

colorata in giallo (Figura 4.5). L'analisi diffrattometrica mostra che il colore è adsorbito sulla superficie dell'idrotalcite ma non intercalato.



Figura 4.5. HTlc ZnAl ottenuta dopo contatto con il bagno tintorio di *Reseda lutea*

Co-precipitazione - Sono state eseguite due prove di co-precipitazione:

1) a 100 ml del bagno di colore sono stati aggiunti i sali dei metalli bi- e trivalenti, rispettivamente 10 g di $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ e 16 g di $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ e la precipitazione è stata ottenuta aumentando gradualmente il pH della soluzione fino a 10.7, tramite sgocciolamento di una soluzione di NaOH 2M.

2) al bagno di colore sono state contemporaneamente aggiunte una soluzione acquosa dei due sali e una soluzione di NaOH 2M, aggiustando il pH a 10.7.

I co-precipitati così ottenuti sono stati filtrati e seccati; entrambe le polveri ottenute risultano estremamente colorate.

Le analisi di diffrattometria di raggi X mostrano che, anche in questo caso, non si ottengono dei composti di intercalazione e che la colorazione gialla dei materiali deriva dalla precipitazione cristallina del colorante sulla superficie del solido lamellare (Figura 4.6).

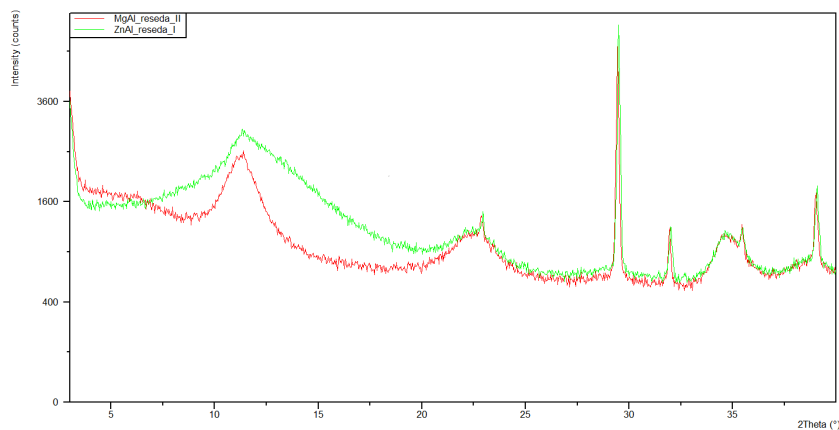


Figura 4.6. Diffattogrammi di idrotalciti MgAl ottenute per co-precipitazione in presenza del bagno tintorio di *Reseda lutea*

Studio della co-intercalazione dei flavonoidi in idrotalciti con acidi grassi

I dati ottenuti, lavorando sia con flavonoidi puri sia con quelli ottenuti da estrazione, indicano una difficoltà nell'ottenere un prodotto di intercalazione. Si è deciso quindi di provare un diverso approccio che cerca di sfruttare le proprietà chimico fisiche dei flavonoidi. L'idea è stata quella di provare a co-intercalare i flavonoidi insieme a specie ad essi affini ed in grado al tempo stesso di intercalarsi facilmente nella matrice idrotalcitica. La scelta è ricaduta sugli acidi grassi, in quanto il loro processo di intercalazione nelle idrotalciti è ben caratterizzato e sono noti per la loro interazione con sostanze lipofile come i flavonoidi.

In una prima esperienza è stata prodotta una miscela fisica macinando in mortaio 300 mg di idrotalcite ZnAl-Oleato con 0.5 ml di una soluzione 0.01 M di quercitina in etanolo. La polvere essiccata ottenuta risulta gialla ma l'analisi ai raggi X non mostra variazioni rispetto all'idrotalcite di partenza.

Per favorire il processo di co-intercalazione si è deciso di partire da una soluzione acquosa satura di flavonoidi (pH alcalino) e di ripetere la prova in mortaio in presenza di glicole etilenico come umettante. La polvere colorata ottenuta mostra un cambiamento nelle distanze interstrato in accordo con l'avvenuta co-intercalazione dei flavonoidi all'interno degli spazi interlamellari. Inoltre il materiale mantiene la colorazione anche dopo un lavaggio di due giorni in etanolo, indicando che il colore è stato in parte adsorbito sulla superficie e in parte co-intercalato nell'idrotalcite insieme all'acido oleico. Il prodotto ottenuto con questa procedura è definito Idrotalcite oleato /quercitina (HT-ole-quercitina).

Conclusione: sebbene non sia facile intercalare flavonoidi direttamente nelle idrotalciti, in opportune condizioni questi possono essere co-intercalati con acidi grassi. L'esatto procedimento per ottenere questi prodotti sarà descritto nella relazione finale al fine di poter svolgere delle operazioni di protezione industriale.

PROVE DI TINTEGGIO CON QUERCETINA E RESEDA

Prima di eseguire i test tintori tramite i macchinari preindustriali della tintorie Ferrini Srl gli operatori della Prolabin & Tefarm hanno verificato le proprietà tintorie dei vari coloranti ottenuti sul cashmere attraverso delle prove di laboratorio. In un primo set di esperienze è stato testato il prodotto ottenuto per co-intercalazione della quercitina nelle idrotalciti-oleato mentre in una seconda serie di esperienze è stato utilizzato il prodotto di intercalazione ZnAl-oleato in bagni tintori di Reseda lutea.

Le capacità tintorie della quercetina co-intercalata in idrotalciti

Prova 1

Il tinteggio è stato effettuato utilizzando un'HT ZnAl_oleato macinata con quercitina, in rapporto 2:1 p/p. La prova di tinteggio in laboratorio è stata condotta utilizzando:

- 200 mg di fiocco
- 20 mg di HT-ole-quercitina
- 40 ml di una soluzione di acido acetico 1%

L' HT-ole-quercitina è stata aggiunta sotto agitazione alla soluzione acida, successivamente è stato aggiunto il fiocco e il tutto è stato scaldato fino a raggiungere la temperatura di 60°C, cui la dispersione è stata mantenuta per 1 ora. Terminato il tinteggio il fiocco è stato lavato con:

- _ Acqua alla temperatura di tinteggio (60°C);
- _ Soluzione di ammoniaca (2 g/L)
- _ Ecophal (1 g/L)
- _ Acqua alla temperatura di tinteggio

Terminati i lavaggi il fiocco è stato lasciato asciugare in stufa a 37°C.

Prova 2

E' stata effettuata una prova utilizzando una ZnAl_oleato sub-micrometrica macinata con quercitina, in rapporto 2:1 p/p. La procedura seguita è la stessa, ad eccezione della soluzione acida di tinteggio cui è stato aggiunto il detergente Tween 80 allo 0,1% come agente stabilizzante.

Come osservabile in Figura 4.7 (dx) la perdita di colore si verifica per lo più nel primo lavaggio con acqua e in quello con Ecophal.

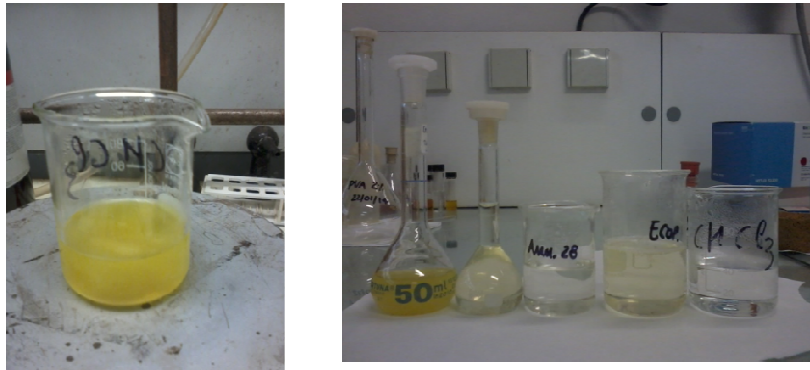


Figura 4.7. Acqua di tinteggio (sin) e soluzioni di lavaggio (dx) della prova 2

Prova 3

Il tinteggio con ZnAl_oleato sub-micrometrica macinata con quercitina è stato ripetuto utilizzando Tween 80 allo 0,5% (Figura.4.8).



