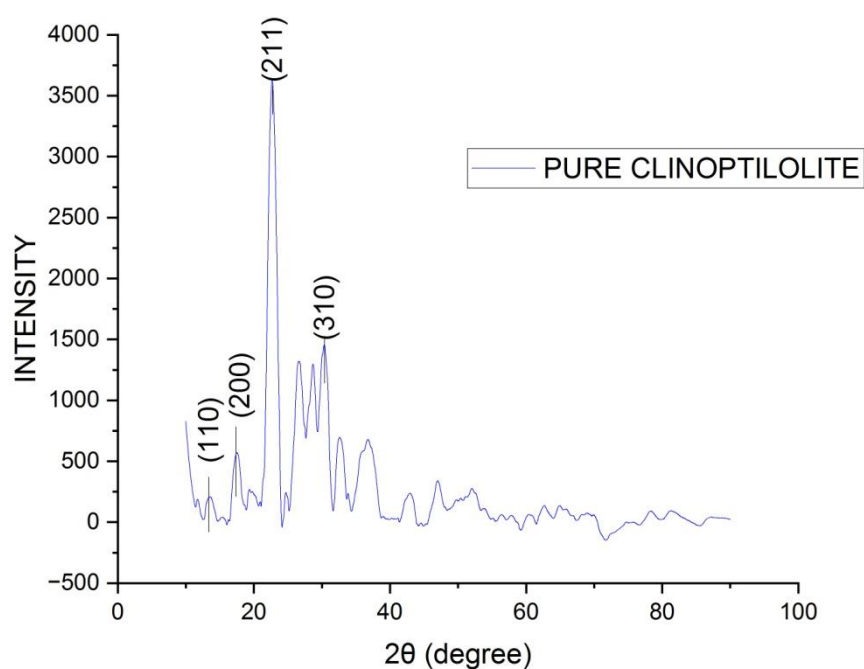


Fig6.7 XRD eseguita su un campione di clinoptilolite

Seguono i risultati dei campioni ottenuti dalla reazione tra clinoptilolite funzionalizzata e acetato di rame, nitrato di rame e solfato di rame

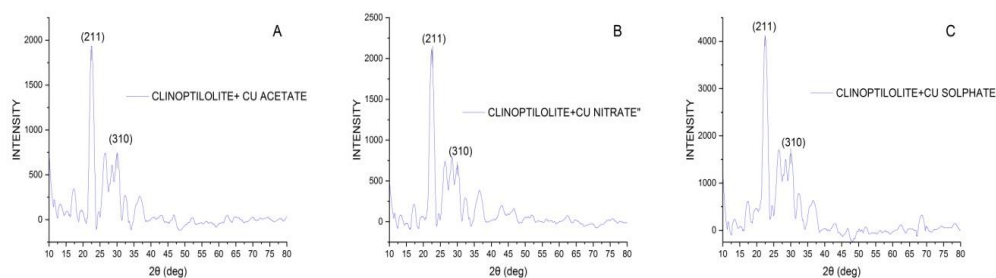


Fig 6.8 XRD di A) Acetato di rame B) Nitrato di rame C) Solfato di rame

Tutti gli spettri non differiscono sensibilmente da quello della sola clinoptilolite, non è stato quindi possibile identificare la presenza di nanoparticelle a base di Cu.

La presenza di Cu nell'analisi EDS potrebbe essere anche parzialmente dovuto alla presenza di Cu introdotto nella zeolite tramite scambio ionico, o la formazione di complessi Cu-TA non riscontrabili all'XRD

Visto i risultati ottenuti, la bassa solubilità dell'acetato di rame (100g/L) confrontata con quello del nitrato di rame (2670g/L) e con il solfato di rame (317g/L) e la sua possibile precipitazione si è optato di escludere l'acetato di rame dalle successive sperimentazioni.

6.1.3 ANALISI ANTIBATTERICA

Per convalidare l'efficacia antibatterica, sono state condotte delle prove di inibizione batterica utilizzando delle piastre, su cui è stato fatto crescere delle colonie di *S.epidermidis*.

Le polveri di vari campioni come: clinoptilolite, clinoptilolite funzionalizzata, clinoptilolite funzionalizzata con $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e clinoptilolite funzionalizzata con CuSO_4 , sono state pressate da un pastigliatore, ottenendo campioni compatti con le medesime dimensioni

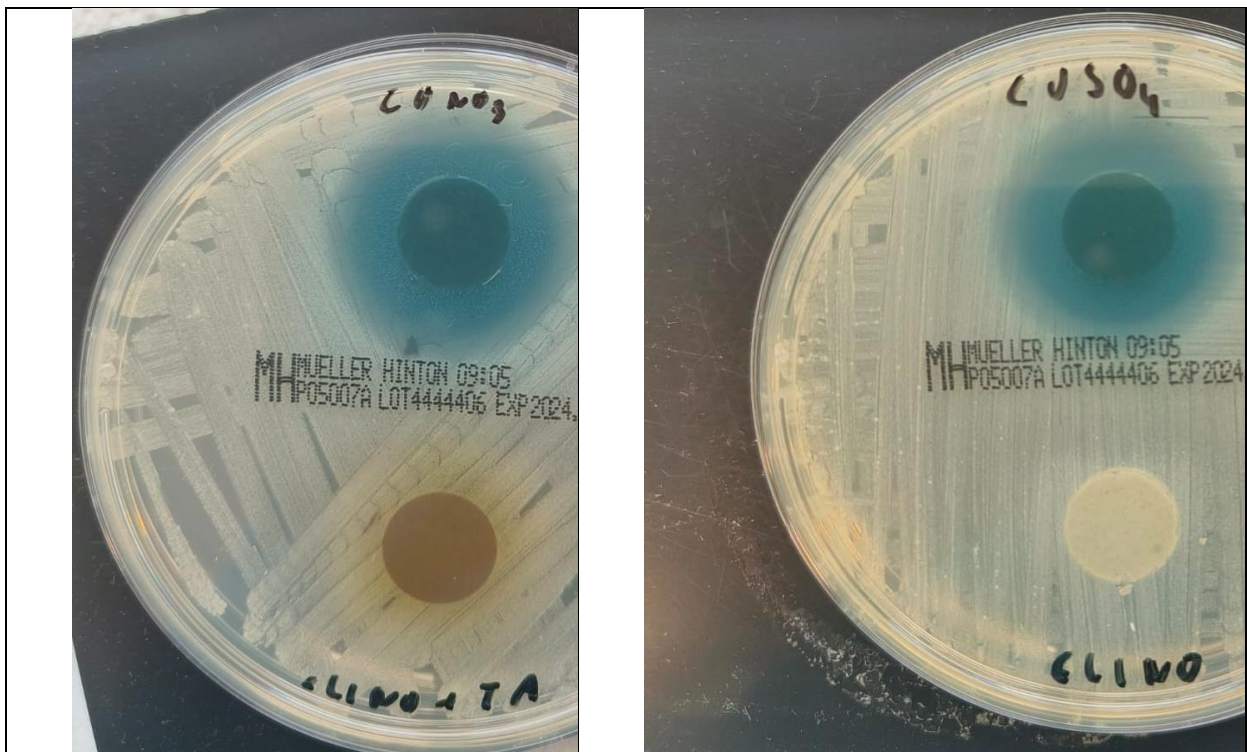


Fig 6.9 Prove di alone di inibizione batterica utilizzando pastiglie di clinoptilolite funzionalizzata + $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (in alto a sinistra), di clinoptilolite funzionalizzata (in basso a sinistra), pastiglie di sola clinoptilolite (immagine a destra in basso) e pastiglie di clinoptilolite funzionalizzata+ CuSO_4 (immagine a sinistra in basso)

I campioni sono stati separati in due piastre, per evidenziare al massimo l'alone di inibizione batterica, i campioni di sola clinoptilolite e clinoptilolite funzionalizzata, non mostrano alcun alone di inibizione, mentre i campioni contenente rame, mostrano un alone di circa 0,5 cm a partire dal bordo degli stessi.

6.2 VARIAZIONE DEL PH

La prossima sperimentazione prevede l'utilizzo di soluzioni di CuSO_4 0,1M e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,1M aumentando il pH fino ad 11 per incrementare il numero di gruppi chinonici e migliorare l'attività riducente dell'acido tannico. Il protocollo della reazione è il medesimo utilizzato precedentemente, come da figura seguente.

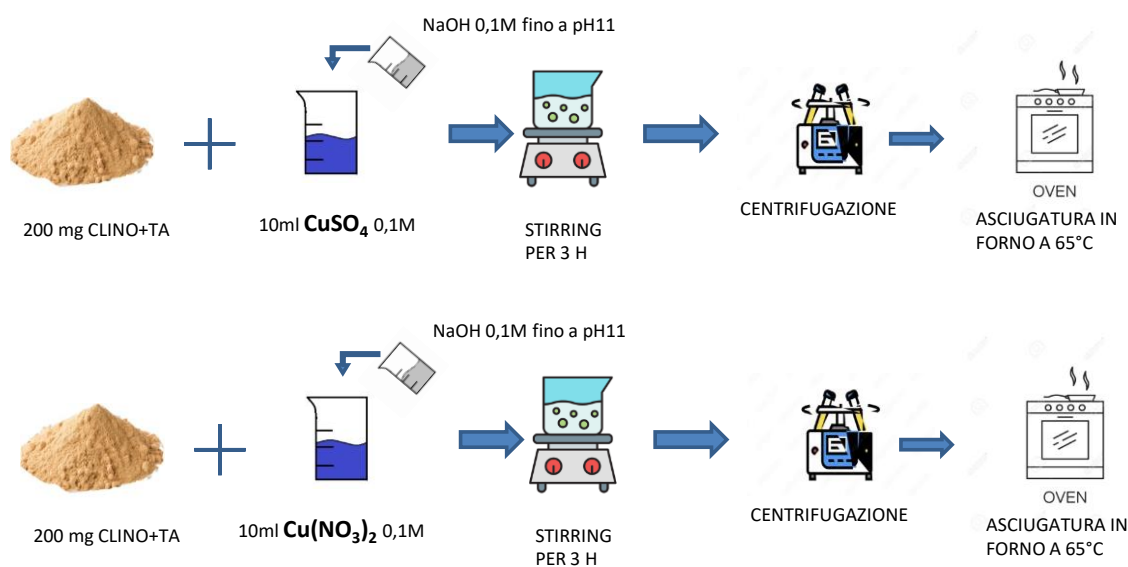


Fig6.10 Schema del processo di reazione di riduzione a pH 11

6.2.1 ANALISI MORFOLOGICA

Una prima indagine morfologica è stata eseguita al microscopio elettronico a scansione, dove si evidenzia la presenza di nanoparticelle in entrambi i campioni. Risulta tuttavia difficoltoso distinguere la presenza di particelle di rame o ossido di Cu.

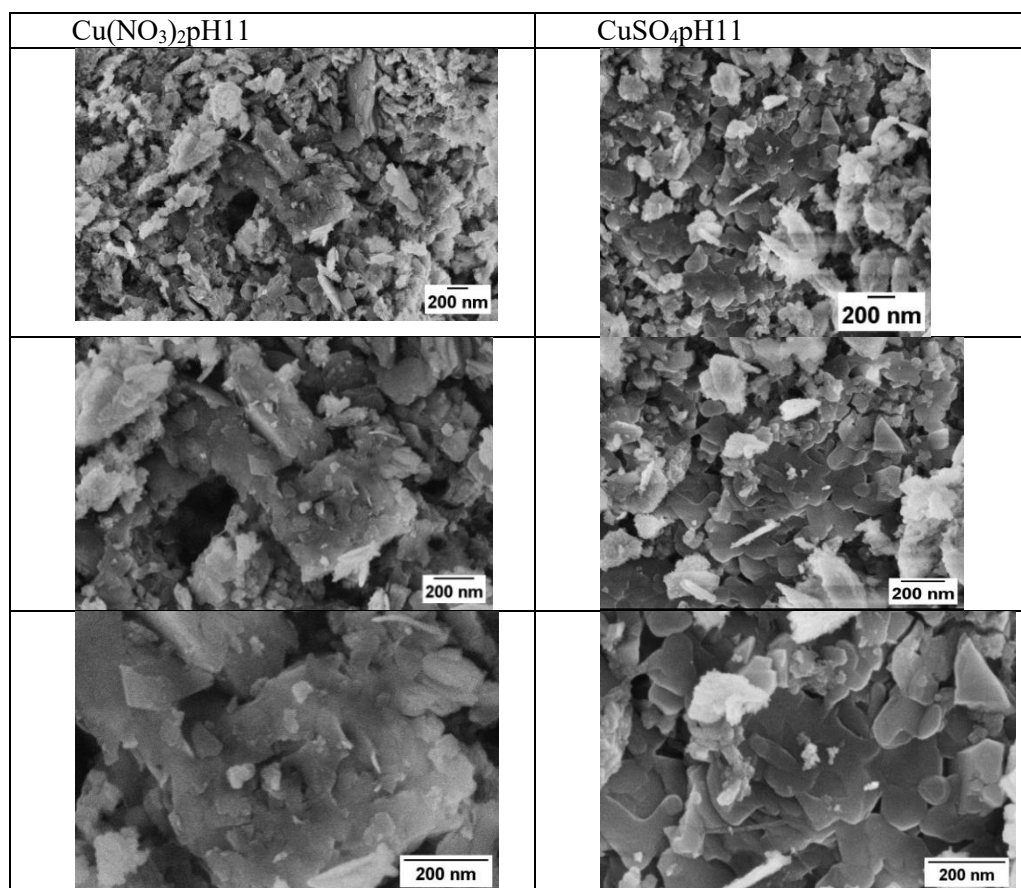


Fig6.11 immagini FESEM dei campioni funzionalizzati con CuSO_4 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ a pH 11

6.2.2 ANALISI EDS

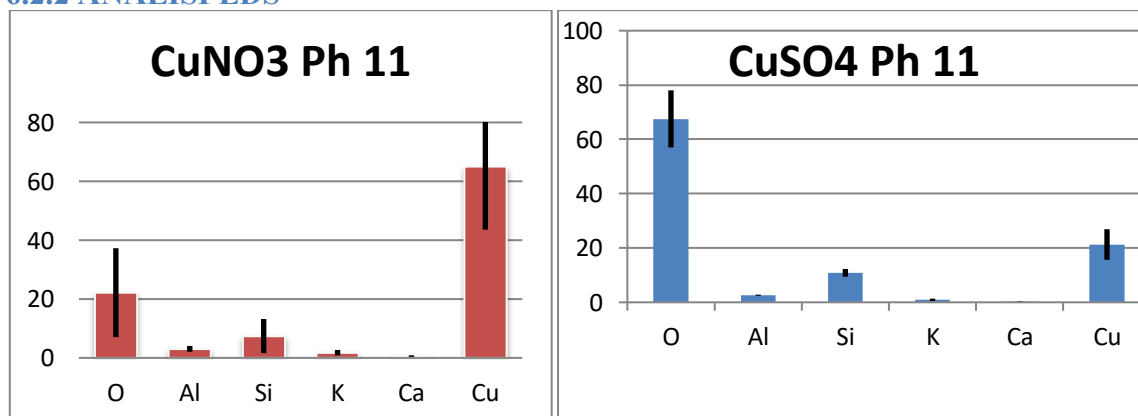


Fig6.12 grafici EDS della clinoptilolite funzionalizzata che a reagito a pH 11 con $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (a destra) e CuSO_4 (a sinistra)

Dall'analisi EDS si evidenzia una maggiore quantità superficiale di Cu , rispetto ai campioni a pH inferiori, la maggior quantità di gruppi chinonici a pH elevati permette una riduzione più efficace

Per cercare di evidenziare la presenza di particelle a base di Cu è stata quindi effettuata un'analisi XRD.

6.2.3 ANALISI XRD

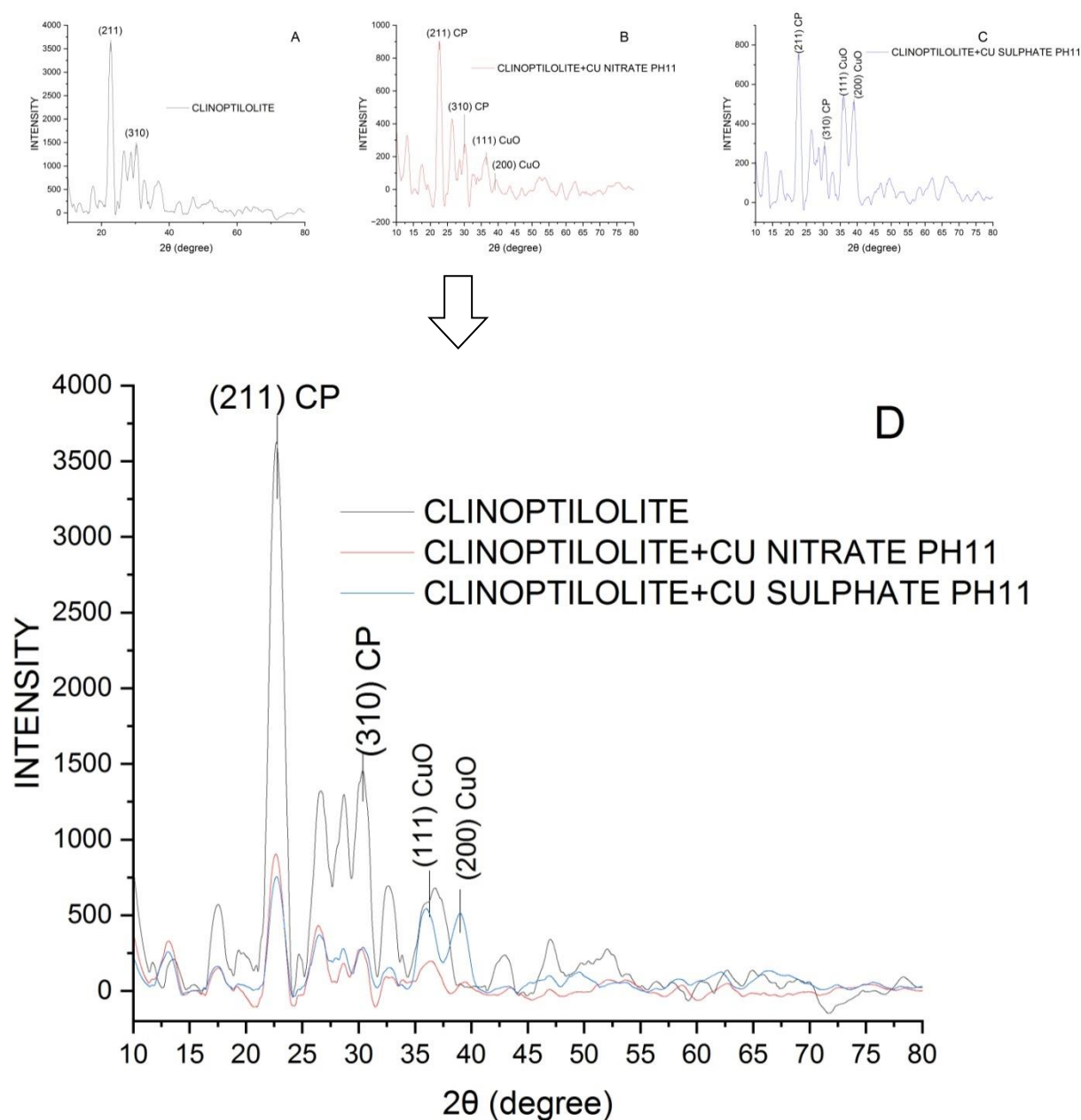


Fig 6.13 XRD della A)clinoptilolite funzionalizzata B) clinoptilolite funzionalizzata con nitrato di rame a pH11C)clinoptilolite funzionalizzata con solfato di rame a pH11 D)

confronto di tutti i campioni analizzati. In tutti i grafici sono inoltre evidenziati i piani cristallografici, dove CP=clinoptilolite e CuO= ossido di rame.

L'analisi XRD dopo riduzione in situ mostra una riduzione del segnale della clinoptilolite e la presenza di ossido di rame, soprattutto nel campione ottenuto con il CuSO_4 .

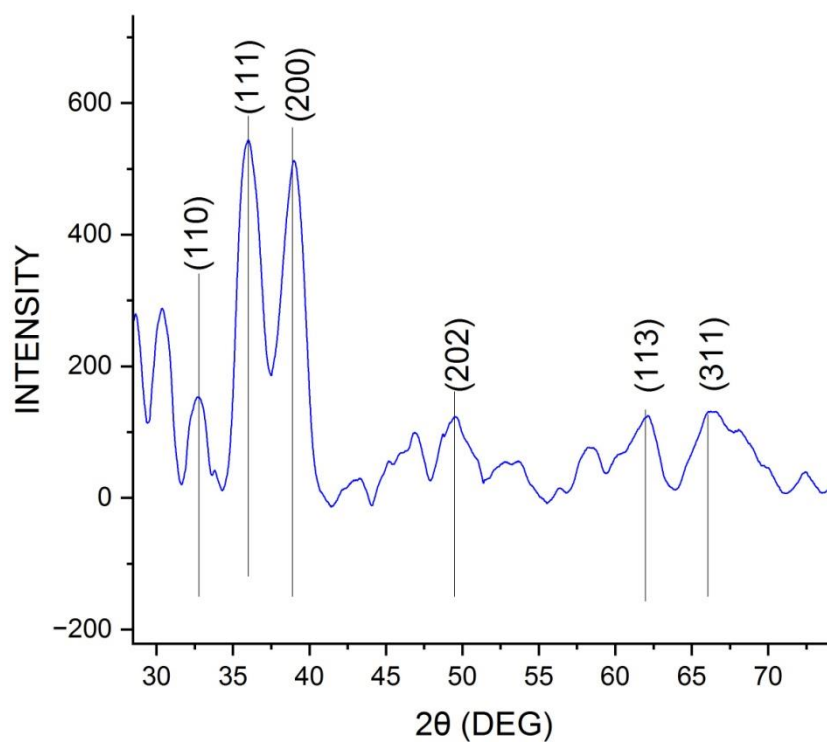
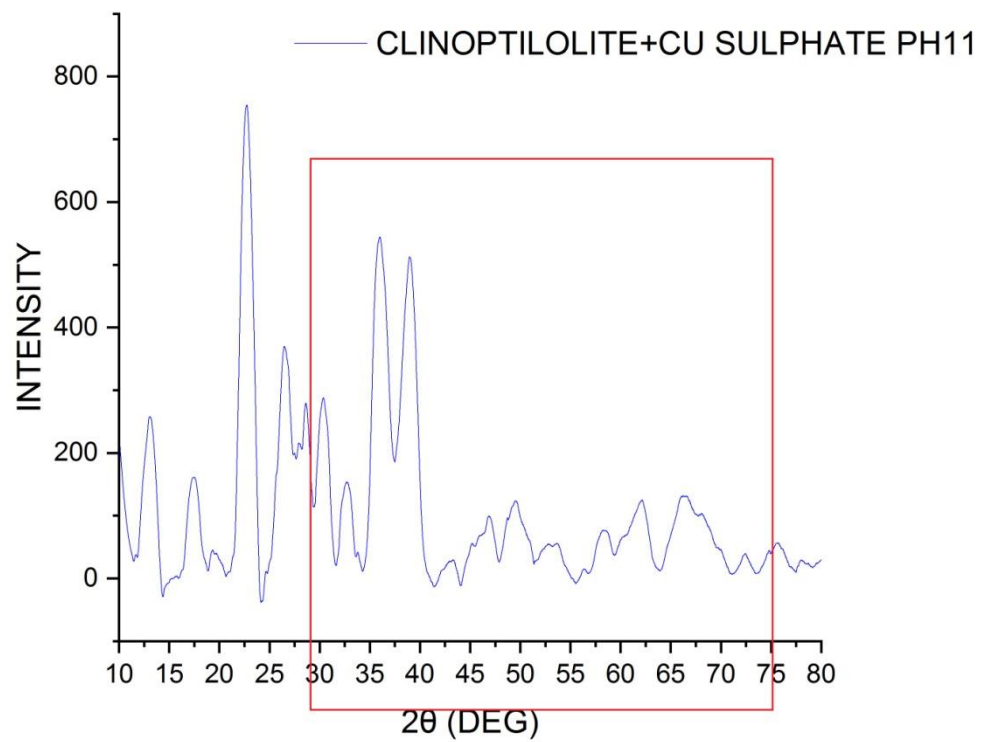


Fig6.14 ingrandimento della misura XRD della clinoptilolite + CuSO_4 , dove vengono rappresentati i piani cristallografici di CuO

La Fig mostra un particolare della misura XRD dove sono illustrati i rispettivi piani cristallografici del CuO con $2\theta = 32,66^\circ$ $35,92^\circ$ $38,96^\circ$ $49,47^\circ$ $62,05^\circ$ $66,24^\circ$ corrispondenti ai picchi di diffrazione relativi a: (110) (111) (200) (202) (113) (311) in accordo con la JCPDS card (89-2529).

6.2.4 ANALISI UV-VIS

Mentre sul liquido ottenuto dalla separazione, si sono condotte delle misure UV-VIS per ricercare la formazione in soluzione di nano particelle di rame

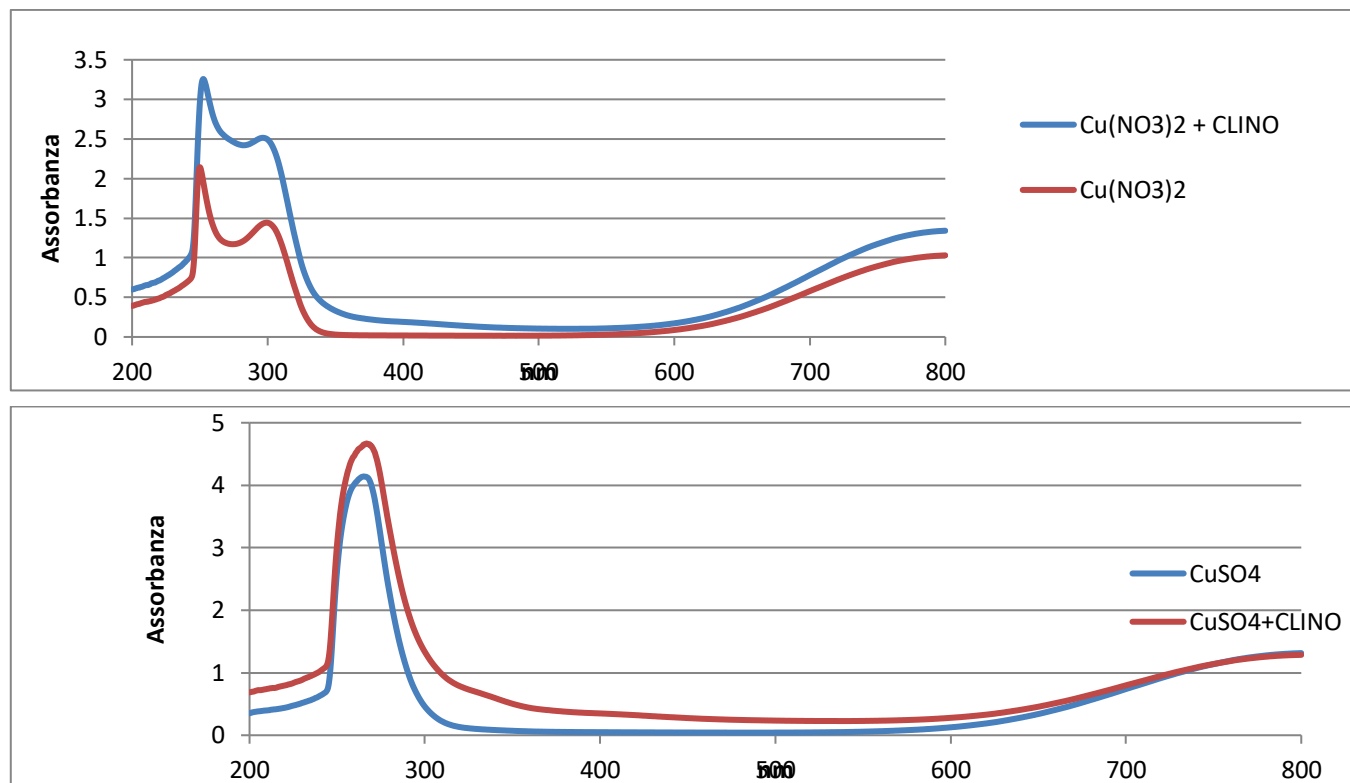


Fig6.15 spettri UV-VIS della fase liquida conservata dalla sperimentazione a pH 11 e confrontata con le soluzioni di CuSO_4 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ entrambe alla concentrazione di 0,1 M

Nella soluzione non si evidenzia la presenza di nano particelle, infatti risultano praticamente sovrapponibili con le soluzioni di rame di partenza.

6.3 VALUTAZIONE DELL'USO DELL'ACIDO TANNICO COME AGENTE RIDUCENTE DEL RAME IN SOLUZIONE

Al fine di confermare la formazione di nanoparticelle di Cu rame o ossido di rame in diverse condizioni di natura chimica, si sono fatte reagire soltanto l'agente riducente, l'acido tannico ad una concentrazione bassa (0,0059M) ed una più elevata (0,026M), con due soluzioni di CuSO_4 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ entrambe 0,1M. I pH selezionati per la prova sono rispettivamente 8,5 e 11.

Si preparano 2 soluzioni di acido tannico con due differenti concentrazioni una 0,026 M e l'altra 0,0059 M (la concentrazione di acido utilizzata finora), si fanno reagire con il CuSO_4 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ le quali vengono portate a tamponando il pH a 8,5 o 11, ottenendo 8 soluzioni (Fig6.18), oltre le soluzioni di controllo di CuSO_4 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

Dopo l'aggiunta dei Sali di rame, si ha una reazione di riduzione con la formazione di un precipitato di colore marrone scuro, indice di una reazione di riduzione [71].

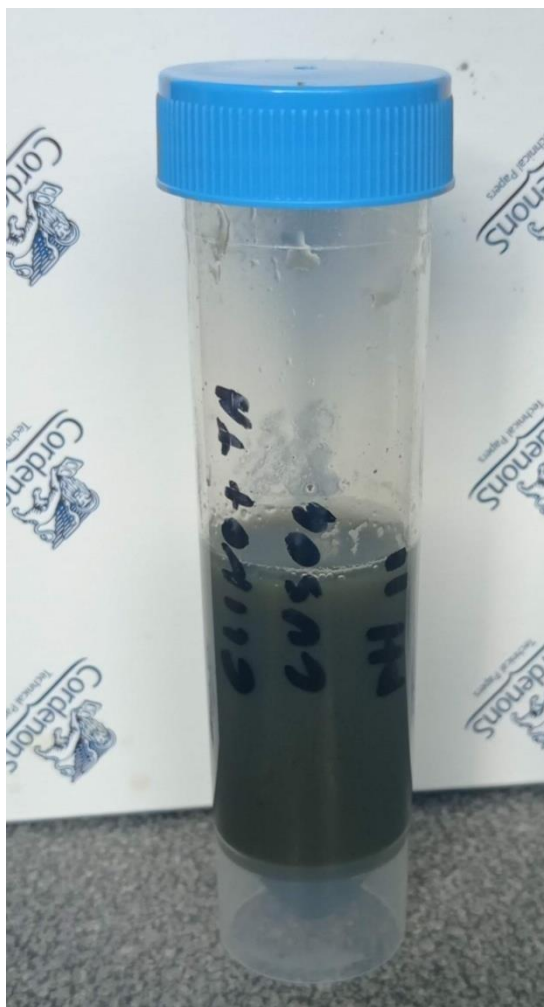


Fig 6.16 reazione di riduzione della clinoptilolite funzionalizzata + CuSO_4 , con conseguente formazione di un precipitato scuro

Successivamente la soluzione viene filtrata, ed il precipitato viene lavato con acqua distillata.



Fig 6.17 filtraggio della soluzione clinoptilolite funzionalizzata + soluzione di Cu
La soluzione a base di Cu, passa da un colore blu, ad incolore dopo la filtrazione

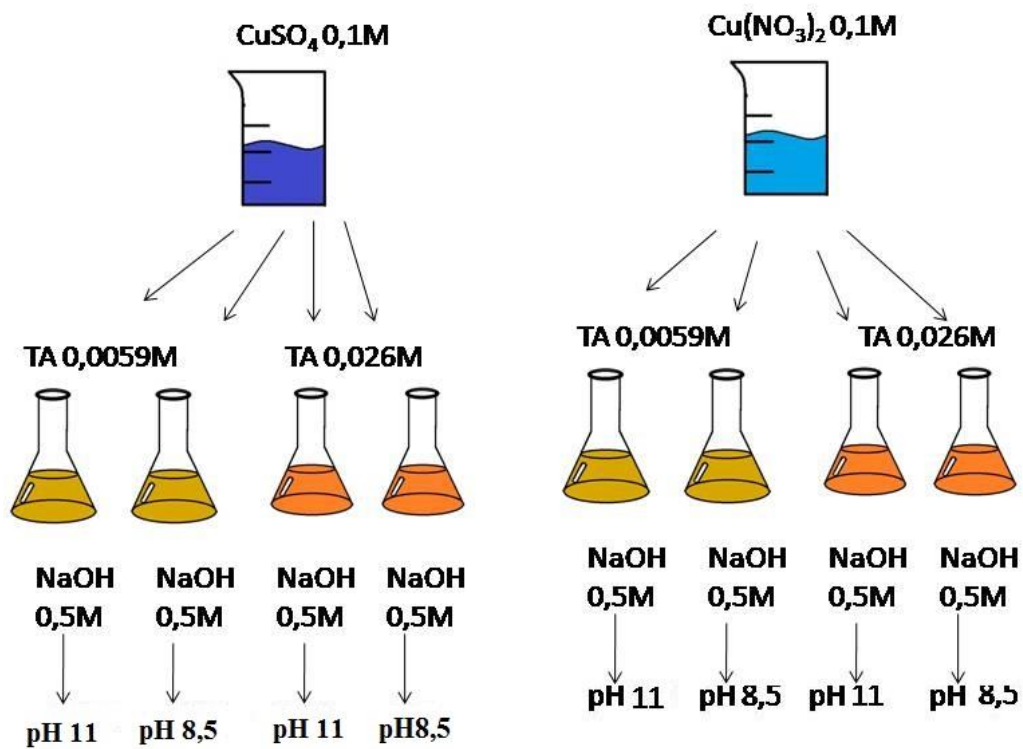
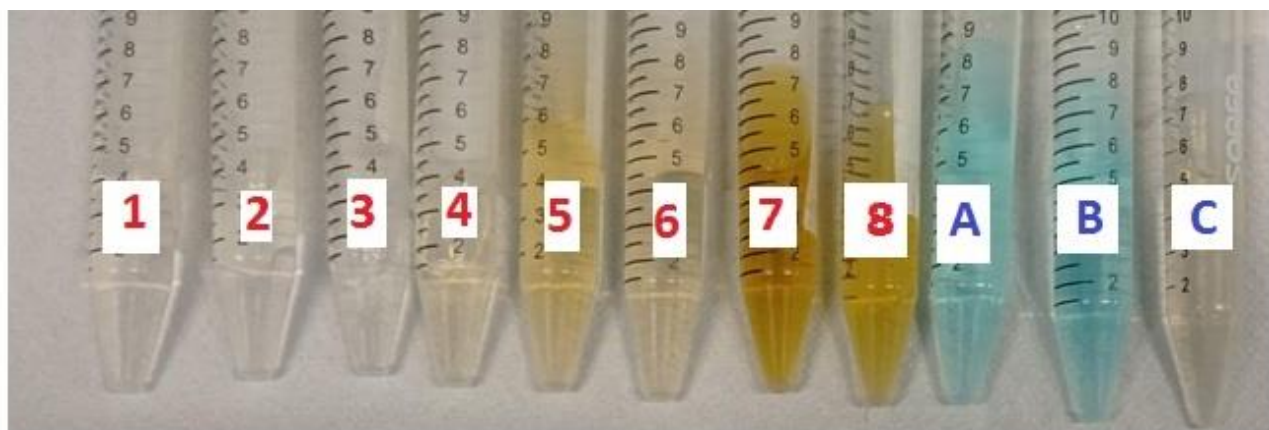


Fig 6.18 Rappresentazione della reazione tra acido tannico a diverse concentrazioni e due Sali di rame: CuSO_4 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$



- 1) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ + acido tannico 0,026M pH 8.5
 - 2) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ + acido tannico 0,006M pH 8.5
 - 3) CuSO_4 + acido tannico 0,006M pH 8.5
 - 4) CuSO_4 + acido tannico 0,026M pH 8.5
 - 5) CuSO_4 + acido tannico 0,006M pH 11
 - 6) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ + acido tannico 0,006M pH 11
 - 7) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ + acido tannico 0,026M pH 11
 - 8) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ + acido tannico 0,026M pH 11
- A) CuSO_4 CTRL
- B) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ CTRL
- C) Acido tannico 0,006M
CTRL