Figura 4.8. Acqua di tinteggio e soluzioni di lavaggio della prova 3

Prova 4

Allo scopo di comparare l'efficienza della colorazione è stata effettuata una prova di tinteggio con quercitina pura, approssimativamente nella stessa quantità di quella associata alla ZnAl_oleato nelle precedenti prove di tinteggio. Sono quindi stati utilizzati:

- 200 mg di fiocco
- 6,6 mg di quercitina
- 40 ml di una soluzione di acido acetico 1% e Tween 80 0,1 % (Figura 4.9)

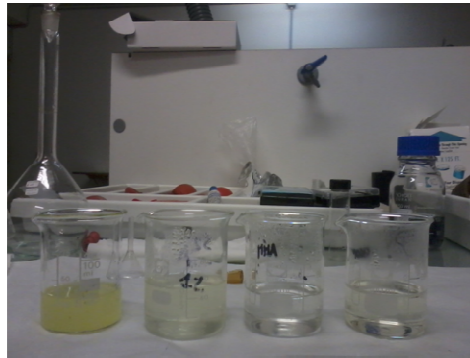
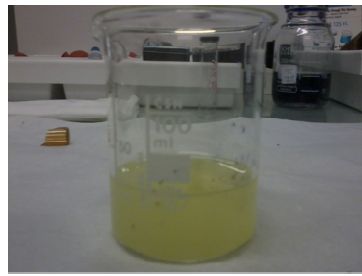


Figura 4.9. Acqua di tinteggio e soluzioni di lavaggio della prova 4

Prova 5

La prova è stata ripetuta nelle stesse condizioni ma utilizzando una concentrazione di colorante maggiore, pari in peso alla quantità di HT_quercitina usata nelle prove precedenti.

- 200 mg di fiocco
- 20 mg di quercitina
- 40 ml di una soluzione di acido acetico 1% e Tween 80 0,1 %

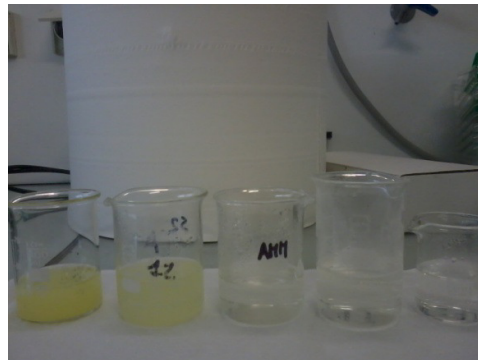


Figura 4.10. Acqua di tinteggio e soluzioni di lavaggio della prova 5

Il tinteggio con quercitina pura, in entrambi i casi, conferisce al fiocco una colorazione molto blanda e il colore viene rilasciato abbondantemente già nel primo lavaggio con acqua (Figura 4.10).

Prova 6

La prova è stata effettuata a 60°C per un'ora, come negli altri casi, ma mettendo quercitina ed idrotalcite ZnAl-OLE sub micro negli stessi rapporti in cui si trovano nel sistema macinato, per verificare l'importanza del ruolo dell'idrotalcite-oleato.

- 200 mg di fiocco
- 6,6 mg di quercitina
- 14,4 mg ZnAl_oleato sub-micro
- 40 ml di una soluzione di acido acetico 1% e Tween 80 0,1 % (Figura 4.11)

Si ottiene una colorazione giallo limone (la prova è stata ripetuta, con lo stesso risultato).

Prova 7

E' stata effettuata poi una prova in assenza di idrotalcite, utilizzando quercitina pura e oleato di sodio negli stessi rapporti delle prove precedenti.

- 200 mg di fiocco
- 6,6 mg di quercitina
- 7 mg oleato di sodio
- 40 ml di una soluzione di acido acetico 1% e Tween 80 0,1 % (Figura 4.12)



Figura 4.11. Acqua di tinteggio e soluzioni di lavaggio della prova 7

Prova 8

E' stata effettuata poi una prova in presenza di idrotalcite $ZnAl-NO_3$ sub-micrometrica non caricata e quercitina pura, negli stessi rapporti delle prove precedenti.

- 200 mg di fiocco
- 6,6 mg di quercitina
- 14,4 mg di $ZnAl-NO_3$ sub-micrometrica
- 40 ml di una soluzione di acido acetico 1% e Tween 80 0,1 %



Figura 4.12. Acqua di tinteggio e soluzioni di lavaggio della prova 8

Prova 9

E' stata effettuata una prova in presenza di idrotalcite $ZnAl-NO_3$ sub-micrometrica non caricata, oleato di sodio e quercetina pura, negli stessi rapporti delle prove precedenti.

- 200 mg di fiocco
- 6,6 mg di quercetina
- 7,2 mg di $ZnAl-NO_3$ sub-micrometrica
- 7,2 mg di oleato di Na
- 40 ml di una soluzione di acido acetico 1% e Tween 80 0,1 %



Figura 4.13. Acqua di tinteggio e soluzioni di lavaggio della prova 9

Tabella 2. Prove tintorie della quercetina utilizzando le tecnologie sviluppate con le idrotalciti

Numero prova	Temp/tempo	Materiale usato per il tinteggio	Quantità di Tween p/p
Prova 1	60°C/60 minuti	20 mg di HT_OLE _quercetina micro	0
Prova 2	60°C/60 minuti	20 mg di HT_OLE _quercetina submicro	0.1 %
Prova 3	60°C/60 minuti	20 mg di HT_OLE _quercetina submicro	0.5 %
Prova 5	60°C/60 minuti	20 mg quercetina	0.1 %
Prova 6	60°C/60 minuti	6,6 mg quercetina e 14,4 mg HT_OLE submicro	0.1 %
Prova 7	60°C/60 minuti	6,6 mg quercetina + 7 mg oleato di sodio	0.1 %
Prova 8	60°C/60 minuti	6,6 mg quercetina + 14,4 mg HT_NO ₃ submicro	0.1 %
Prova 9	60°C/60 minuti	6,6 mg quercetina + 7,2 mg HT_NO ₃ submicro + 7,2 mg di oleato di sodio	0.1 %

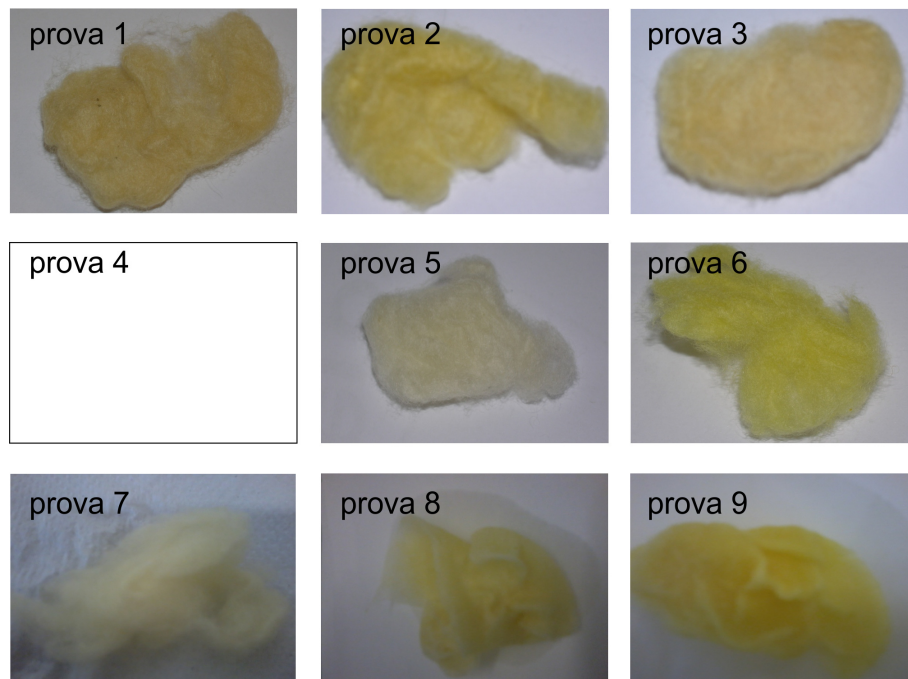


Figura 4.14. Fiocchi di cashmere ottenuti dalle varie prove descritte nel testo mediante utilizzo della quercetina pura e nella forma co-intercalata come colorante

Le capacità tintorie della Reseda utilizzando le Idrotalciti oleato

Nelle prime due prove la Reseda è stata direttamente messa a contatto con il fiocco nel bagno di tinteggio.