Fig6.19 foto delle soluzioni utilizzate con diverse concentrazioni e pH

6.3.1 ANALISI UV-VIS

Le diverse soluzioni filtrate dal precipitato, vengono analizzati tramite UV-VIS e confrontate con le soluzioni di TA e del sale di rame di partenza

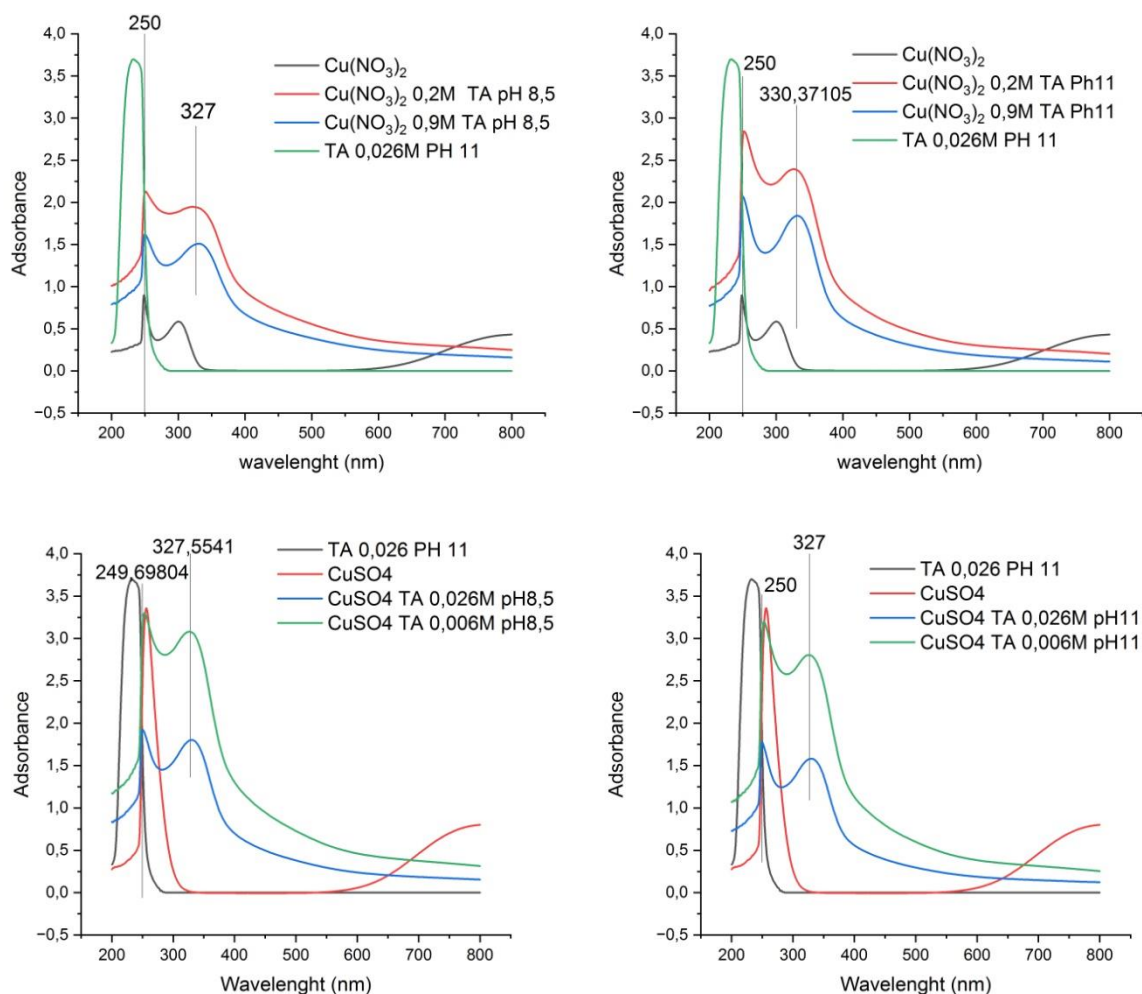


Fig6.20 Analisi UV-VIS di CuSO_4 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ con diverse concentrazioni di acido tannico e diversi pH

Lo spettro mostra un intenso picco di assorbimento intorno ai 250nm dovuto ad una transizione $n\text{-}\sigma^*$ degli atomi O presenti nella struttura del TA, mentre il picco a 327 nm circa è da attribuire all'interazione del polifenoli con il Cu e alla possibile formazione di complessi, come citato da diversi articoli [72][73]

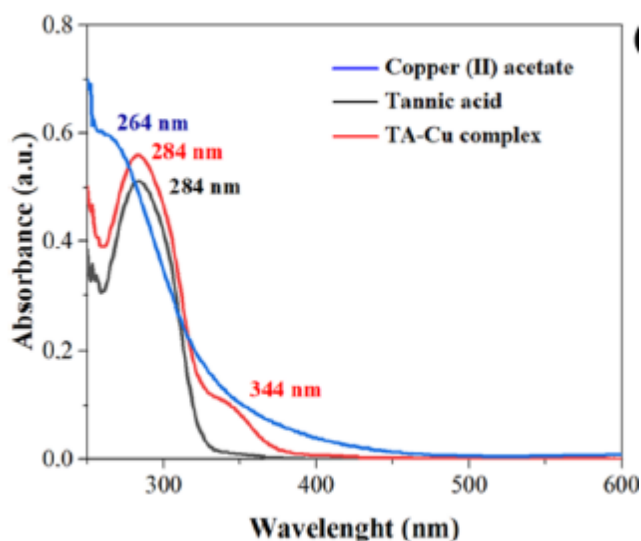


Fig 6.21 caratterizzazione di un complesso TA-Cu tramite una spettrofotometria UV-VIS
[72]

Per l'analisi al FESEM si è scelto come campione il CuSO_4 che ha reagito con l'acido tannico sia a concentrazione bassa (0,0059) che alta (0,026M) ad un pH di 8,5. Dopo la filtrazione una goccia della fase liquida è stata fatta cadere su una rete polimerica e poi lasciata evaporare a temperatura ambiente

6.3.2 ANALISI MORFOLOGICA

I campioni analizzati al microscopio elettronico sono due soluzioni ottenute dopo una centrifugazione a 12000 rpm , al fine di escludere precipitati di dimensioni elevate

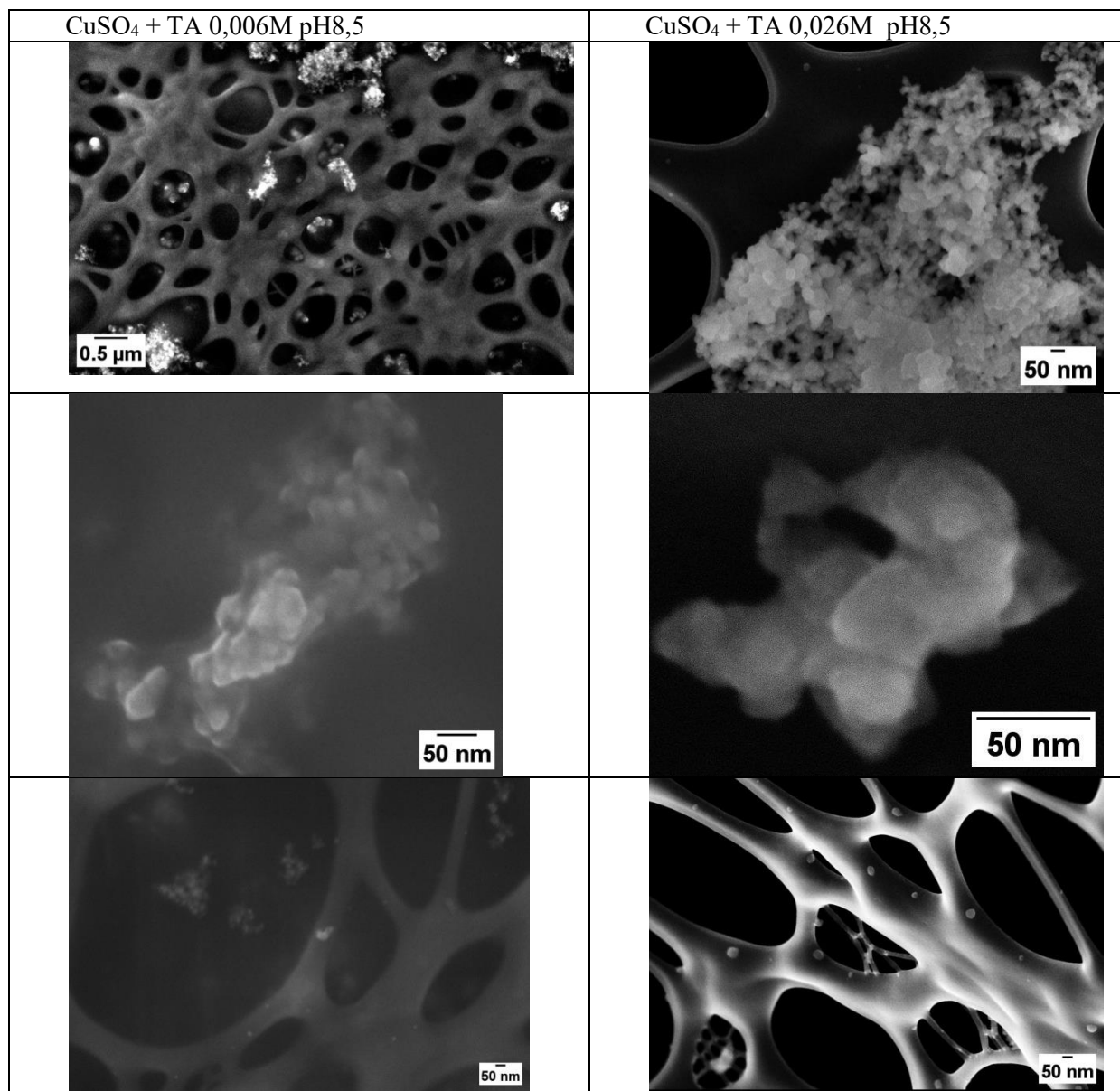


Fig 6.22 analisi al microscopio elettronico a scansione di campo (FESEM) di CuSO₄ 0,1M e soluzioni di acido tannico ad una concentrazione di 0,026M e 0,006M.

Sui campioni della sola parte liquida CuSO₄ + TA 0,006M pH8,5 e CuSO₄ + TA 0,026M pH8,5 si possono osservare la presenza di nano particelle di dimensione ridotta, agglomerate tra loro, presubilmente sferiche (< 50 nm).

6.4 VALUTAZIONE DEL TEMPO E DELLA TEMPERATURA

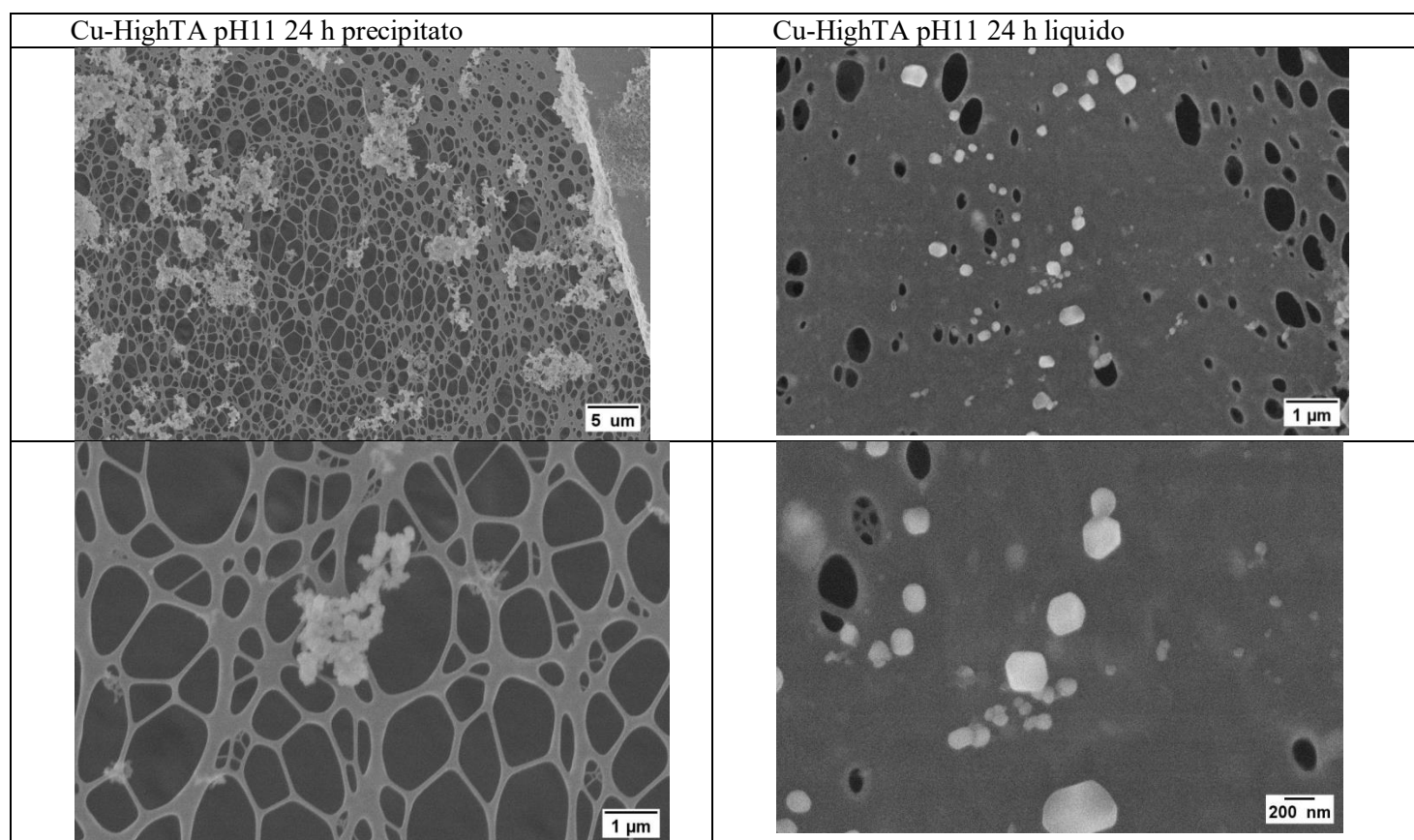
La prossima sperimentazione consiste nel valutare l'influenza di parametri fisici, come la temperatura e il tempo di reazione. Per questa valutazione si è scelto di utilizzare il CuSO_4 0,1M che reagisce con l'acido tannico 0,026M ad un pH di 11. D'ora in poi chiamato Cu-HighTA pH11

- Un campione viene tenuto in agitazione meccanica per 24h a temperatura ambiente
- Un campione viene tenuto in agitazione meccanica per 3 ore a 60°C

Successivamente le soluzioni vengono lavate e filtrate come nella sintesi precedente, e vengono conservate sia le fasi liquide che l'eventuale precipitato. In totale 4 campioni: Cu-HighTA pH11 24h precipitato, Cu-HighTA pH11 24h liquido, Cu-HighTA pH11 60°C precipitato e Cu-HighTA pH11 60°C liquido.

6.4.1 ANALISI MORFOLOGICA

La prima caratterizzazione morfologica è eseguita al microscopio elettronico a scansione di campo (FESEM),



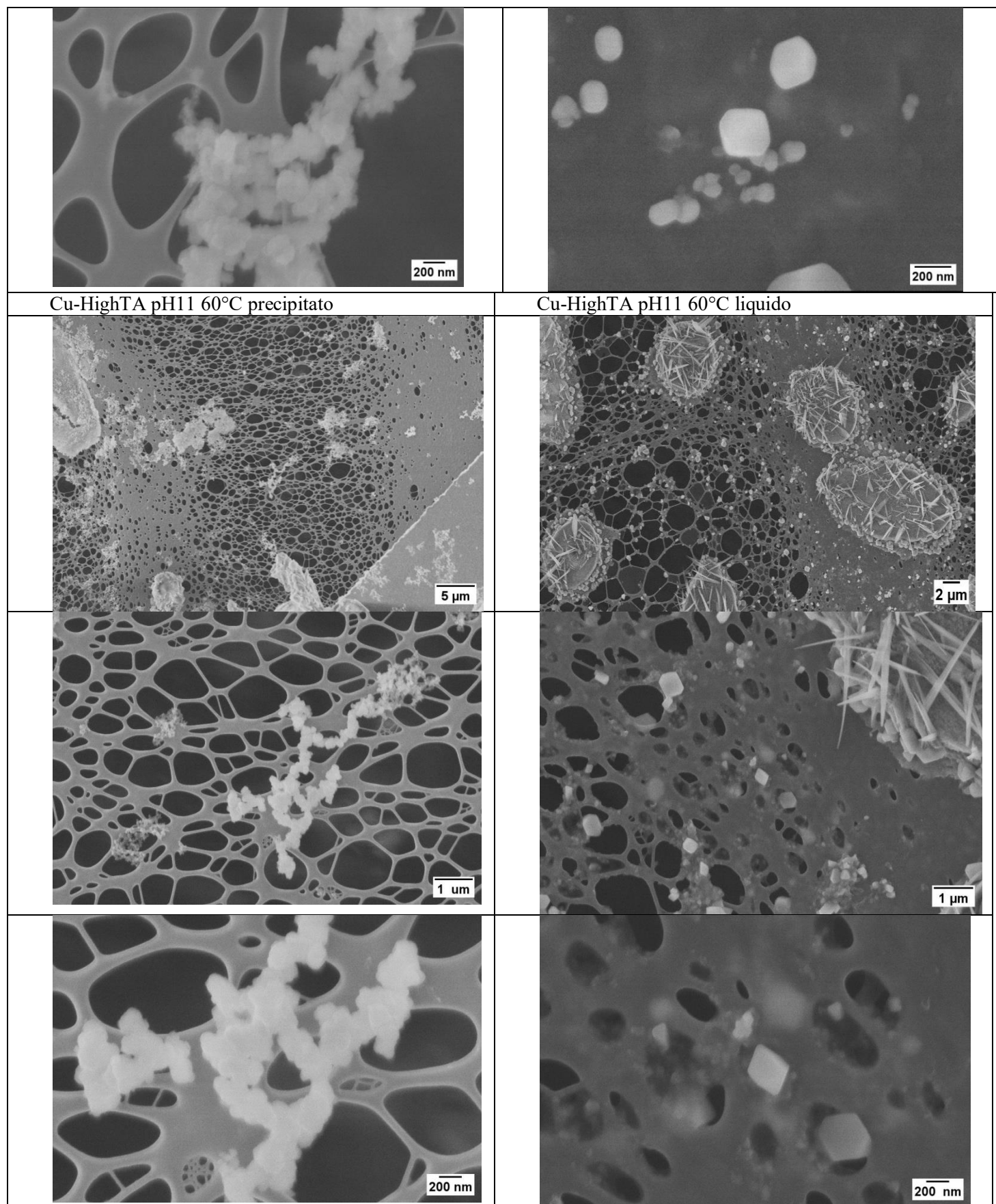


Fig 6.23 Immagini FESEM dei campioni : Cu-HighTA pH11 24h precipitato, Cu-HighTA pH11 24h liquido, Cu-HighTA pH11 60°C precipitato e Cu-HighTA pH11 60°C liquido.

Le nano particelle presenti nel campione della fase liquida 24h, visualizzate con il FESEM hanno un aspetto cubico(monoclina), tipiche delle nano particelle di CuO,[74] e di Cu₂O [75]Mentre nel campione della fase liquida che ha reagito per 30 minuti a 60°, è possibile osservare la presenza di cristalli aghiiformi,di dimensioni micrometriche attribuibili anch'essi al CuO[76]

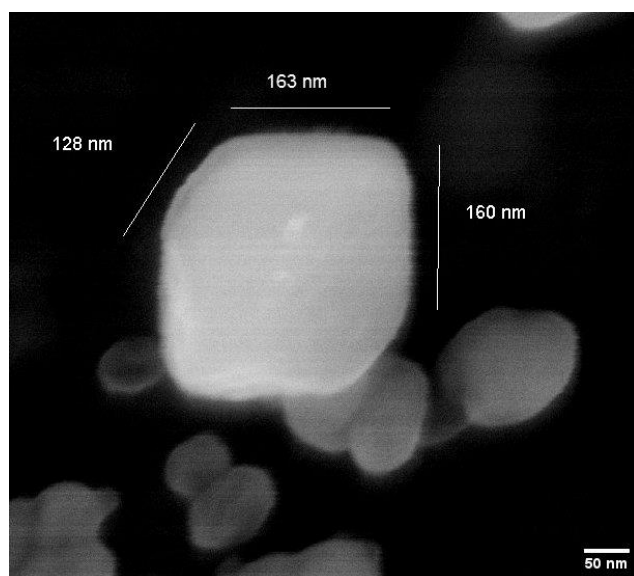


Fig6.24 misurazione di una nanoparticella di ossido di rame al FESEM

Le nano particelle presenti nella fase liquida filtrata dal precipitato, sia del campione sintetizzato a 60° che quello a 24h , presentano un aspetto più riconducibile ai cristalli di ossido di rame, al contrario la fase contenente il precipitato presenta particelle molto coese tra loro, riconducibili a particelle colloidali, o probabili complessi con l'acido tannico.

6.4.2 ANALISI UV-VIS

Successivamente le fasi liquide ed i precipitati dei 2 campioni vengono analizzate tramite lo spettrometro UV-VIS

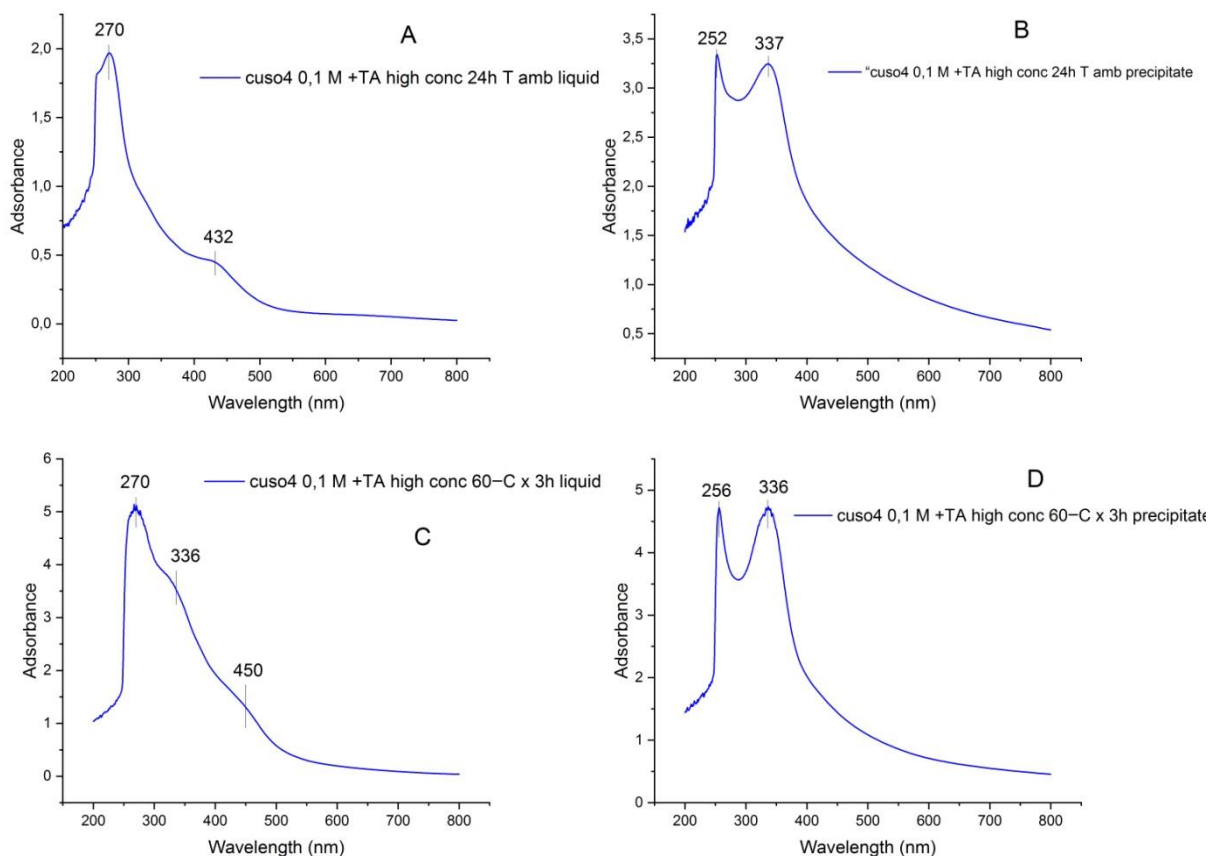


Fig6.25 misure UV-VIS sul campione di Cu-HighTA pH11 24h A) liquido, B) solido e sul campione a Cu-HighTA pH11 60°C C) liquido e D) solido

In questi grafici si può notare:

Tutti e 4 i campioni presentano un picco a basse lunghezze d'onda (270 nm per le fasi liquide e circa 250 nm per i campioni solidi) questo picco è dell'acido tannico come spiegato nelle prove precedenti, e altri articoli [77]

Il picco presente a 336 nm nei campioni B, C e D, sono attribuibili a nano particelle di CuO[78][79].

I picchi a 432 nm nel campione A e a 450 nm nel campione C sono dovuti alle nano particelle di Cu₂O [75]

6.4.3 ANALISI XRD

I campioni analizzati con questa tecnica, corrispondono al precipitato di Cu-HighTA pH11 24h e Cu-HighTA pH11 60°C derivato dal processo di filtrazione, lavato con acqua distillata ed essiccato ad una temperatura di 65°C

La caratterizzazione tramite diffrazione a raggi X è stata valutata per un angolo di diffrazione fra 10° e 80°, i campioni sono depositati su un supporto a base di PLA (acido polilattico), che presenta il seguente grafico di diffrazione.

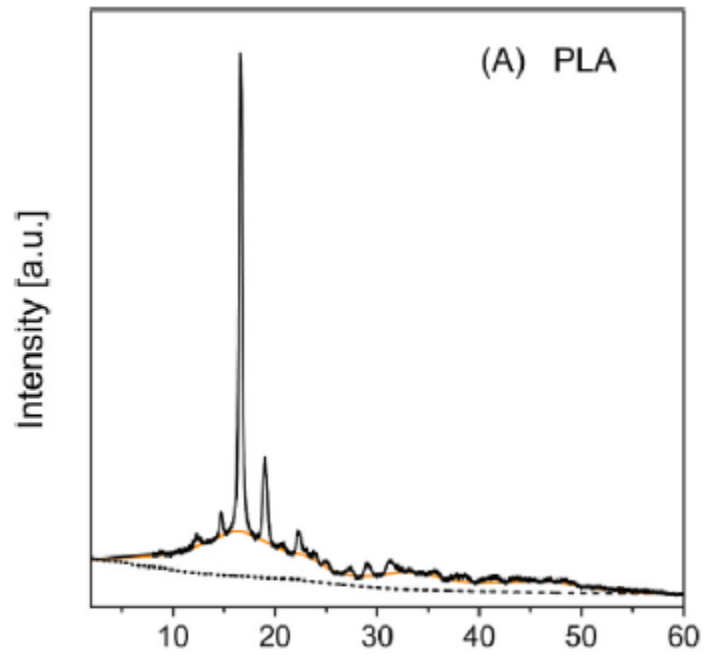


Fig6.26 XRD di un campione di PLA cristallizzato [80]

A causa di questo materiale nei seguenti diffattogrammi , comparirà anche lo spettro di questo materiale

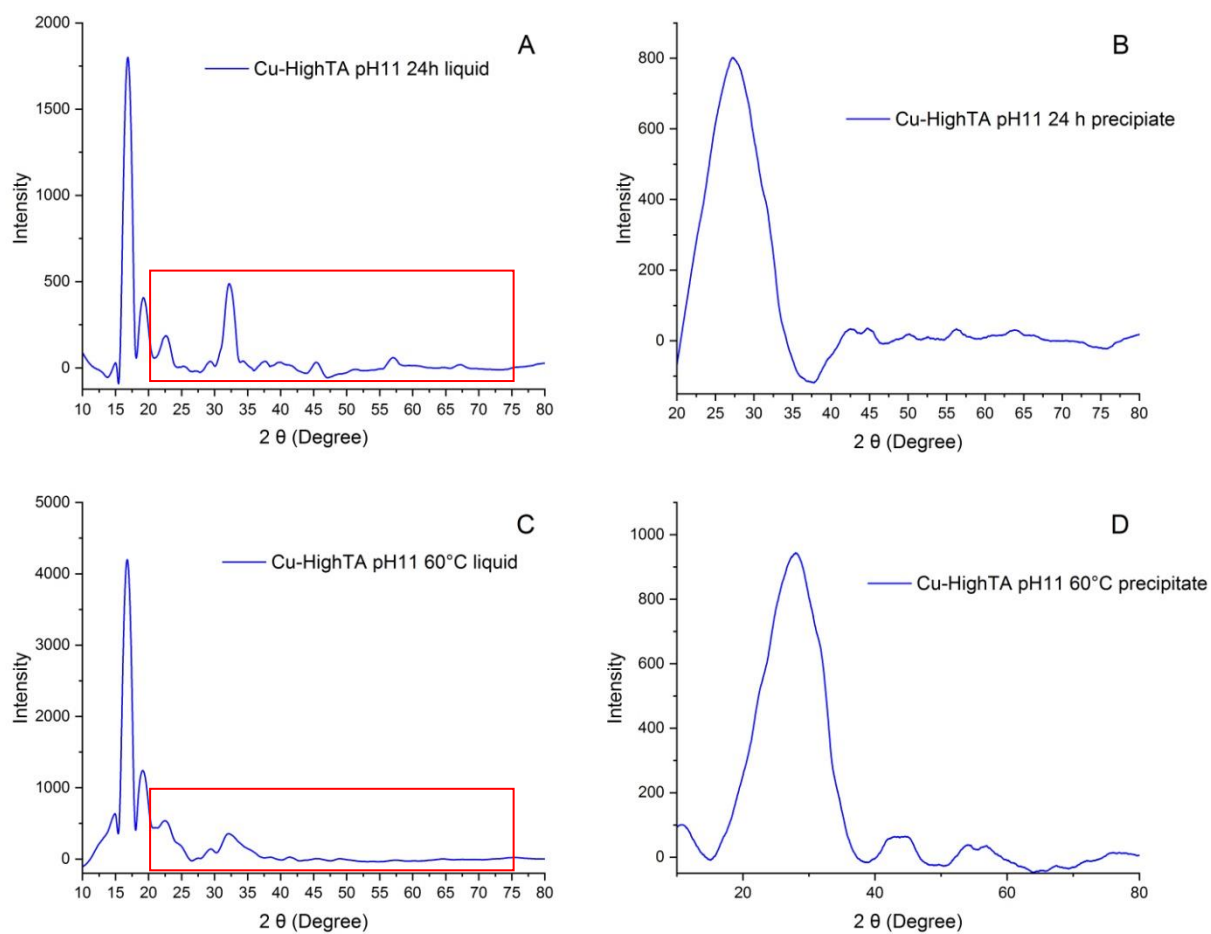


Fig6.27 diffrattogrammi di Cu-HighTA pH11 dopo 24 h a temperatura ambiente A)della parte liquida e B)solida e Cu-HighTA pH11 60°C sia la parte C) liquida che D) solida

Le misure XRD della parte liquida (grafico A e C) viene ingrandita per eliminare il PLA e visualizzare meglio i picchi presenti.

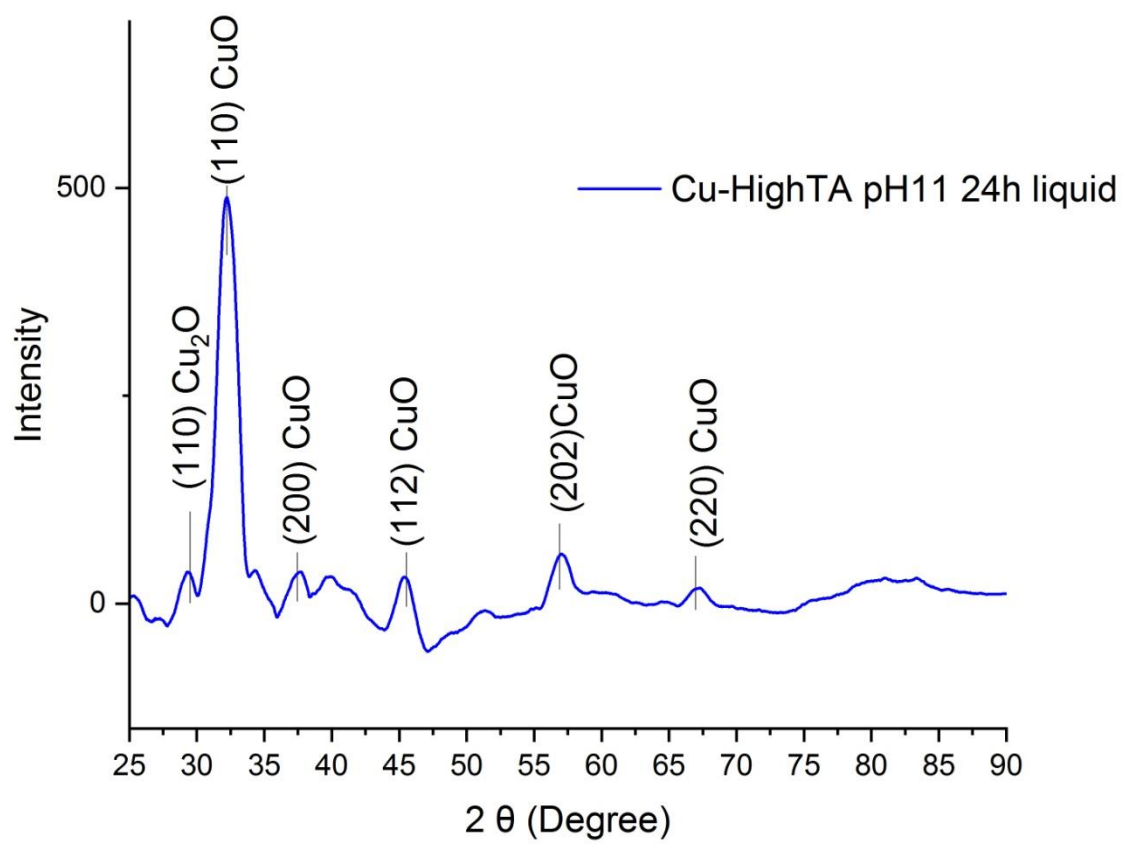


Fig 6.28 spettro XRD del campione Cu-HighTA pH11 24 h fase liquida

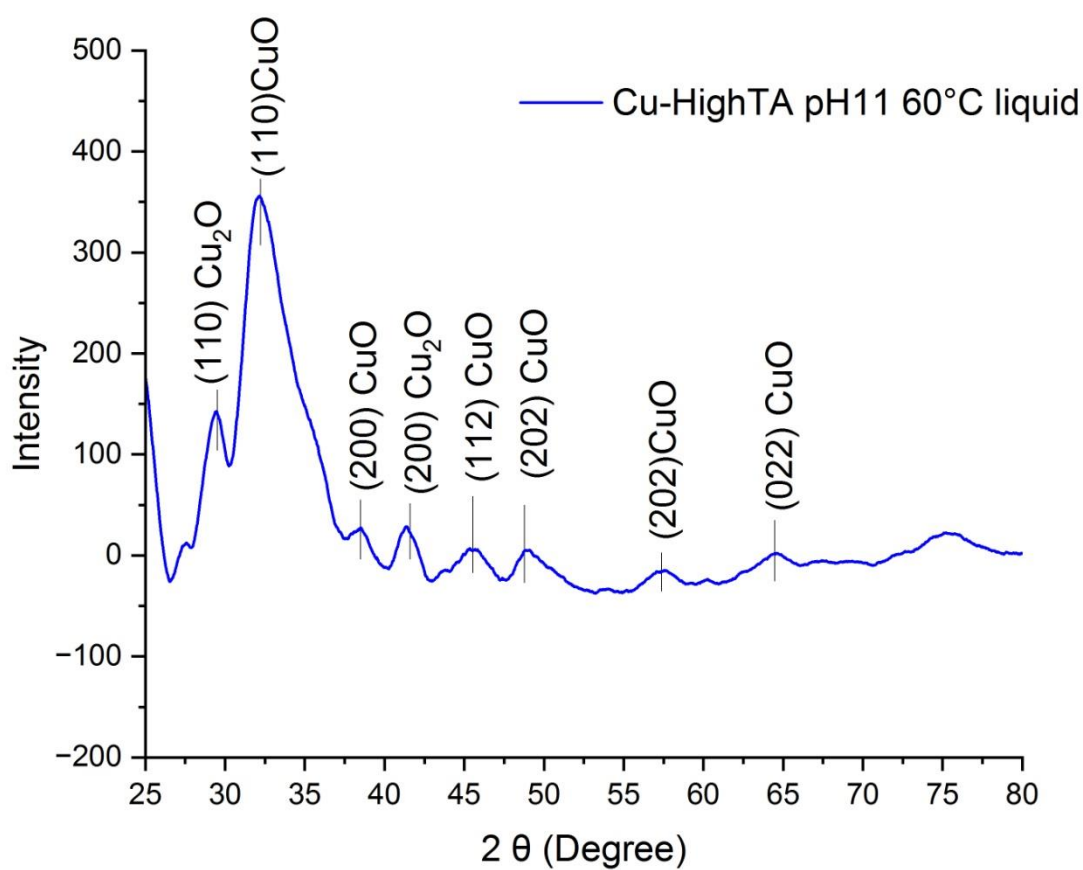


Fig6.29 spettro XRD del campione Cu-HighTA pH11 60°C

Le misure XRD delle fasi liquide mostrano sia i picchi di CuO sia quelli di Cu₂O. le intensità e posizione dei picchi corrispondono con i valori tabellari di entrambi gli ossidi, per il CuO si hanno angoli(2θ) di: 32,23°,38,49°,46,28°,48,78°,58,13°,65,97° e 67,96° che corrispondono ai piani (110), (200), (112), (202),(202) e (022) (JCPDS file No. 05-661)[81]

Per il Cu₂O si hanno solo due picchi a 29,51° e 42,26° che corrispondono ai piani (110) e (200) rispettivamente (ICDD #785—1326) [82].