Prova 1

Sono stati utilizzati 200 mg di Reseda, che corrispondono a circa 20 mg di colorante puro in quantità di flavonoidi.

Sono stati utilizzati:

- 200 mg di fiocco
- 200 mg di Reseda
- 40 ml di soluzione di acido acetico 1%

Il tinteggio è stato eseguito alla temperatura di 60°C per 1 ora, dopodiché il fiocco è stato lavato con:

- _ Acqua alla temperatura di tinteggio (60°C);
- _ Soluzione di ammoniaca (2 g/L)
- _ Ecophal (1 g/L)
- _ Acqua alla temperatura di tinteggio

Terminati i lavaggi il fiocco è stato asciugato in stufa a 37°C.

Prova 2

Sono stati utilizzati 70 mg di Reseda, che corrispondono a circa 7 mg di colorante puro in quantità di flavonoidi. Alla soluzione è stata aggiunta idrotalcite ZnAl-oleato sub micrometrica in rapporto 2:1 rispetto alla quantità di colorante stimata.

- 200 mg di fiocco
- 70 mg di Reseda
- 14 mg di ZnAl-oleato sub micro

Le procedure di tinteggio e lavaggio seguite sono le stesse descritte in precedenza (Figura 4.15).

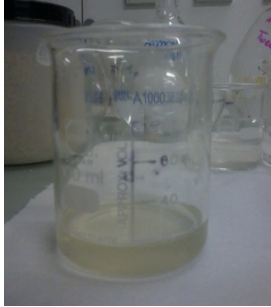


Figura 4.15. Acqua di tinteggio della prova 2

Le successive prove di tinteggio sono state precedute da un'estrazione della Reseda in acqua (rapporto acqua/Reseda essiccata 20/1) a 70°C per 70 minuti, dopodiché l'estratto recuperato per filtrazione.

Prova 3

Sono stati utilizzati:

- 200 mg di fiocco
- 40 ml di estratto (200 mg di Reseda) e acido acetico 1%

Prova 4

Sono stati utilizzati:

- 200 mg di fiocco
- 40 ml di estratto (70 mg di Reseda) e acido acetico 1%

Prova 5

Alla soluzione è stata aggiunta l'HT ZnAl_oleato sub micrometrica, in rapporto 2:1 rispetto alla quantità di flavonoidi stimata (Figura 4.16).

Sono stati utilizzati:

- 200 mg di fiocco
- 40 ml di estratto (70 mg di Reseda) e acido acetico 1%
- 14 mg di ZnAl_oleato sub micro

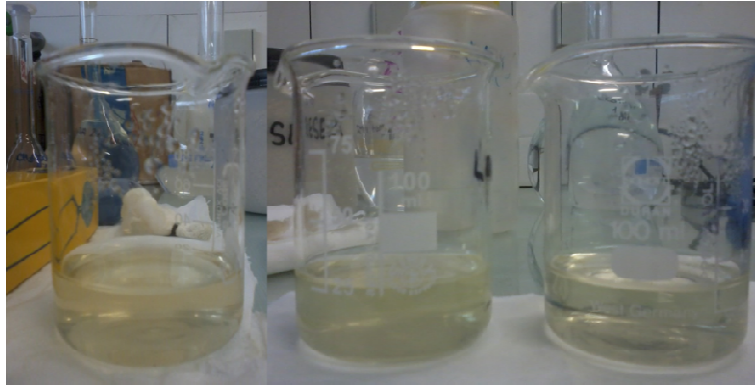


Figura 4.16. Acque di tinteggio dei campioni 3-4-5 (da sin verso dx) della prova 5

Tabella 3. Prove tintorie della Reseda utilizzando le tecnologie sviluppate con le idrotalciti

Numero prova	Temp/tempo	Materiale usato per il tinteggio	Quantità di Tween p/p
Prova 1	60°C/60 minuti	200 mg Reseda	0
Prova 2	60°C/60 minuti	70mg Reseda + 14 mg HT_OLE submicro	0
Prova 3	60°C/60 minuti	Estratto da 200 mg di Reseda	0
Prova 4	60°C/60 minuti	Estratto da 70 mg di Reseda	0
Prova 5	60°C/60 minuti	Estratto da 70 mg di Reseda + 14 mg di HT_OLE submicro	0

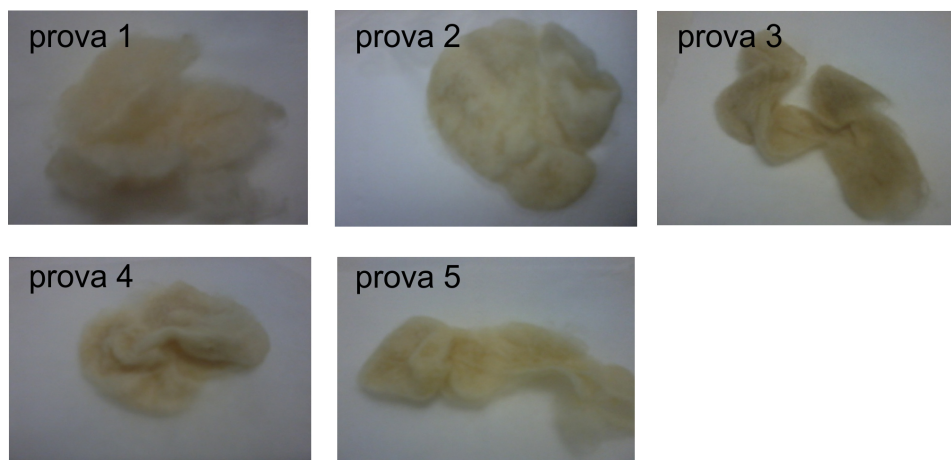
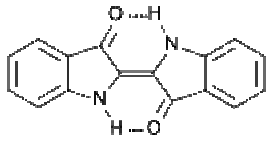


Figura 4.17. Fiocchi di cashmere ottenuti dalle varie prove descritte nel testo mediante utilizzo della Reseda lutea come colorante

STUDIO DI NUOVI COLORANTI PER IL BLUE: DAL PRECURSORE AL GUADO/LEUCO

Sviluppo di un colorante a base di guado micro-incapsulato.

Il guado è un colorante blu che si ottiene dalla pianta *Isatis tinctoria*; è utilizzato fin dall'antichità sia per tingere tessuti che come lacca per dipingere. E' un colorante molto solido, utilizzabile nella tintura dei tessuti (è stato il colorante dei jeans, all'inizio) ma anche in cosmetica e nelle tecniche pittoriche. L'indigotina è il costituente principale dell'indaco: è un composto insolubile in acqua, di colore azzurro scuro, ottenibile per idrolisi e ossidazione all'aria dell'indacano, oppure per sintesi chimica. Per riduzione può essere trasformato nell'indaco bianco.



Indigotina

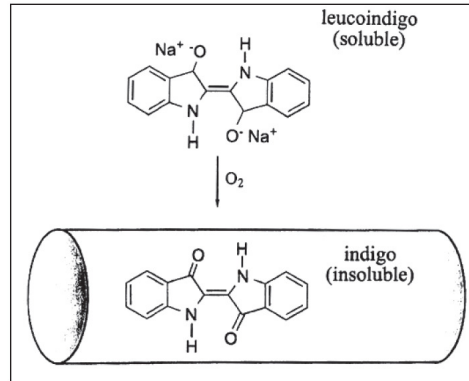


Figura 4.18. Formula dell'indigotina e delle sue forme solubili e insolubili in acqua

Caratterizzazione della polvere di guado

Il campione di guado è stato caratterizzato al microscopio elettronico a scansione (SEM); come è possibile osservare dalle immagini riportate (Figura 4.19) la distribuzione dimensionale è molto eterogenea, le particelle più grandi raggiungono un diametro compreso tra i 9 e i 15 µm circa.

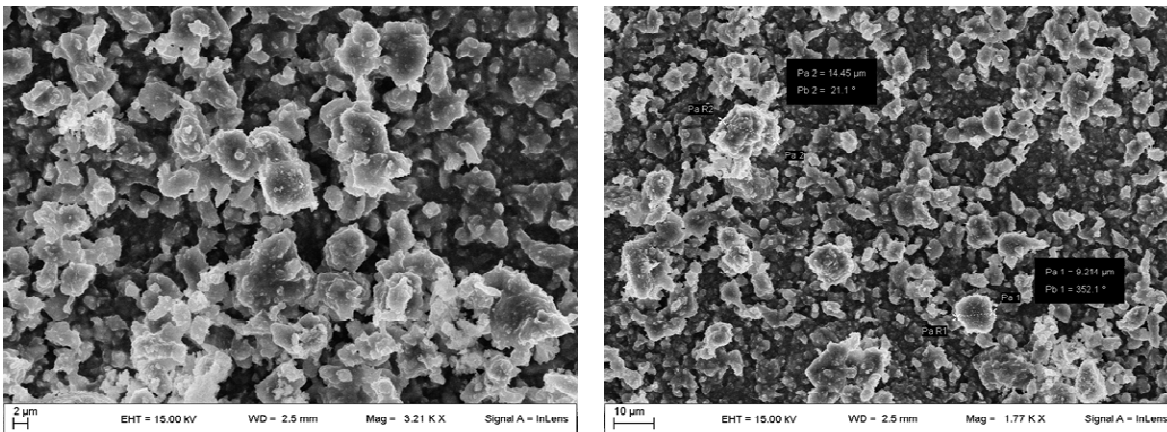


Figura 4.19. Immagini al SEM della polvere di guado

Per cercare di ridurre la granulometria la polvere è stata sottoposta a macinazione in mortaio; di seguito sono riportate le immagini SEM del campione macinato (Figura 4.20).

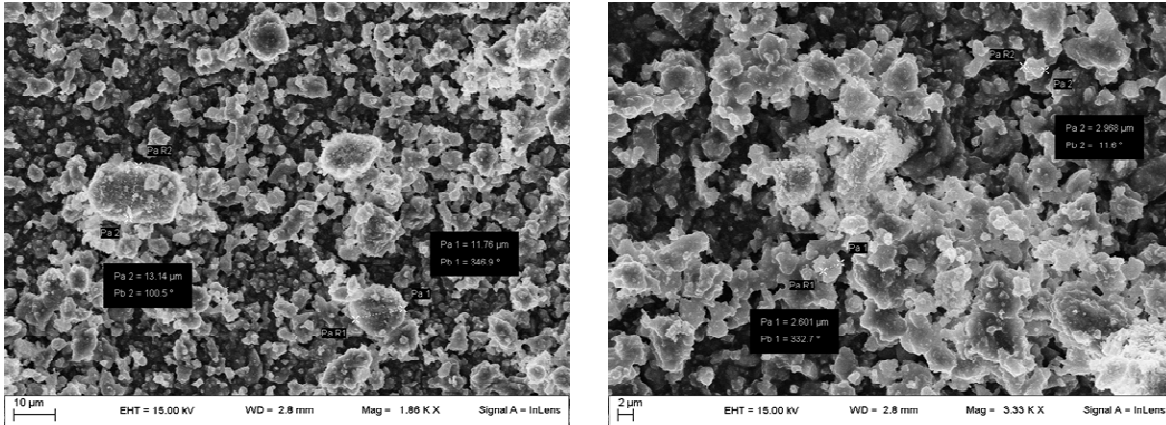


Figura 4.20. Immagini al SEM della polvere di guado macinata

Microincapsulazione del guado

Il guado, contrariamente ad altri coloranti, risulta fotostabile per cui non è stato optato per la sua intercalazione in solidi lamellari bensì per il semplice rivestimento con film polimerico. Quest'ultimo è stato realizzato mediante un'emulsione olio in acqua (O/A) utilizzando come polimero il Polietilmetacrilato (PEMA) e una soluzione di PVA al 2% quale agente stabilizzante.

Il polimero è stato dapprima solubilizzato in diclorometano (fase olio interna) e successivamente in questa soluzione è stata dispersa la polvere di guado macinata (rapporto particelle/polimero 1:10). Il tutto è stato sonicato in bagnetto a ultrasuoni per circa 20 minuti, al fine di ridurre le dimensioni delle particelle e favorirne così l'incapsulamento. La dispersione ottenuta è stata poi emulsionata, sotto agitazione, ad una soluzione acquosa di PVA al 2% (rapporto O/A pari a di 1:5 v/v). L'emulsione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 12 ore in modo da consentire la completa evaporazione della fase organica e l'ottenimento delle particelle solide; queste sono poi state recuperate per centrifugazione, lavate con acqua e seccate in stufa a 37 °C.

Le particelle ottenute sono quindi state caratterizzate mediante microscopia ottica e elettronica a scansione (Figura 4.21 e 4.22).

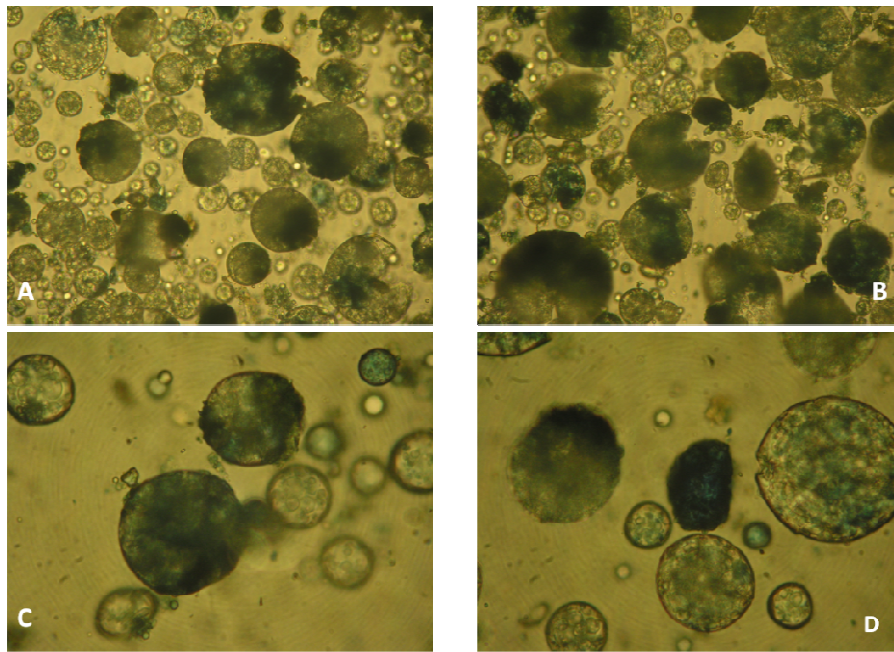


Figura 4.21. Immagini al microscopio ottico di MP guado, ingrandimenti 40X (A-B) e 100X (C-D)