E' interessante notare come i campioni della parte liquida mostrano diverse fasi cristalline e dimostrano la presenza di entrambi gli ossidi di rame, senza la presenza di Cu metallico. I picchi del campione Cu-HighTA pH11 24 h , mostra picchi più definiti, ma con meno fasi cristalline presenti, rispetto al campione fatto reagire per 3 ore a 60°; non è stato possibile determinare la dimensione delle particelle tramite la formula di Debye- Scherrer a causa dell'eccessiva rumorosità della misura.

I campioni della parte solida sia del campione Cu-HighTA pH11 24h che il campione ottenuto aumentando la temperatura a 60°C (Cu-HighTA pH11 60°C), presentano un picco molto intenso ad un valore di 2θ di 27° tipico di un materiale amorfo, attribuibile all'acido tannico [79], dimostrato dalla figura comparativa seguente.

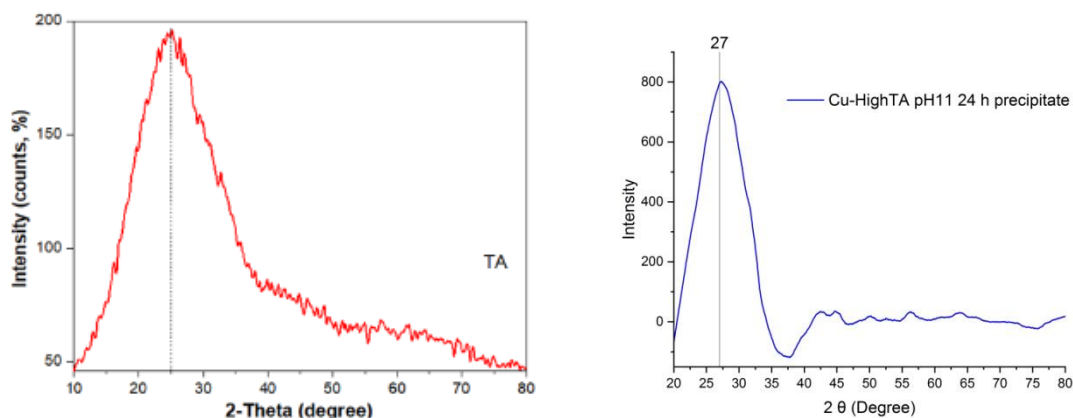


Fig 6.30 a destra misura XRD da [79], a sinistra misura XRD del campione Cu-HighTA pH11 24h

Nella misura dei campioni di precipitato non sono distinguibili picchi relativi a fasi cristalline di CuO e Cu₂O.

6.4.4 ANALISI MORFOLOGICA TEM

In questa analisi morfologica, sono stati esaminati due differenti campioni :

- Cu-HighTA pH11 24 h
- Clinoptilolite funzionalizzata con acido tannico 0,026M + CuSO₄ 0,1M e portato a pH 11

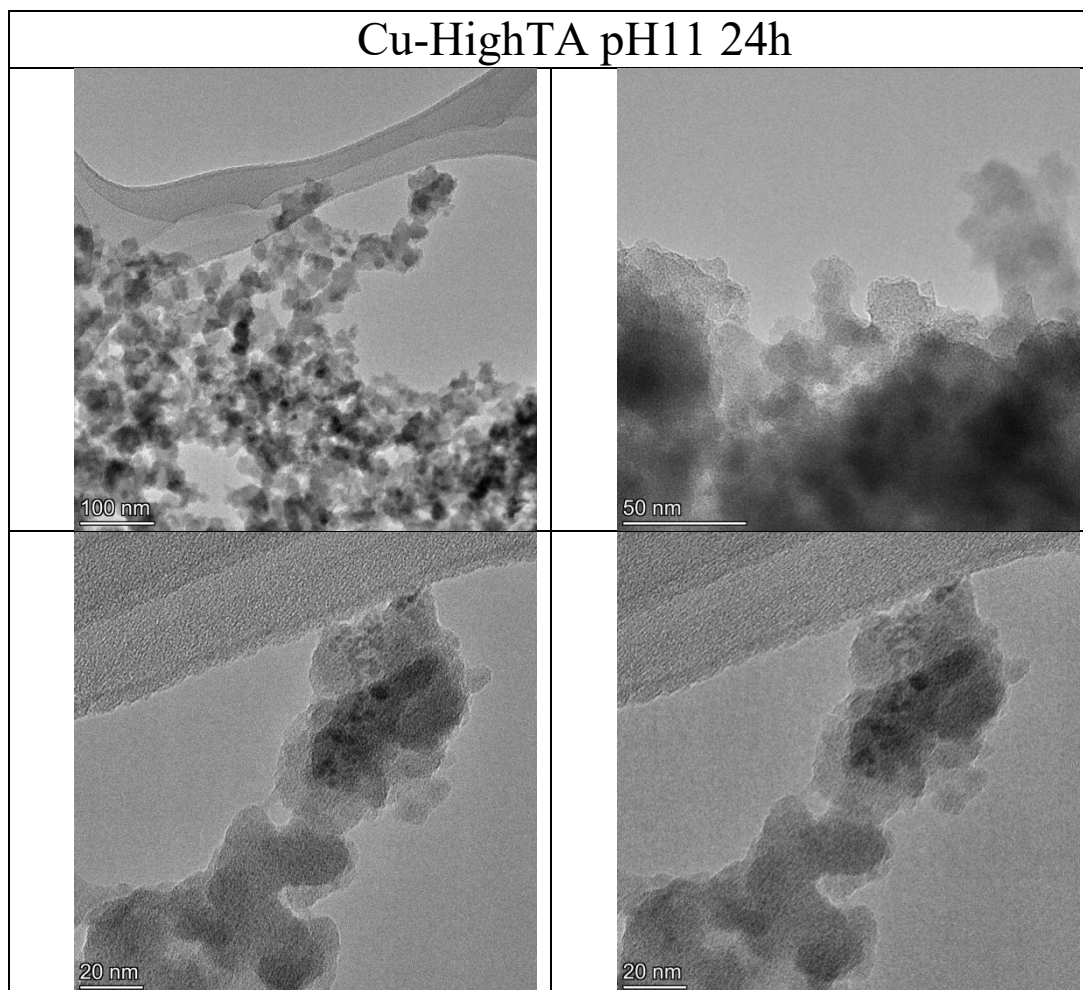


Fig 6.31 immagini TEM del campione Cu-HighTA pH11 24h

Le immagini TEM del campione evidenzia come le nanoparticelle di ossido di Cu, formano degli agglomerati di dimensioni di circa 15nm.

Il secondo campione riguarda la funzionalizzazione della clinoptilolite con acido tannico con concentrazione di 0,026M, il campione sarà chiamato Clino-HighTA-Cu pH11 successivamente ai processi di filtraggio, lavaggio e asciugatura, viene fatto reagire con 10ml di soluzione di CuSO_4 0,1M e tamponato con NaOH 0,5M fino ad un pH pari a 11, la ragione dell'utilizzo dell'alta concentrazione di acido tannico e dell'elevato pH, è da attribuirsi ai risultati ottenuti precedentemente nell'analisi UV-VIS, inoltre l'elevato pH permette la formazione di una quantità maggiore di gruppi chinonici, aumentando il potere riducente.

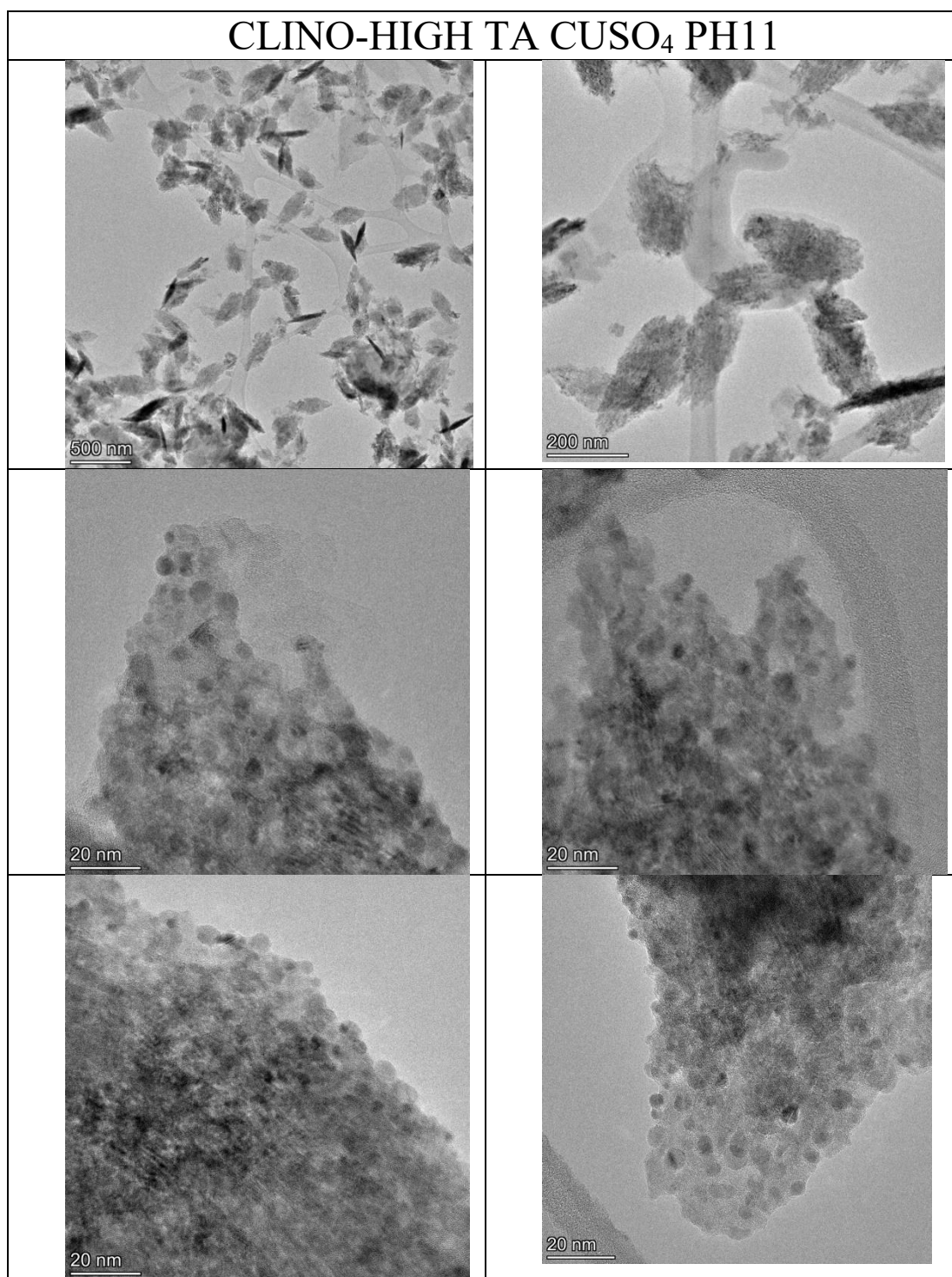


Fig6.32 immagini TEM del campione CLINO-HIGHTA CuSO₄ PH11

Il campione è formato da numerosi agglomerati, ad ingrandimenti maggiori si possono distinguere nanoparticelle sferiche di dimensioni di circa 5 nm che ricoprono le particelle di Clinoptilolite

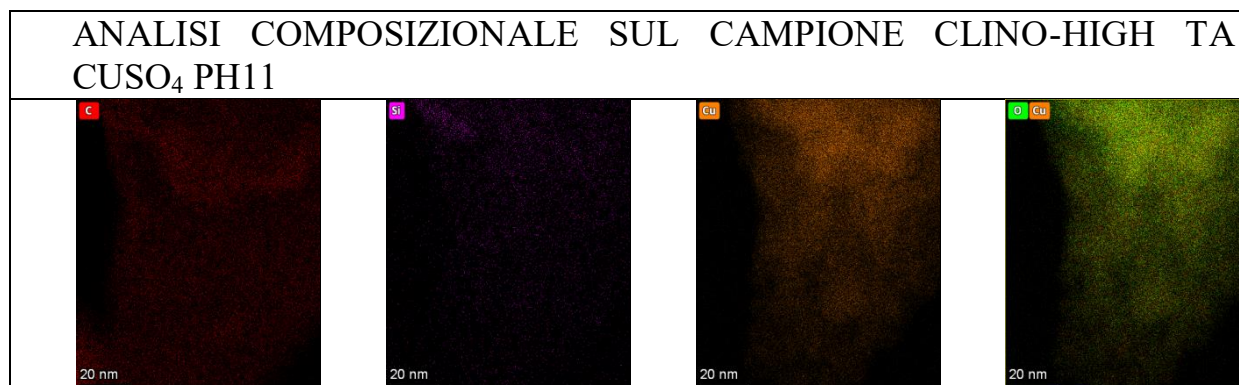


Fig6.33 Analisi EDS dove evidenzia la quantità di C, Si,Cu e O

Dall'analisi EDS si può notare che i campioni risultano totalmente ricoperti da uno strato di Cu che rende difficile il riconoscimento delle nano particelle e limitare la porosità della matrice zeolitica.

6.5 ANALISI DEL CAMPIONE CLINOPTILOLITE/TA/CuSO₄

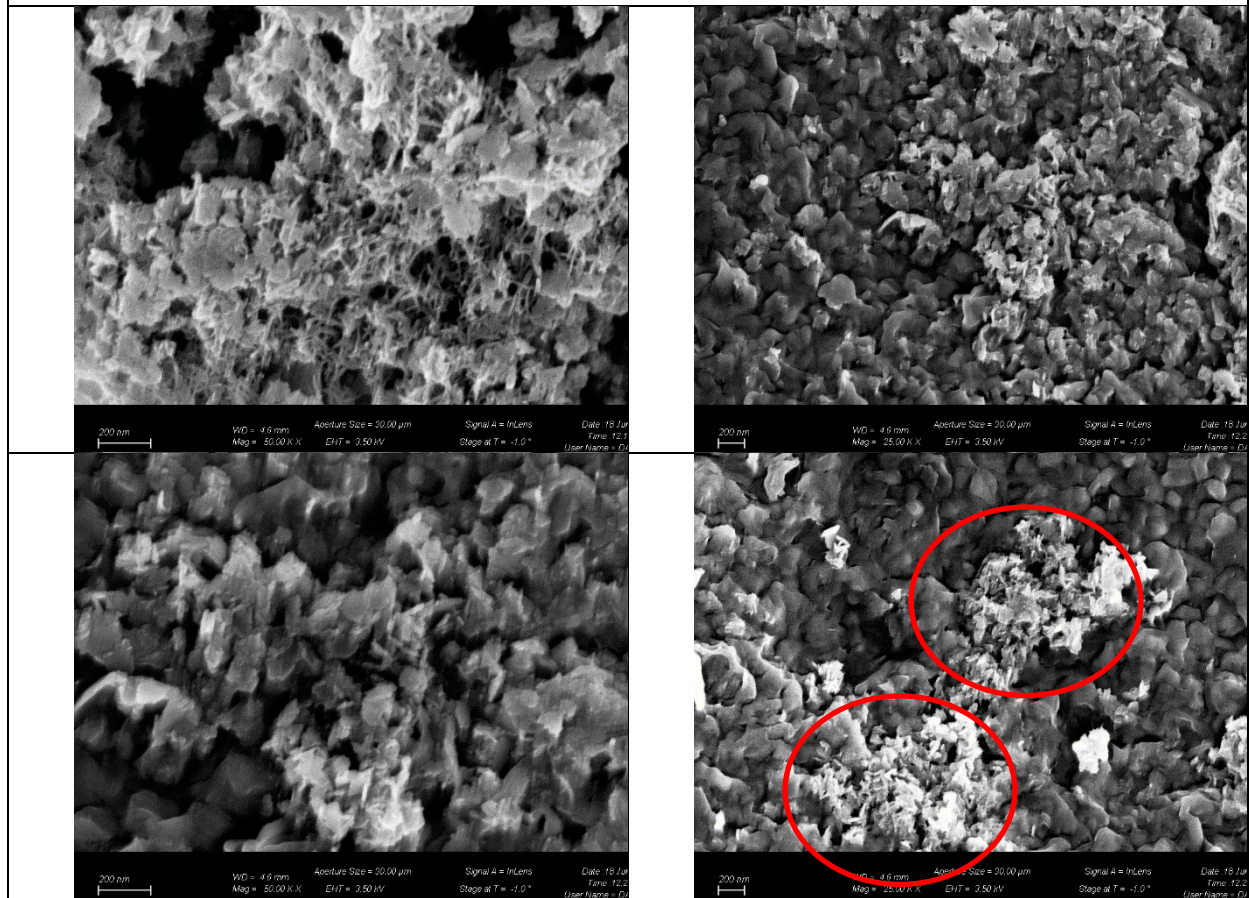
Con i risultati ottenuti si procede all'analisi di un campione completo, che implica la reazione tra la clinoptilolite funzionalizzata con acido tannico ad una concentrazione di 0,006M con una soluzione di CuSO₄ 0,1M, da qui in poi chiamato Clino-TA-Cu e successivamente il pH viene portato ad un valore di 11. I due campioni differiscono per il tempo complessivo di reazione tra la clinoptilolite funzionalizzata e il CuSO₄, che in un campione è 3h (campione analizzato precedentemente al TEM), mentre nell'altro di 24h

Visto i risultati precedenti, oltre ad aumentare il pH e la concentrazione di acido tannico, si esegue un'analisi dopo 24h di reazione con il sale di rame, per verificare se il tempo di reazione varia la morfologia e le proprietà delle nano particelle di CuO e Cu₂O .