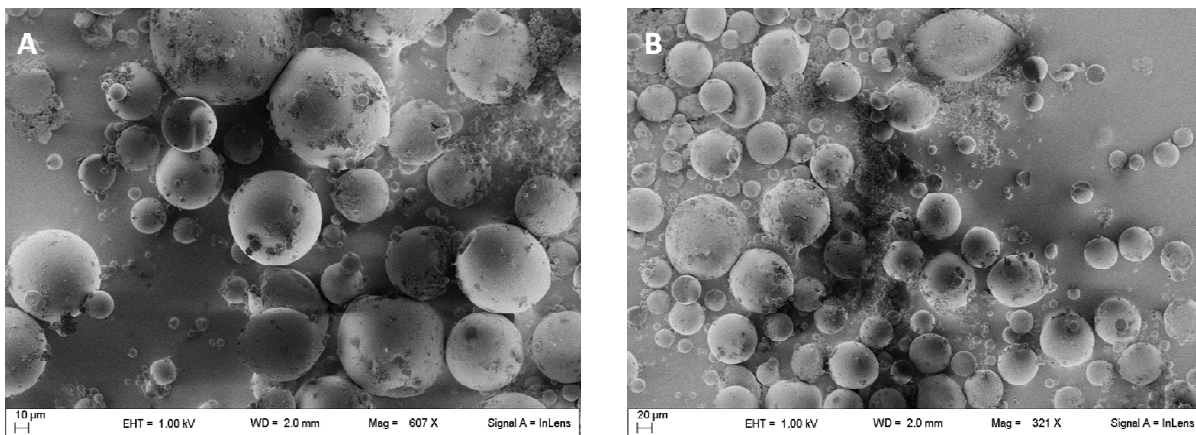


Figura 4.22 (A-B). Immagini SEM di MP guado

In un secondo step le microparticelle ottenute sono state modificate in superficie mediante un ulteriore rivestimento polimerico di PVP (polivinilpirrolidone), il quale è stato solubilizzato in acqua in quantità tale da avere un rapporto particelle/polimero 1:2 (p/p). Le particelle precedentemente ottenute sono state disperse in questa soluzione e sottoposte ad irradiazione con lampada UV ($\lambda=254$ nm) per 6 ore, sotto agitazione. Il prodotto finale è stato recuperato per centrifugazione, lavato e seccato in stufa a 37 °C.

Le particelle rivestite ottenute sono state caratterizzate mediante microscopia elettronica a scansione (fig.4.23).

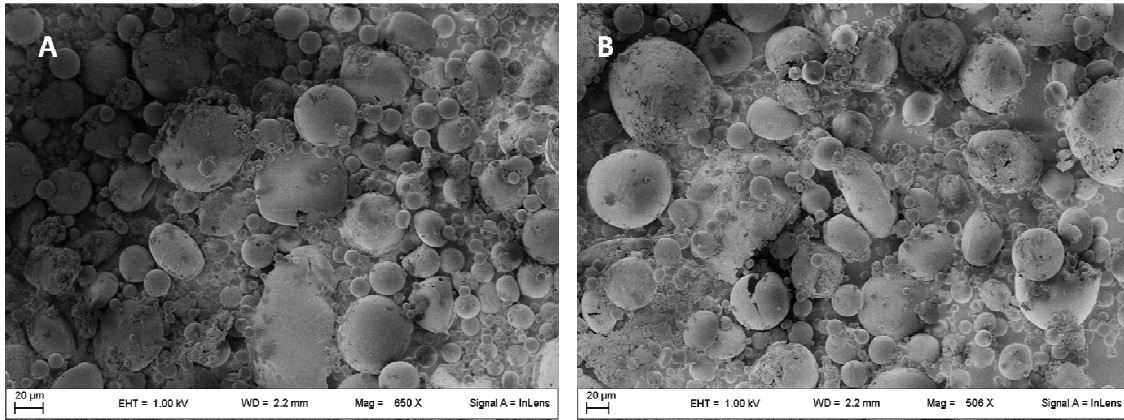


Figura 4.23 (A-B). Immagini SEM di MP_guado_PVP

TINTEGGIO DEL CASHMERE

Sono state eseguite diverse prove di tinteggio.

- 1) La prima prova è stata effettuata direttamente da Ferrini utilizzando le microparticelle di guado rivestite con PVP. Il fiocco ha assunto una colorazione bluastra molto blanda, in cui sono ben visibili le particelle di dimensioni più grandi adese non stabilmente alle fibre e che non risultano quindi resistenti alle prove di sfregamento.

Questo campione è stato caratterizzato mediante microscopia elettronica a scansione; come si può osservare dalle immagini sottostanti, le microparticelle risultano per lo più libere e non adese alle fibre (Figure 4.24).

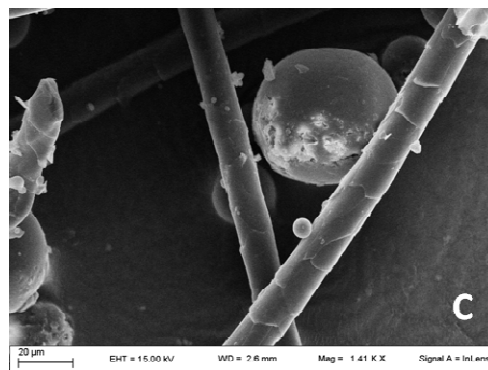
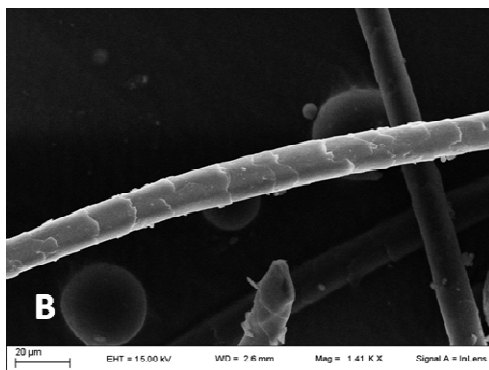
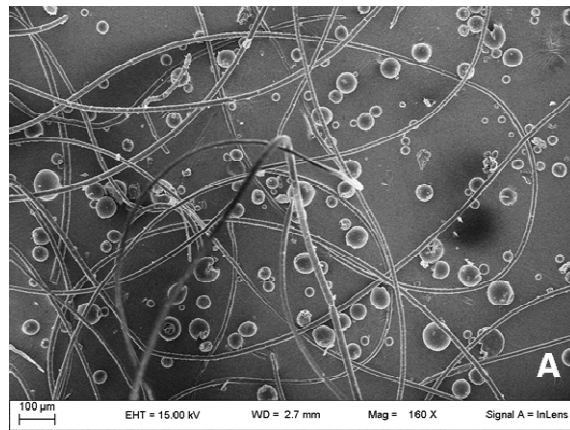


Figura 4.24 (A,B,C). Immagini SEM delle fibre di cashmere trattate con MP_guado_PVP

- 2) Allo scopo di ridurre le dimensioni è stata effettuata una macinazione a umido della polvere di guado. 1,5 g di guado sono stati macinati in un mortaio con 2 ml di glicole etilenico; il materiale è stato recuperato con acqua e centrifugato, dopodiché seccato in stufa a 37°C overnight. Il materiale ottenuto (che appare più sottile rispetto al guado tal quale) è stato poi rivestito con film polimerico e modificato in superficie mediante la procedura descritta in precedenza.

Con queste microparticelle rivestite è stata effettuata una prova di tinteggio in laboratorio, utilizzando:

- 200 mg di fiocco
- 20 mg di Mp-guado rivestite con PVP (10% p/p rispetto al fiocco)
- 40 ml di una soluzione di acido acetico 1%

Le microparticelle sono state addizionate sotto agitazione alla soluzione acida; è stato poi aggiunto il fiocco, riscaldando fino a raggiungere la temperatura di 60°C, cui la dispersione è stata mantenuta per 1 ora.

Terminato il tinteggio il fiocco è stato lavato con:

- _ Acqua alla temperatura di tinteggio (60°C);
- _ Soluzione di ammoniaca (2 g/L)
- _ Ecophal (1 g/L)
- _ Acqua alla temperatura di tinteggio

Terminati i lavaggi il fiocco è stato lasciato asciugare in stufa a 37°C.

Riduzione dell'indaco in forma leuco e prova di intercalazione in idrotalcite

Il guado è stato sottoposto a riduzione nella forma leuco, solubile in acqua, mediante l'utilizzo di ditionito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) come agente riducente.

Scambio ionico

Una soluzione di soda a pH 9 ($V=80$ ml) è stata scaldata a 50°C e aggiunta lentamente sotto agitazione a 0,2 g di polvere di guado, precedentemente amalgamato in un becher con pochissima acqua alla stessa temperatura. Alla dispersione è stato aggiunto poco alla volta 1 g di ditionito di sodio e il tutto è stato lasciato sotto agitazione a 80°C, fino alla riduzione della molecola nella forma leuco (fig.1-A). Alla soluzione sono stati aggiunti 0,2 g di idrotalcite ZnAl-NO_3 (in rapporto stechiometrico con il guado) e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione e a temperatura per 45 minuti. Il materiale è stato poi recuperato per centrifugazione, lavato una volta con acqua deionizzata e seccato in stufa a 60°C.