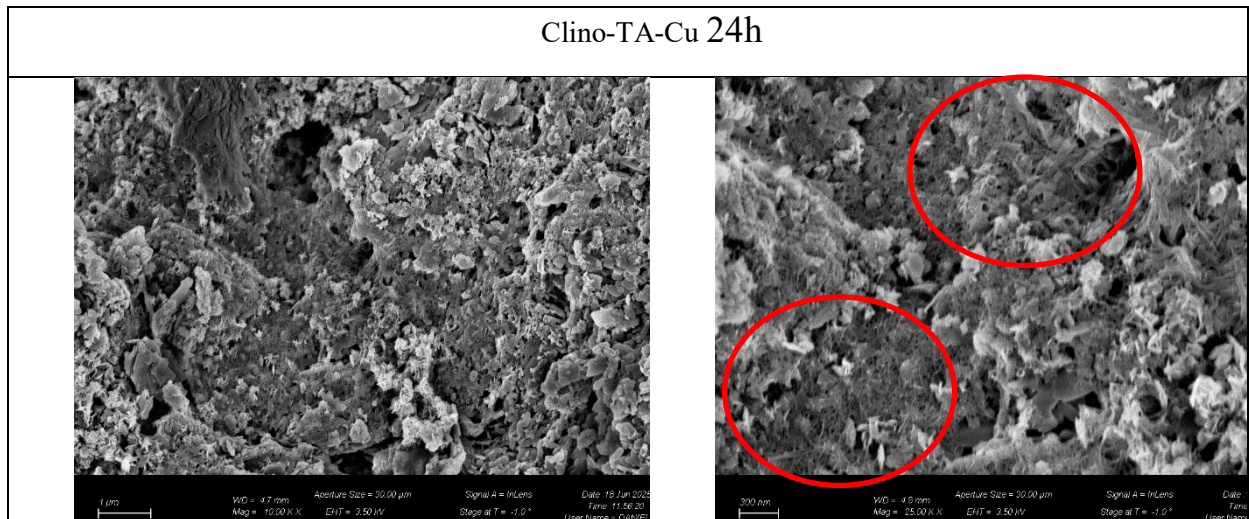
6.5.1 ANALISI MORFOLOGICA

La prima caratterizzazione morfologica è tramite il FESEM che confronta i due campioni.

Clino-TA-Cu 3h



Clino-TA-Cu 24h



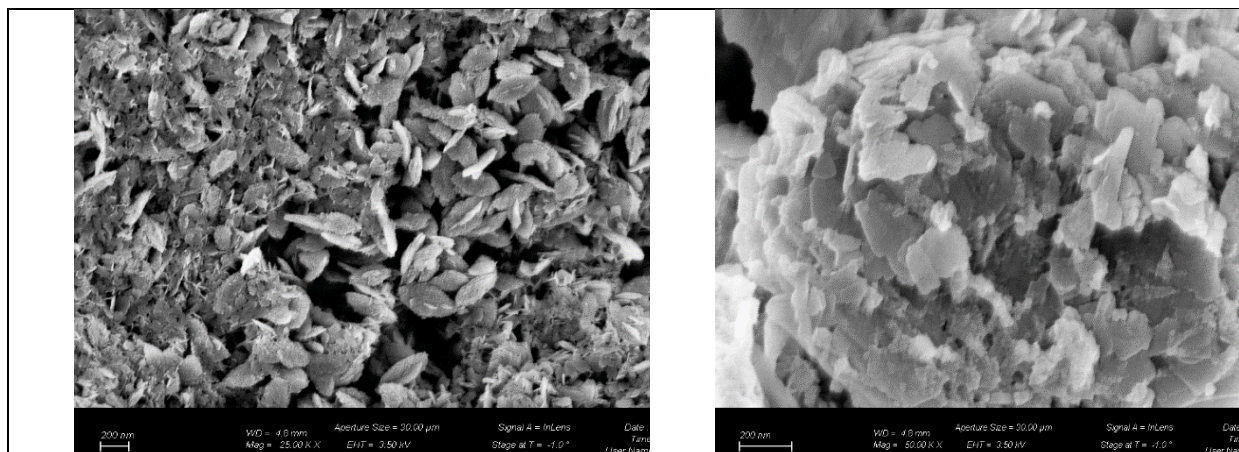


Fig 6.34 immagini FESEM dei campioni Clino/TA/CuSO₄ dopo 3h e dopo 24 h di reazione di riduzione

Dalle immagini FESEM si nota la presenza di alcune nano particelle (indicate dai cerchi rossi) nel campione che ha reagito per 3h con il CuSO₄, mentre sul campione che ha reagito per 24h è visibile un rivestimento e alcuni cristalli, sempre evidenziati dai cerchi rossi.

6.5.2 ANALISI EDS

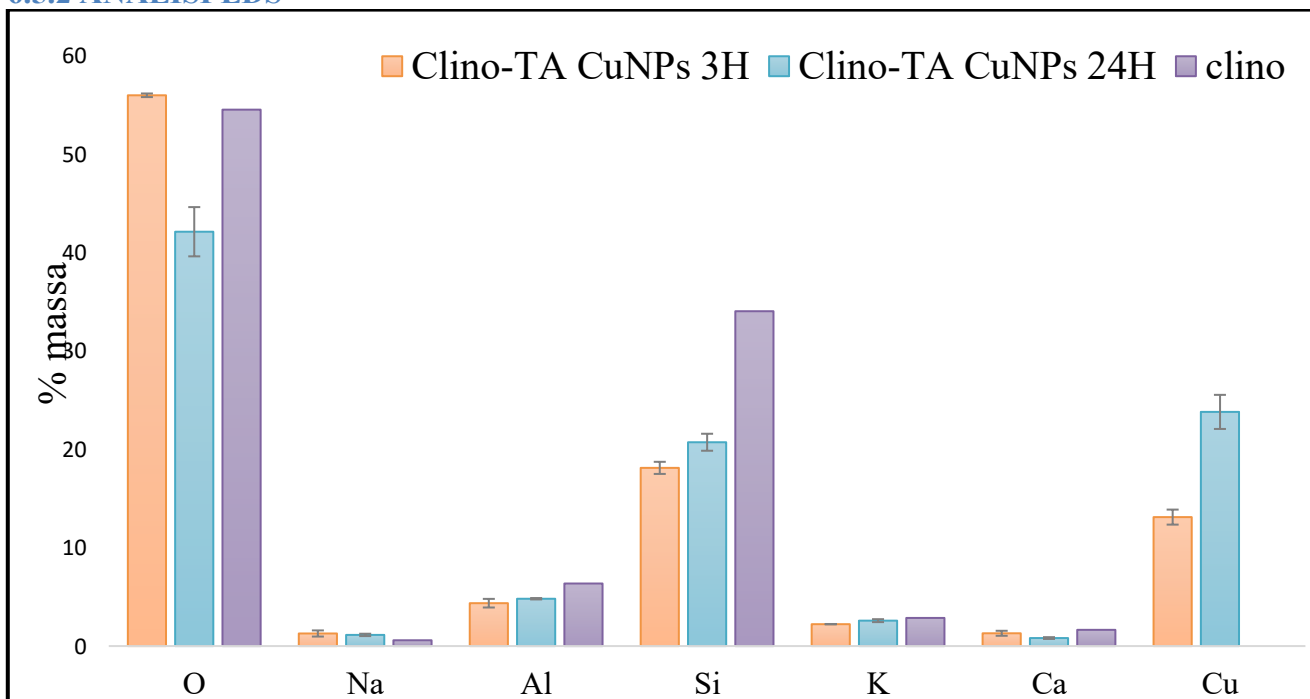


Fig6.35 Analisi EDS sui due campioni di 3h e 24 h

L'indagine EDS evidenzia una maggiore quantità di rame presente nel campione di 24h,

6.5.3 ALONE DI INIBIZIONE BATTERICO

Di seguito si riportano i risultati delle prove antibatteriche , realizzato con le medesime modalità utilizzate in precedenza.

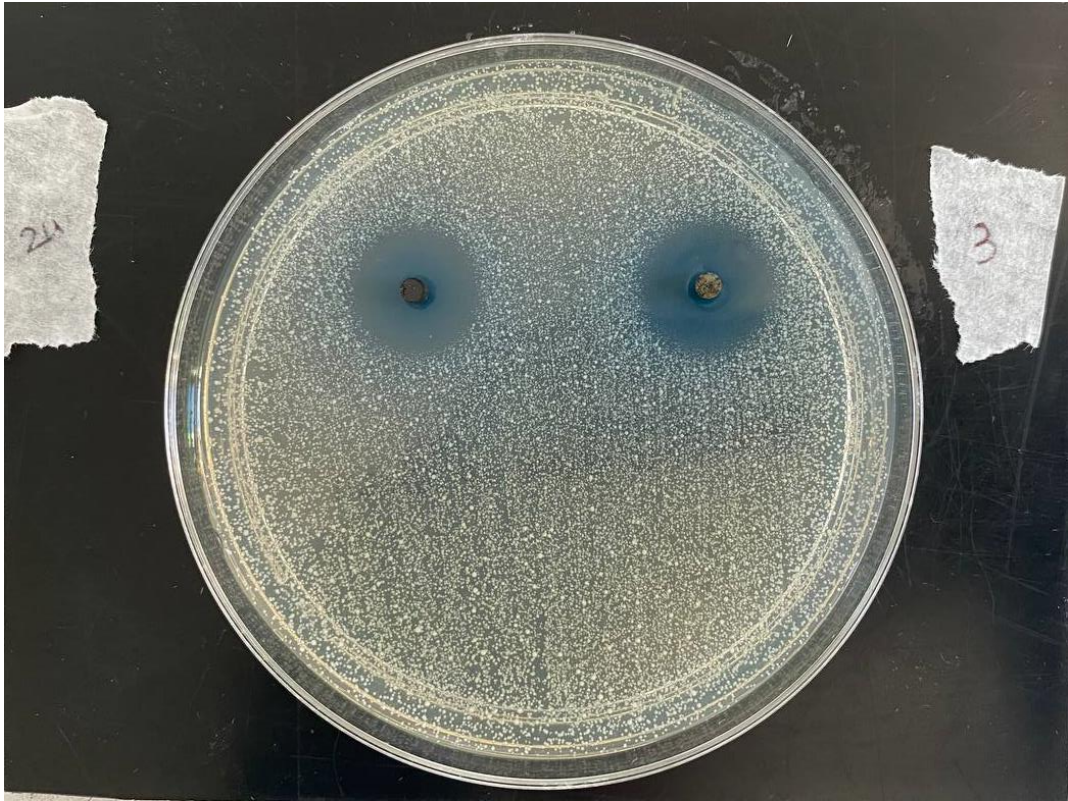


Fig6.36 prova di inibizione batterica,dopo un tempo di incubazione di 24h, a destra è presente il campione delle 24h e a sinistra il campione il campione 3h

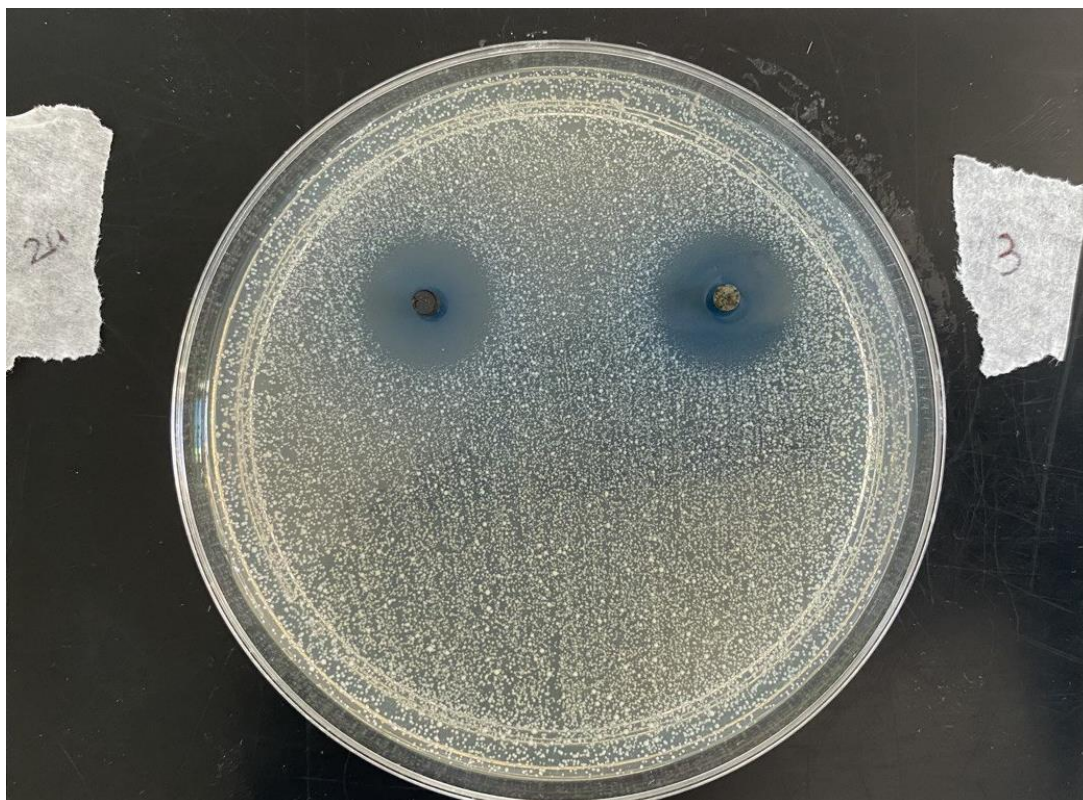


Fig 6.37 prova di inibizione batterica, dopo un tempo di incubazione di 48h, a destra è presente il campione delle 24h e a sinistra il campione il campione 3h

La piastra petri è seminata con il ceppo batterico della prova precedente, *S. epidermidis*, entrambe le polveri dei campioni sono state pressate sotto forma di pastiglia e introdotte nella piastra, il campione delle 24 h è posizionato sulla sinistra e quello delle 3h sulla destra come indicato nella figura precedente.

I campioni sono rivalutati dopo 24 h di incubazione e dopo 48 h di incubazione, dove non si registrano variazioni di ampiezza degli aloni di inibizione.

Entrambi i campioni dimostrano un buon potere antibatterico, l'alone di inibizione è di circa 0,5 cm dal bordo del campione, non si notano evidenti differenze tra i due campioni.

6.6 FUNZIONALIZZAZIONE CON ACIDO GALLICO

L'acido gallico è uno dei costituenti dell'acido tannico, è presente in numerose piante come the, limoni ed uva, è un ottimo antiossidante e permette di rimuovere i radicali liberi all'interno dell'organismo.

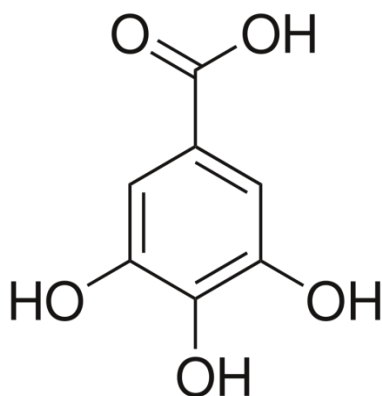


Fig6.38 struttura dell'acido gallico

Utilizzando una molecola più semplice, rispetto all'acido tannico, è possibile capire meglio il processo riduttivo; a pH basici, anche l'acido gallico forma gruppi chinonici.

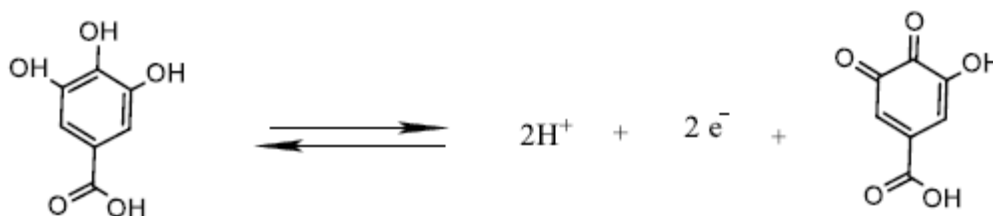


Fig 6.39 reazione di ossidazione dell'acido gallico

La clinoptilolite è stata funzionalizzata con l'acido gallico, seguendo il medesimo protocollo utilizzato per l'acido tannico.

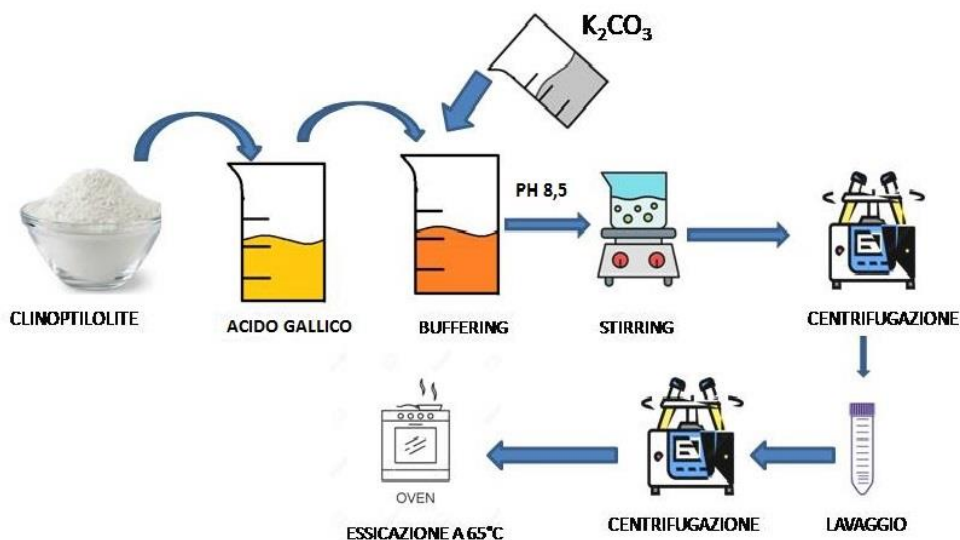


Fig6.40 processo di funzionalizzazione della clinoptilolite con l'acido gallico

200 mg di Clino sono state funzionalizzate con 10 ml di acido gallico 0,06M, il pH è stato portato a 8,5 utilizzando K_2CO_3 0,1M, il tutto è stato sottoposto ad agitazione meccanica per 3 h e le polveri ottenute sono state prima lavate con acqua bi-distillata ed in seguito filtrate, il materiale ottenuto è essiccato a 65°C per mezzo di una stufa.