Lo spettro di diffrazione di raggi X (fig.2) non mostra intercalazione della molecola che tuttavia risulta adsorbita sulla superficie dell'idrotalcite (fig.1-B).



Figura 1. (A) Guado in dispersione durante il processo di riduzione; (B) HT-ZnAl- dopo contatto con il guado in forma leuco.

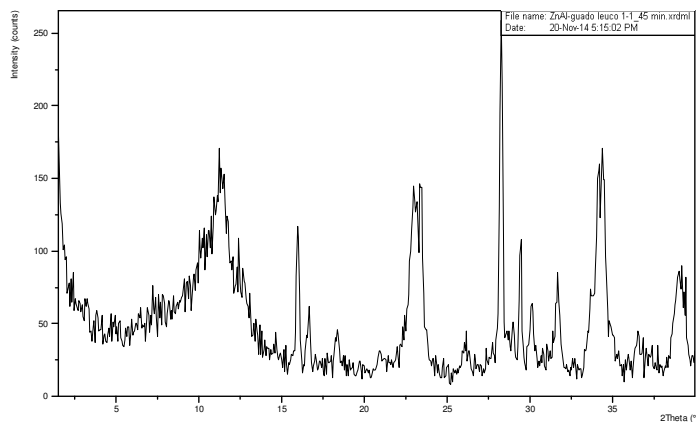


Figura 2. Spettro XRPD di HT-ZnAl-NO₃ dopo contatto con guado leuco.

Co-precipitazione

Il guado è stato sottoposto a riduzione come descritto in precedenza e alla dispersione è stata addizionata una miscela di nitrati di zinco e alluminio.

Per la riduzione dell'indaco sono stati utilizzati:

- 0,2 g di guado
- 1 g di ditionite
- 80 ml di acqua
- NaOH fino a pH 9

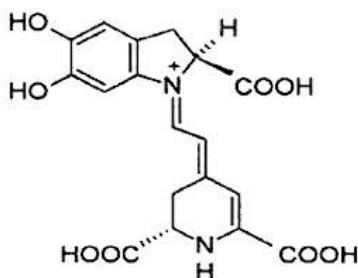
In una piccolissima quantità di acqua sono stati sciolti i sali (in concentrazione 0,01 M, stechiometrica rispetto all'indaco) e la soluzione ottenuta è stata aggiunta alla dispersione di guado leuco già basica.

Lo spettro XRPD del composto ottenuto non mostra intercalazione della molecola che tuttavia risulta adsorbita sulla superficie dell'idrotalcite.

STUDIO DI NUOVI COLORANTI PER IL ROSSO: LE ANTOCIANIDINE DELLA BIETOLA VOLGARIS

BETANINA o ROSSO BARBABIETOLA

La betanina o rosso di barbabietola è un glicoside naturale di colore rosso estratto dalla barbabietola rossa (*Beta Vulgaris*), utilizzato come colorante naturale. Il colorante è formato da diversi pigmenti appartenenti alla classe delle betalaine ed è composto principalmente da:
 betaciani (rossi) di cui la betanina ne rappresenta il 75-95%;
 betaxantina (gialla);
 prodotti di degradazione delle betalaine (di colore bruno chiaro).



ESTRAZIONE DELLA BETANINA DALLE RADICI DI BARBABIETOLA ROSSA

Le radici della barbabietola rossa sono state pulite, lavate e tagliate a fettine sottili. L'estrazione della betanina è stata effettuata utilizzando una soluzione acquosa acida (pH 2.8) costituita da acido citrico 0,2% e acido ascorbico 0,1% e un rapporto solido/liquido 1/5 (g/ml), come da dati riportati in letteratura (A. Sturzoiu, M. Stroescu et al. *U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 73, Iss. 1, 2011*).

20 g di radici, opportunamente sminuzzate, sono state poste in 100 ml della soluzione acida, mantenuta in agitazione magnetica per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopodiché l'estratto è stato recuperato per filtrazione e sottoposto ad analisi spettrofotometrica per determinarne la concentrazione di betanina.

In letteratura sono riportate le proprietà spettrofotometriche dell'estratto, costituito da betanina (massimo di assorbimento a $\lambda = 535-540$ nm) e vulgaxantina (massimo di assorbimento a $\lambda = 476-478$ nm). Il coefficiente di estinzione molare ϵ riportato per la betanina è di $1120 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

La valutazione spettrofotometrica (fig. 1) ha indicato la presenza di 138 mg di betanina nell'estratto, che corrisponde a 6,92 mg di betanina estratta/ g di radice.

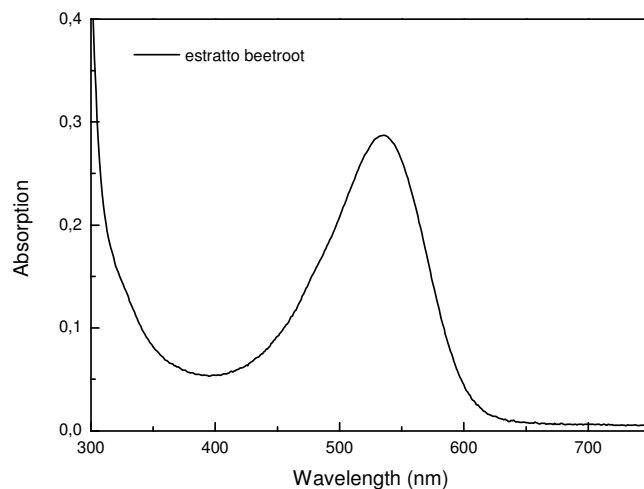


Figura 1. Spettro di assorbimento dell'estratto da radici di barbabietola in soluzione acida a pH 2.8

Prove di intercalazione della betanina in idrotalcite

Idrotalcite tipo $ZnAl-NO_3$ è stata posta a contatto con l'estratto contenente betanina. Sono stati preparati due campioni utilizzando rispettivamente:

- 1 g di $ZnAl-NO_3$
- 20 ml di estratto (pH 2.8)

Prima di aggiungere l'idrotalcite l'estratto è stato portato rispettivamente a pH 7 (campione A) e a pH 8 (campione B) utilizzando NaOH 1M, in modo da favorire l'intercalazione. I due campioni sono stati lasciati in agitazione magnetica per 24 h, recuperati per filtrazione e seccati in stufa a 60°C.

L'analisi diffrattometrica dei campioni (fig. 2) mostra la presenza di una fase con d di circa 9.9 Å.

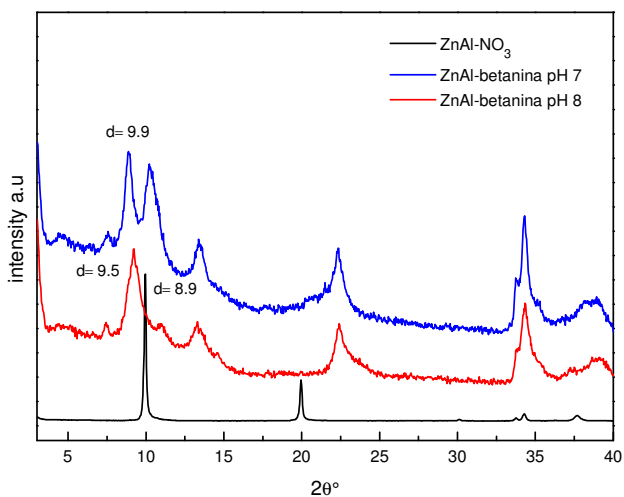


Figura 2. XRPD di $ZnAl-NO_3$ di partenza, del campione A (blu) e del campione B (rosso)

Dopo 24 h di contatto si osserva però il cambiamento di colorazione delle due dispersioni (fig.3).



Figura 3. Campioni di idrotalcite ZnAl-NO₃ a contatto con estratto di barbabietola a pH 7 (A) e a pH 8 (B).

Data la particolare struttura chimica della betanina, si è pensato di ricorrere alla sua intercalazione/adsorbimento sulla superficie di ZrP; a questo scopo è stato preparato un gel di ZrP di dimensioni nanometriche.

ANALISI DELLE MATERIE PRIME – FORNITORI

Nella prima fase dell'azione 4 – fase di prototipazione – che finisce con la raccolta delle specie tintorie (maggio 2014) le attività di sviluppo sono state realizzate attraverso i reagenti presenti nello stabilimento. Al contrario nella seconda fase del progetto – fase di scale up, che si estenderà nella parte finale del progetto ancora non rendicontata - sono previsti test di sintesi delle matrici lamellari, lo scale-up delle sintesi e la realizzazione di 10 batch di nuovo colorante. In fase di progetto sono stati previsti i seguenti reagenti e quantitativi. Il costo è stato definito attraverso indagine di mercato e recupero di preventivi e riportato nella seguente tabella

Tabella 4- Materiale prime necessarie per i 10 batch tintori (riportata dal progetto)

MATERIALE	QUANTITÀ KG	COSTO (KG)	EURO TOT
ZINCO NITRATO ESA IDRATO	380	2.8	1064
MAGNESIO NITRATO ESA IDRATO	140	0.75	105
SODA	350	0.8	280
OLEINA BI DISTILLATA	480	2.15	1032
ACIDO STEARICO	200	2.15	430
ALLUMINIO NITRATO	319.4	6.54	2089

NONA IDRATO		
TOT PREVISTO		5000

La società ha iniziato in questa fase a recuperare e testare le materie prime necessarie per la seconda fase operando una serie di controlli interni di qualità su campionature inviate dalle ditte fornitrici. In particolare è stata valutata ed analizzata la presenza di metalli pesanti nelle materie prime visto il loro rilievo nella genesi della dermatite topica.

Metodologia: La ricerca di metalli pesanti è stata eseguita tramite spettroscopia d’assorbimento atomico. Sono stati preliminarmente analizzati gli assorbimenti degli standard a concentrazione nota (1 ppm) e comparati con quelli del campione in esame. Il campione in esame è stato preparato sciogliendo 5 gr del prodotto da testare in 100 ml di acqua. Di seguiti risultati dell’assorbimento degli standard.

Tabella 5. Standard utilizzati in spettroscopia di assorbimento

<i>Metallo</i>	<i>Riferimento</i>	<i>Intensità</i>
<i>Zinco</i>	1 ppm	42000
<i>Cromo</i>	1 ppm	80000
<i>Nichel</i>	1 ppm	2500
<i>Cobalto</i>	1 ppm	30000
<i>Rame</i>	1 ppm	80000

Zinco nitrato - CENTRUM

Metalli ricercati e trovati presenti nel prodotto testato: Fe, Co, Ni, Cu, Pb, Al

Metalli cercati e trovati assenti nel prodotto testato: Cd e Hg

Tabella 6. Ricerca quantitativa nel campione Zinco nitrato - CENTRUM

<i>Metallo</i>	<i>Intensità misurata</i>	<i>Ppm nel campione</i>	<i>Ppm nel prodotto</i>
<i>Fe</i>	5000		
<i>Co</i>	9000	< 0.3	< 6 ppm (mg/Kg)
<i>Ni</i>	3000	Circa 1.2	Circa 24 ppm (mg/Kg)

<i>Cr</i>	2000	< 0.025	< 6 ppm (mg/Kg)
<i>Cu</i>	17000	< 0.22	< 4.5 ppm (mg/Kg)
<i>Pb</i>	1200		
<i>Al</i>	300000		

Zinco nitrato - Gale & Cosm

Metalli ricercati e trovati presenti nel prodotto testato: Fe, Ni, Cu, Al

Metalli cercati e trovati assenti nel prodotto testato: Co, Cd, Hg, Cr e Pb

Tabella 6. Ricerca quantitativa nel campione Zinco nitrato – Gale & Cosm

<i>Metallo</i>	<i>Intensità misurata</i>	<i>Ppm nel campione</i>	<i>Ppm nel prodotto</i>
<i>Fe</i>	5000		
<i>Co</i>	9000		
<i>Ni</i>	3000	Circa 0.36	Circa 7.2 (mg/Kg)
<i>Cr</i>	2000		
<i>Cu</i>	17000	< 0.016	< 0.32 (mg/Kg)
<i>Pb</i>	1200		
<i>Al</i>	300000		

Commento: lo Zn nitrato della Gale & Cosm (nuovo fornitore) risulta migliore in base alla quantità espressa in ppb del Nichel rispetto alla Centrum (vecchio fornitore).

Magnesio nitrato - Brenntag

Ricerca qualitativa dei metalli

Metalli ricercati e trovati presenti nel prodotto testato: Fe e Zn

Metalli cercati e trovati assenti nel prodotto testato: Co, Ni, Cr, Cu, Pb, Al, Cd e Hg

Commento: Ottimo prodotto essendo Nichel free. Analoga analisi eseguito sul prodotto Alluminio nitrato dello stesso fornitore ha trovato valori elevati di Ni.

Alluminio nitrato/CENTRUM

Ricerca qualitativa dei metalli

Metalli ricercati e trovati presenti nel prodotto testato: Fe, Ni, Cr, Cu, Zn

Metalli cercati e trovati assenti nel prodotto testato: Co, Cd, Hg, Pb

Tabella 7. Ricerca quantitativa nel campione Alluminio nitrato - CENTRUM

<i>Metallo</i>	<i>Intensità misurata</i>	<i>Ppm nel campione</i>	<i>Ppm nel prodotto</i>
<i>Fe</i>	80000		
<i>Ni</i>	700	Circa 0.28	Circa 5.6 (mg/Kg)
<i>Cu</i>	4000	< 0.05	< 1.1 (mg/Kg)
<i>Zn</i>	50000		
<i>Al</i>	17000		

Commento: prodotto con basso valore di Nichel.

In base a quanto sopraesposto riportiamo in una tabella riassuntiva i quantitativi e i fornitori individuati idonei allo scopo del progetto:

Tabella 8- Materie prime previste, acquistati e relativi fornitori individuati

Materiale	Fornitore selezionato	Motivazione	Costo da prev (Kg)	Quantità prevista in Kg -Tabella 1-	Quantità acquistata	Note
Zinco nitrato esa idrato	CENTRUM METAL ODCZYNNIKI CHEMICZNE	Scartato per Alto tenore di Nickel	-	380	-	
	GALE & COSM	Basso tenore di Nickel	7.83		100 kg Fattura n 91	Nuovo fornitore
Magnesio nitrato	BRENNTAG	Qualità, prezzo e affidabilità del prodotto	0.75	140	300 Fattura 29729	
					375 Fattura 34361	
Magnesio nitrato esa idrato	BRENNTAG	Alta qualità			50 Fattura 23578	
Soda	BRENNTAG	Qualità, prezzo e affidabilità del prodotto	0.8	350	500 (fattura 29729)	
					750 (fattura 34361)	
Oleina bi-distillata	BRENNTAG	Qualità, prezzo e affidabilità del prodotto	2.15	480	-	
Acido stearico	BRENNTAG	Qualità, prezzo e affidabilità del prodotto	2.15	200	-	
Alluminio nitrato nona idrato	BRENNTAG	Scartato per Alto tenore di Nickel	6.54	320	-	
	CENTRUM METAL ODCZYNNIKI	Basso tenore di Nickel	4.15	450	450Kg 250	

	CHEMICZNE		3.97		(F/000739/CM/14) 200 (F/000577/CM/14)	
--	-----------	--	------	--	---	--

Azione 5 – Saggi di tossicità dei coloranti coprecipitati e intercalati in solidi lamellari

Partner coinvolto Università degli Studi di Perugia

Lo scopo del progetto è quello di creare una filiera dei coloranti vegetali che va dalla coltivazione delle specie vegetali che contengono il colorante alla loro trasformazione in preparati foto-stabili per l'applicazione tintoria della lana e del cachmere. La tossicità di questi nuovi prodotti è stata valutata attraverso sofisticate indagini di citotossicità, genotossicità e marker d'espressione genica.