6.6.1 ANALISI FTIR

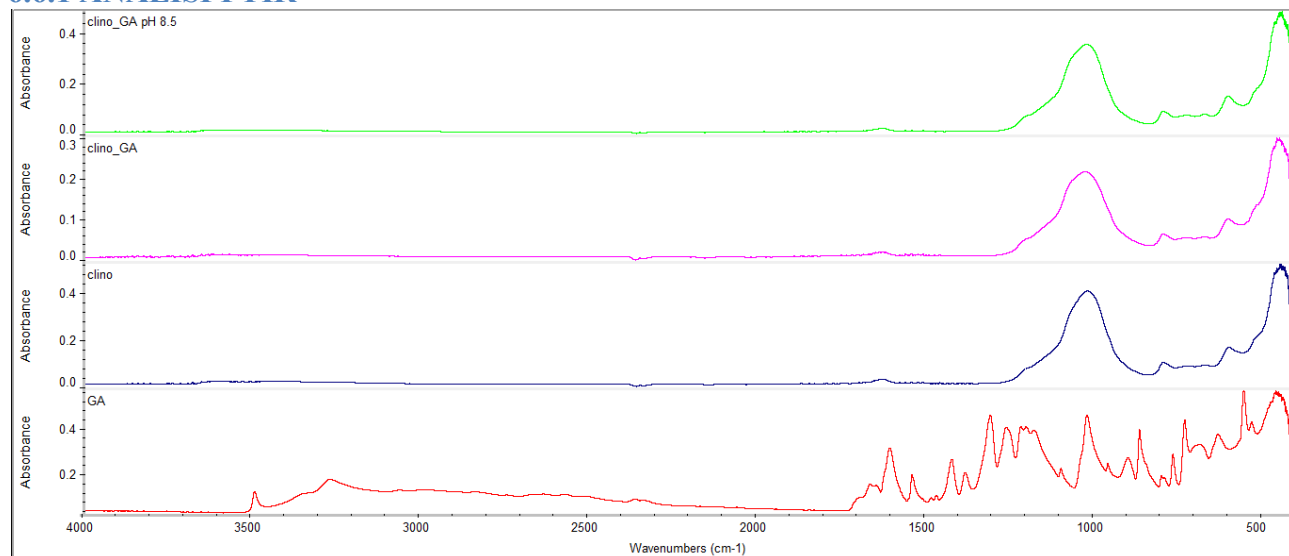


Fig6.41 spettro FTIR della clinoptilolite funzionalizzata con acido gallico

Per convalidare l'avvenuta funzionalizzazione, la polvere viene analizzata tramite FTIR, ma lo spettro ottenuto non evidenzia la presenza dell'acido gallico sulla superficie della zeolite, forse a causa delle dimensioni ridotte della molecola.

Per ovviare a questo problema si è ricorso ad un metodo alternativo, l'analisi spettrofotometrica utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu.

6.6.2 ANALISI CON IL METODO FOLIN-CIOCALTEU

Il reattivo di Folin-Ciocalteu, è utilizzato per la determinazione di fenoli, polifenoli e, più in generale, di sostanze con capacità riducenti. La sua composizione si basa su una miscela di due eteropoliacidi in forma di sali di sodio: il fosfomolibdato di sodio ($\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) e il fosfotungstato di sodio ($\text{Na}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$). Nel reattivo, il molibdeno e il tungsteno si trovano nello stato di ossidazione +6, che corrisponde alla forma ossidata e più stabile di questi elementi nei polianioni. Quando il reagente viene a contatto con composti fenolici o altre molecole riducenti, una parte degli atomi di molibdeno e tungsteno subisce una riduzione parziale dal numero di ossidazione +6 a +5. Questa trasformazione genera un complesso di colore blu intenso, la cui intensità è proporzionale alla quantità di sostanza riducente presente nel campione. Questo processo porta alla formazione di un complesso blu. Il massimo assorbimento si osserva generalmente nell'intervallo 690–710 nm, ma può variare leggermente in funzione della concentrazione dei fenoli e del pH della soluzione alcalina, nel nostro caso utilizziamo una lunghezza d'onda di 760 nm.

Procedura per le polveri :

- polvere campione
- 8 ml di H_2O
- 0,5 ml reattivo di Folin-Ciocalteu
- 1,5 ml di Na_2CO_3 (20% in peso)

Procedura per le soluzioni:

- 2ml di soluzione campione (diluata 1 a 100)
- 6 ml di H_2O

0,5 ml di reattivo Folin-Ciocalteu
1,5 ml di Na₂CO₃ (20% in peso)

Il tempo di reazione è di 2 ore, utilizzando la soluzione precedentemente diluita perché risulterebbe troppo concentrata, si analizzano i campioni mediante spettroscopia Uv Vis, ad una lunghezza d'onda di 760nm. Successivamente, per mezzo della retta di taratura, si estrapola la concentrazione dell'acido gallico libero, ovvero quello non assorbito dalle polveri.

Mentre per le soluzioni ottenute dopo filtraggio, si esegue una misura spettrofotometrica diretta.

Le misure sono ripetute preparando due soluzioni per concentrazione, il modo da avere una curva d'errore da inserire nelle misure.

Il valore della concentrazione è estrapolato in base alla retta di taratura calcolata nel capitolo precedente di valore: $y=40,093x+0,1214$

Il valore della concentrazione risulta: $C=Abs-0.1214/40.093$, dove Abs è il valore di assorbanza della misura UV-VIS. Alle soluzioni viene applicato un valore di correzione della diluizione (1:100)

sample	Abs (760 nm)	C (mg/ml)	media	st dev
clino/GA pwd 1	1,369	0,031118	0,032602	0,002099
clino/GA pwd 2	1,488	0,034086		
clino/GA pwd 1 pH 8.5	1,104	0,024508	0,022276	0,003157
clino/GA pwd 2 pH 8.5	0,925	0,020043		
clino/GA sol 1	2,106	4,949991	5,027312	0,109347
clino/GA sol 2	2,168	5,104632		
clino/GA sol 1 pH 8.5	1,127	2,508169	2,467014	0,058201
clino/GA sol 2 pH 8.5	1,094	2,42586		
clino pwd	0,164	0,006127	0,006127	
GA	3,427	8,244831	8,244831	

Tabella 6.1 riassuntiva dell'analisi spettrofotometrica della clinoptilolite funzionalizzata con acido gallico

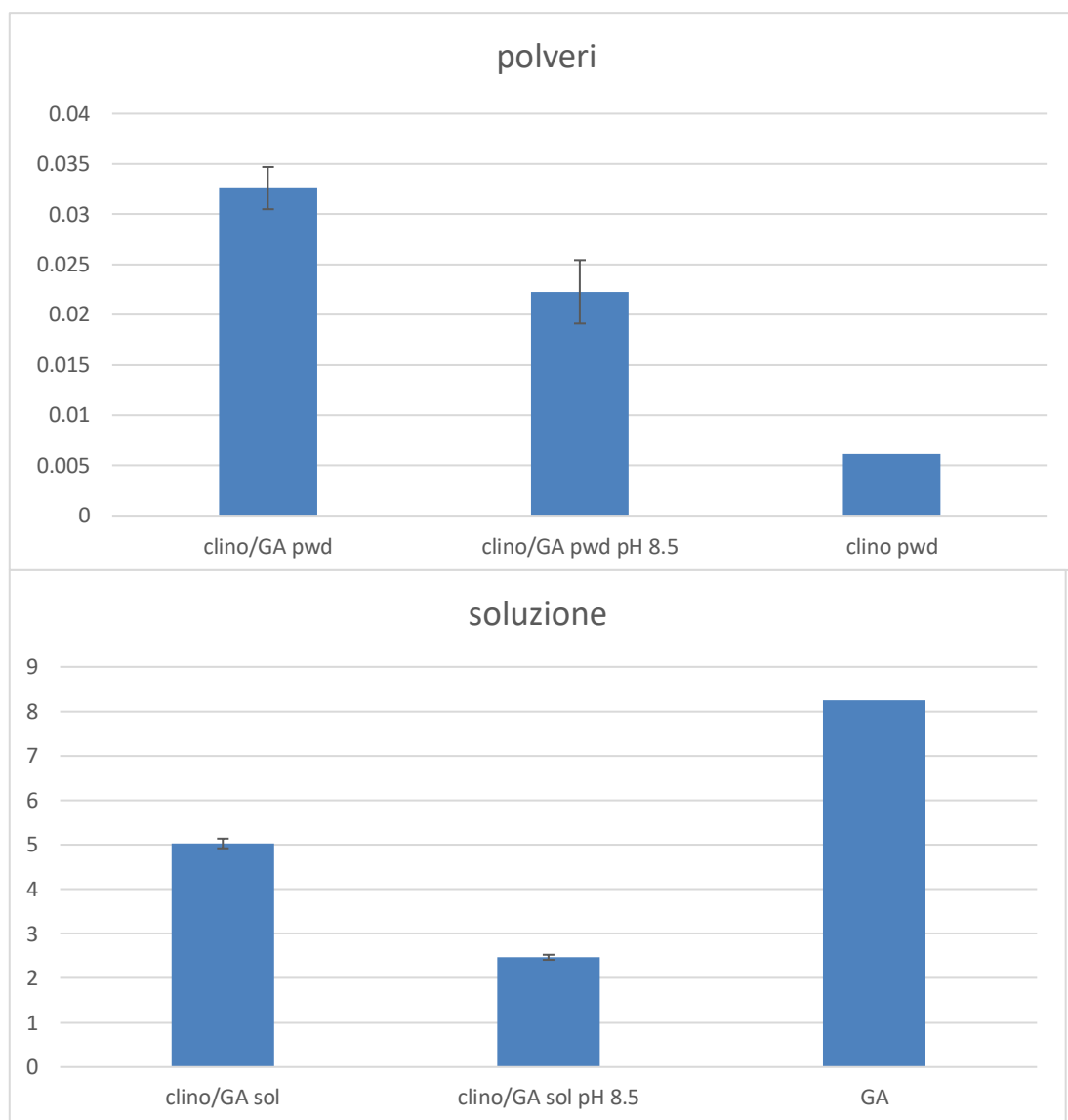


Fig 6.42 misure di funzionalizzazione acido gallico/clinoptilolite

La diminuzione della concentrazione di acido gallico libero, dimostra che è avvenuta la funzionalizzazione sulla superficie della clinoptilolite, che risulta essere più efficiente aumentando il pH.

Dall'analisi sulle soluzioni si osserva che, a seguito della funzionalizzazione, entrambe le concentrazioni risultano inferiori rispetto a quella di GA di controllo, con una riduzione lievemente più marcata nel campione a pH più elevato, confermando l'avvenuta funzionalizzazione delle polveri di clinoptilolite.

Un'ulteriore prova è stata condotta per determinare come l'incremento di pH tramite un agente basificante (NaOH 0,1M) prima o dopo l'aggiunta del sale di rame modificasse il campione ottenuto.

Valutazione influenza del pH su $[GA] = 1 \text{ mg/ml}$ su :

GA 0.006M + CuSO₄ 0.1 M

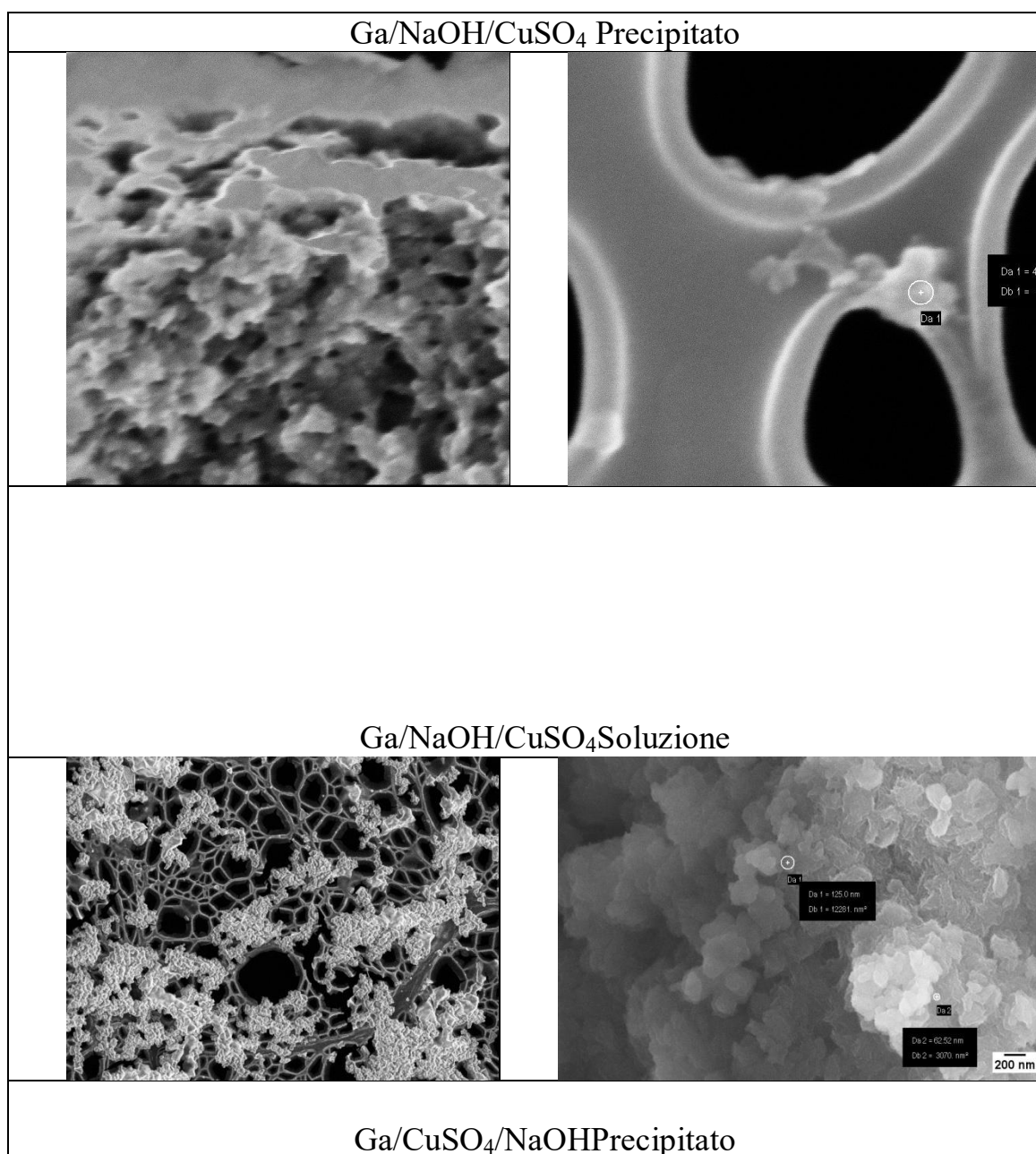
GA 0.006M + tampone NaOH 0,1M a pH 8.5 + CuSO4 0.1M

GA 0.006M + CuSO4 0.1 M + tampone NaOH 0,1M a pH 8.5

Le polveri hanno reagito a RT per 3H, lavate e lasciato asciugare per 18h a 70°C.

I campioni hanno subito una prima analisi morfologica al FESEM, le soluzioni ottenute, previo filtraggio, sono stati depositati su una apposita retina porta campioni e lasciati asciugare.

6.6.3 ANALISI MORFOLOGICA



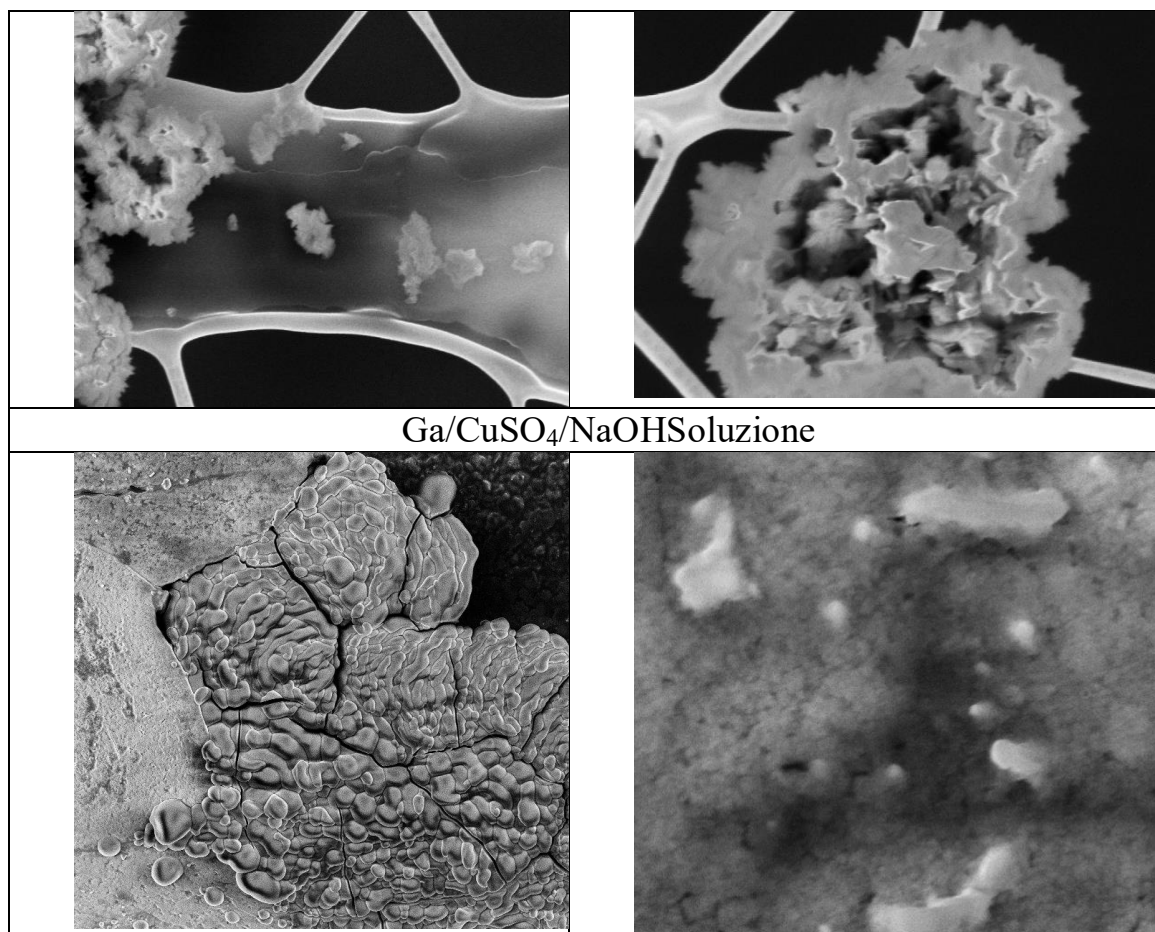


Fig 6.43 immagini FESEM delle particelle derivate dalla reazione tra acido gallico e CuSO_4 , variando l'ordine di aggiunta dell'agente alcalinizzante

Ad una prima analisi morfologica, le particelle del campione GA/NaOH/CuSO_4 , hanno dimensioni tra i 50 ed i 100nm, mentre nel campione $\text{GA/CuSO}_4/\text{NaOH}$ le particelle hanno l'aspetto di fiocchi con bordi non definiti, dove risulta difficile isolare le singole nano particelle. Le nano particelle di entrambi i campioni risultano coese tra loro ipotizzando anche la possibile formazione di un complesso Ga-Cu.

6.6.4 ANALISI UV-VIS

La successiva indagine è una spettrofotometria UV-VIS, dove si è reso necessario diluire i campioni 1:10, per ottenere uno spettro senza fenomeni di saturazione. L'analisi è stata eseguita in assorbanza, in un intervallo tra i 200 nm e 800 nm.

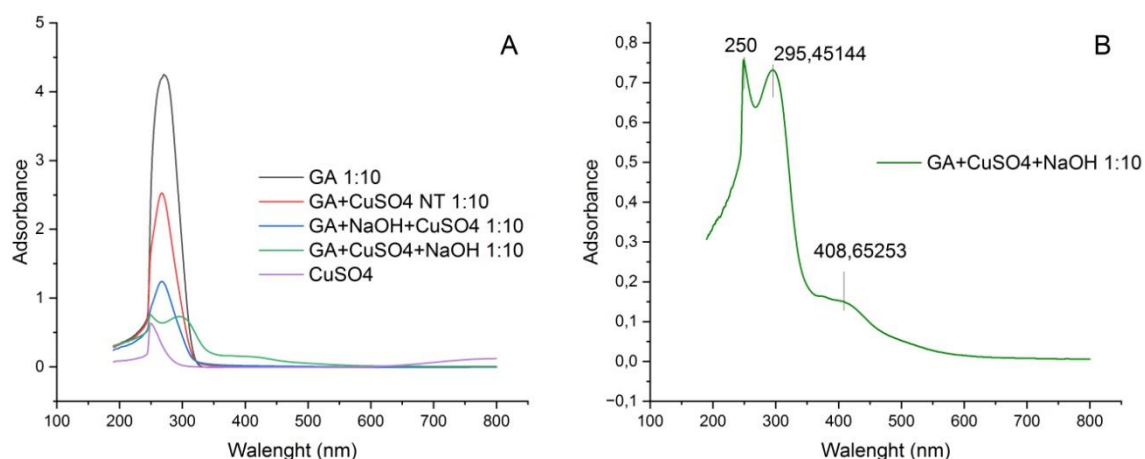


Fig6.44 misure spettrografia UV-VIS sui campioni di acido gallico

Le misure UV-VIS mostrano che solo il campione Ga/CuSO₄/NaOH diluito 1:10 mostra la formazione di nano particelle di ossido di rame. I picchi di questo campione risultano simili a quelli riscontrati con i campioni di CuSO₄ e acido tannico ad alta concentrazione. Il picco a 250 nm è riconducibile all'acido tannico, quello a 295 nm al CuO mentre il picco al valore più elevato, 408 nm è del Cu₂O. Questo indica che l'acido gallico ha un effetto riducente paragonabile all'acido tannico.

6.7 CAMPIONE CLINO/GA/CuSO₄

La clinoptilolite funzionalizzata con l'acido gallico viene fatta reagire con 10 ml di soluzione di CuSO₄ 0,1M, secondo il protocollo utilizzato per l'acido tannico. Il pH è portato ad un valore di 11 per mezzo di una soluzione di NaOH 0,1M.

6.7.1 EDS

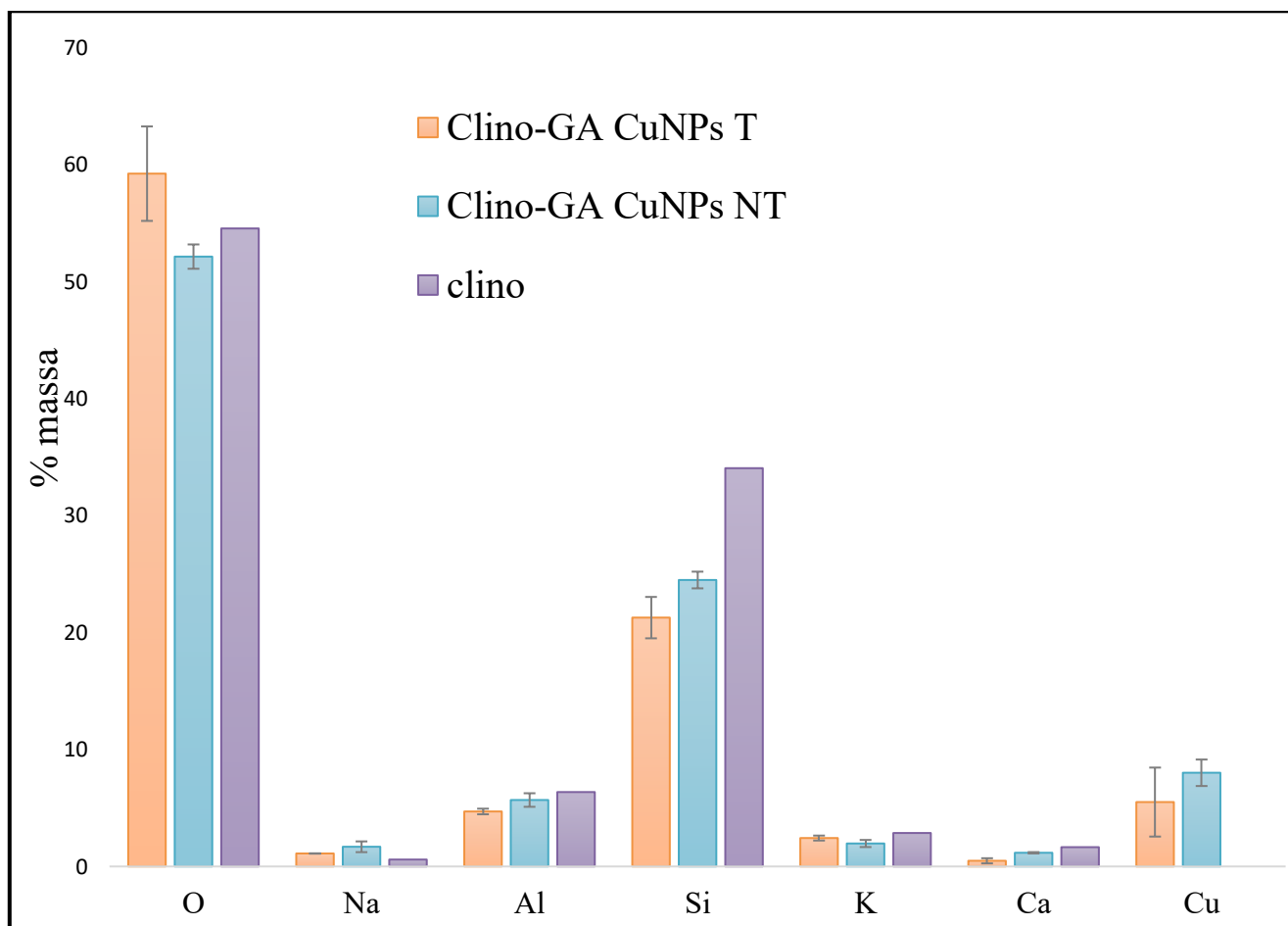


Fig 6.46 risultati analisi EDS sul campione Clino/GA/CuSO₄ dove T=tamponato a pH 8,5
NT=non tamponato

Il grafico dell'analisi EDS non mostra un'evidente differenza nella quantità di rame presente in entrambi i campioni. Il campione tamponato a pH 8,5 presenta barre d'errore più elevate. Per capire e evidenziare la possibile formazione di particelle si ricorre a un'analisi XRD.

6.7.2 ANALISI MORFOLOGICA

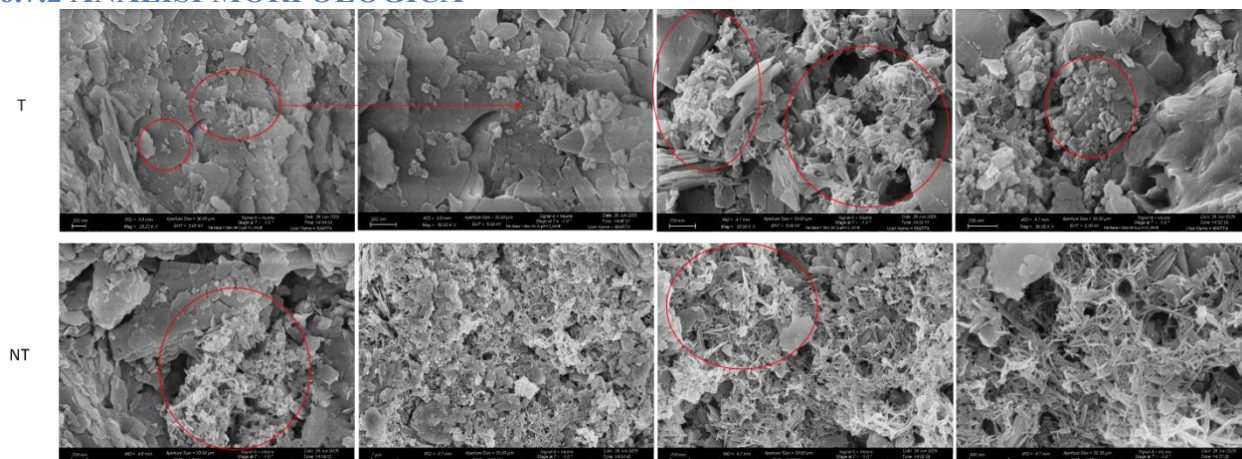


Fig 6.47 immagini FESEM di Clino/GA/CuSO₄ nella parte superiore sono presenti i campioni tamponati a pH 8,5 , mentre in basso sono presenti i campioni non tamponati

Il campione Clino/GA/CuSO₄ tamponato presenta particelle sferiche di dimensioni che presentano una distribuzione migliore rispetto ai campioni nei quali si è utilizzato l'acido tannico. Nel campione Clino/GA/CuSO₄ non tamponato emergono in misura maggiore cristalli di dimensione aghiforme.

6.7.3 ANALISI XRD

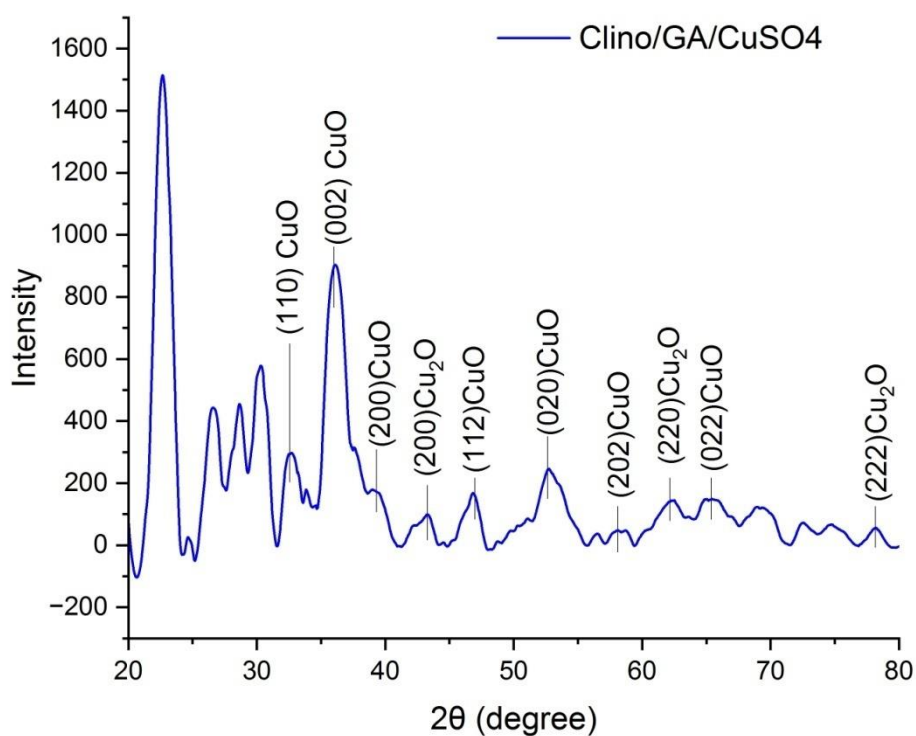


Fig6.45spettro XRD del campione GA/CuSO₄/NaOH

L'analisi XRD mostra una serie di picchi appartenenti sia alla clinoptilolite che agli ossidi di rame CuO e Cu₂O.

La posizione dei picchi del CuO corrispondono ai valori tabellari JCPDS file No. 05-661 che corrispondono agli angoli (2θ): 32,23°, 35,27°, 38,49°, 46,28°, 48,78°, 53,22°, 58,13°, 65,97° e 67,96° che corrispondono ai piani (110), (002), (200), (112), (202), (020), (202) e (022). [81]

Mentre per l'ossido Cu₂O i valori 2θ sono: 42,26°, 61,36° e 77,38° che corrispondono ai piani (200), (220) e (222) secondo ICDD #785—1326 [82]

l'utilizzo dell'acido gallico migliora la riduzione in situ, rispetto all'acido gallico, le particelle osservate al FESEM presentano una distribuzione migliore ed inoltre risultano più definite

6.7.4 ALONE DI INIBIZIONE DI INIBIZIONE BATTERICA

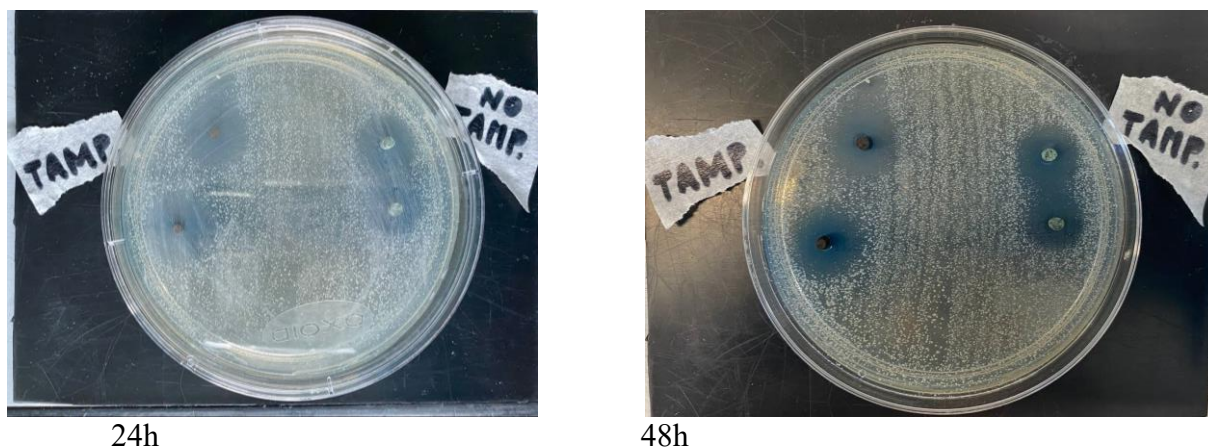


Fig 6.48 prova di inibizione batterica di Clino/GA/CuSO₄ sia tamponato a pH 8,5 sia senza variazione di pH, l'immagine di sinistra

Le polveri di Clino/GA/CuSO₄ in oggetto (sia quello tamponato a pH 8,5 che quello non tamponato), sono stati sottoposti ad un processo di pressatura, per formare delle pastiglie di dimensioni uguali tra loro, al fine di avere risultati confrontabili.

Le prove di inibizione batterica sono state condotte su colonie batteriche di *S.epidermidis*, la piastra è stata incubata per un totale di 48h, sono state condotte delle misure sull'alone di inibizione dopo 24 h e 48h, dove l'alone non mostra significative variazioni. L'alone misurato dal bordo di tutti i campioni, risulta essere mediamente 0,5 cm , confermando le proprietà antibatteriche degli stessi.

7 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi, si è dimostrato un buon potere riducente dell'acido tannico, che grazie ad un processo ecosostenibile, ha permesso la formazione di ossidi di rame (CuO e Cu_2O) con proprietà antibatteriche. Modificando le variabili chimiche come concentrazione dell'acido tannico e pH e variabili fisiche come temperatura e tempo di reazione è stato possibile ottenere condizioni per la formazione di nano particelle di ossido di rame, ma non ancora soddisfacenti.

Anche quando si svolge il processo completo, ovvero quando la matrice zeolitica funzionalizzata, reagisce con la soluzione di rame, le nano particelle di ossido di rame risultano presenti nella struttura zeolitica. L'analisi al TEM ha dimostrato che la matrice zeolitica viene ricoperta da un complesso contenente rame, denaturando in parte la porosità della matrice zeolitica.

Per risolvere questo problema, si è deciso di ricorrere ad una molecola di dimensioni inferiori e meno complessa come l'acido gallico, una parte costituente dell'acido tannico.

L'acido gallico ha dimostrato proprietà riducenti molto simili all'acido tannico. Gli ossidi formati presentano una geometria diversa, ma con una distribuzione ancora non uniforme. In futuro servirà ottenere, utilizzando l'acido gallico, nano particelle di ossido di rame che non formino complessi stabili sulla superficie della clinoptilolite, al fine di massimizzare l'area superficiale della zeolite, ed inoltre servirà una caratterizzazione per analizzare l'effettiva area superficiale della zeolite dopo il processo di riduzione e comprendere meglio il meccanismo di riduzione e/o complessazione degli ossidi di rame con questa tipologia di riducenti ecosostenibili.

Future analisi riguarderanno lo studio della porosità della Clino/Ga/CuNP tramite misure BET per comprendere come la porosità e la morfologia dei pori della clinoptilolite si modifica dopo la crescita delle nano particelle contenenti Cu. Un ulteriore approfondimento riguarda gli effetti catalitici e foto catalitici che potrebbero avere le nano particelle di ossido di rame presenti sulla clinoptilolite, che oltre ad avere un potere antibatterico, potrebbero anche foto degradare diversi inquinanti presenti nell'aria.

8 BIBLIOGRAFIA