PARTE SPERIMENTALE

Campioni

Per le prove sperimentali sono stati presi in considerazione 5 diversi campioni, il primo per le tinture del blu, mentre gli altri per la tintura del giallo:

1. Isatis tintoria (nome comune guado)
2. Reseda luteola L. (reseda commerciale coltivata nelle Marche)
3. Reseda lutea L. (reseda coltivata in Umbria essiccata a 40°C per 40 ore)
4. Solidago virgaurea (nome comune verga d'oro)
5. L'Anthemis tinctoria L. (nome comune Camomilla dei tintori)

Linea Cellulare

Per gli studi di citotossicità e genotossicità, nonché espressione genica tramite RealTime PCR, ci siamo serviti di una linea tumorale epatica, HepG2. Tali cellule crescono in aderenza, come monostrato, in terreno EMEM (Eagle's minimal essential medium) addizionato con il 10% di FBS (siero fetale bovino), 1 mmol/L di sodio piruvato, 200 mM di Glutamina ed infine con 100 U/ml di Penicillina e 100 µg/ml di Streptomycin come antibiotici. Le cellule vengono poste in incubazione a 37°C al 5% di CO₂.

1. Estrazione campioni

Per quanto riguarda l' *Isatis tinctoria*, essendo insolubile in acqua, è stata risospesa in DMSO puro.

Tutte le altre sostanze, utilizzate per le tinture del giallo, sono state estratte in soluzione fisiologica sterile in rapporto:1 g di campione è stato risospeso in 20 ml di soluzione fisiologica, così da ottenere una stock concentrata 50 mg/mL.

L'estrazione è stata condotta a 70°C per 30 minuti. La sospensione è stata centrifugata a 4.000 x g per 10 minuti ed il sovrinatante è stato utilizzato per i saggi di citotossicità e genotossicità.

2. Estrazione con sudore artificiale e spettri di assorbimento

Sono state effettuate tre estrazioni per ciascun campione in esame, rispettivamente di 1 ora, 2 ore e 3 ore, con il sudore artificiale (composizione nella tabella sottostante). Questo primo esperimento è stato svolto per valutare se effettivamente le fibre colorate rilasciano le sostanze contenute nell'estratto naturale utilizzato in tintoria.

Cloruro di Sodio	NaCl	10 g/l
Acido Lattico	CH ₃ CHOHCOOH	1 g/l
Urea	H ₂ N-CO-NH ₂	1 g/l
PH		4.7
Temperatura		20°C

I risultati sperimentali ottenuti indicano che i coloranti vengono rilasciati nel sudore. Infatti gli spettri di assorbimento della sostanze e quelli con il sudore artificiale si sovrappongono. In Figura 1 sono riportati come esempio gli spettri ottenuti con la camomilla. Il rilascio dei coloranti può avere come conseguenze reazioni allergiche o reazioni avverse a livello sistemico una volta che tali sostanze oltrepassano la barriera epiteliale.

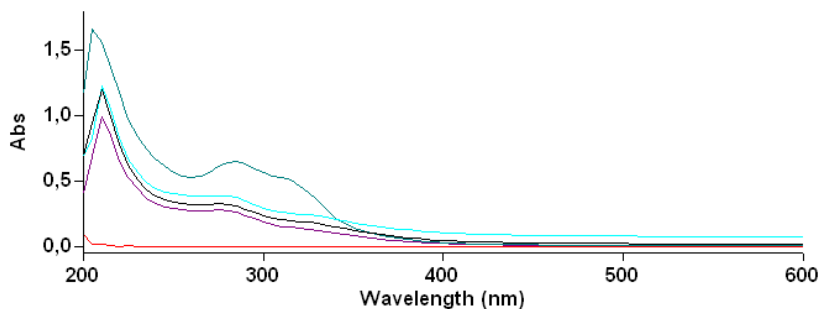
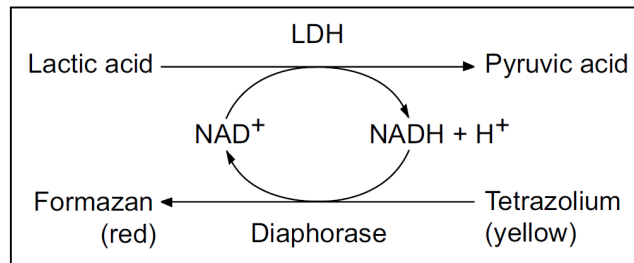


Figura 1. Spettro di assorbimento della Camomilla dei tintori. Il picco più in alto corrisponde all'estratto naturale come tale, mentre gli altri, che sono perfettamente sovrapponibili, sono quelli delle tre diverse estrazioni con sudore artificiale (1h, 2h e 3h). La linea rossa è il controllo negativo (sola acqua).

3. Valutazione della citotossicità su linea tumorale di HepG2 tramite LDH

Per valutare la citotossicità dei 5 diversi campioni sulla linea di epatoma, HepG2, è stato inizialmente utilizzato il metodo della lattato deidrogenasi (LDH) della ditta Takara. Questo test di citotossicità sfrutta una reazione che normalmente avviene all'interno delle cellule. L'enzima Lattato Deidrogenasi (LDH) è un enzima normalmente presente nel citoplasma delle cellule e catalizza la reazione di trasformazione del lattato in piruvato. In seguito ad un danno alla parete cellulare l'enzima LDH dal citoplasma si riversa all'esterno della cellula, e nel caso di cellule *in vitro*, nel mezzo di coltura.



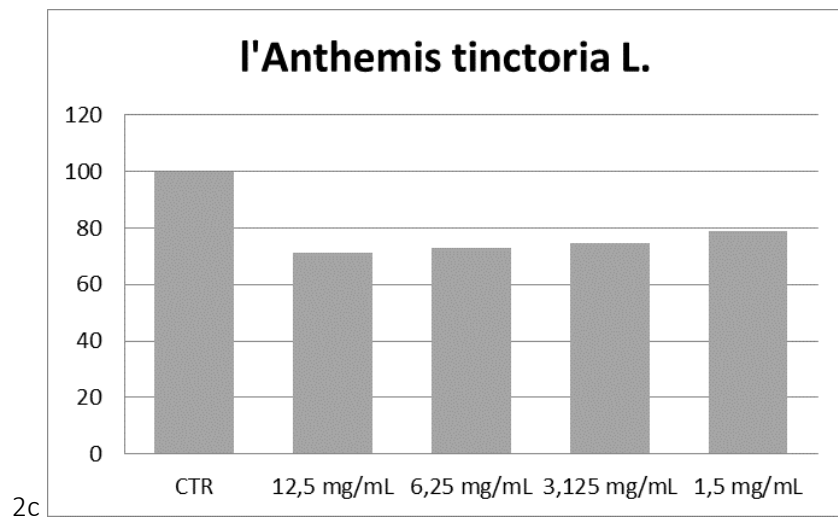
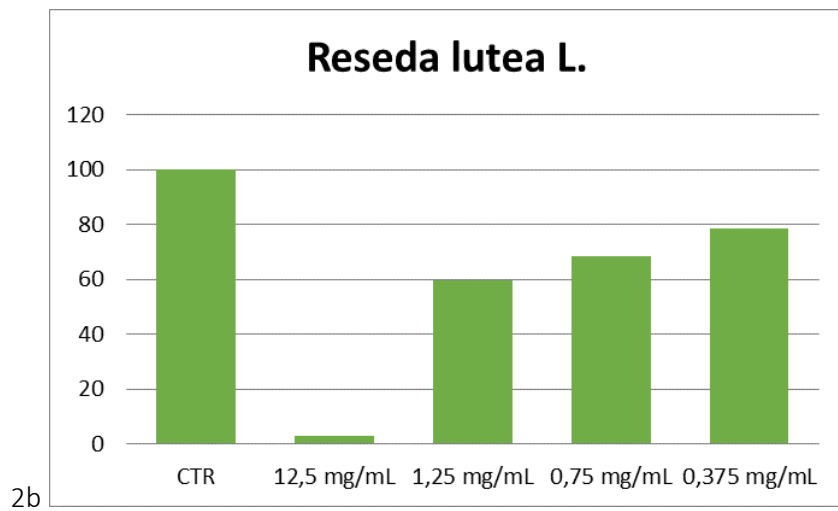
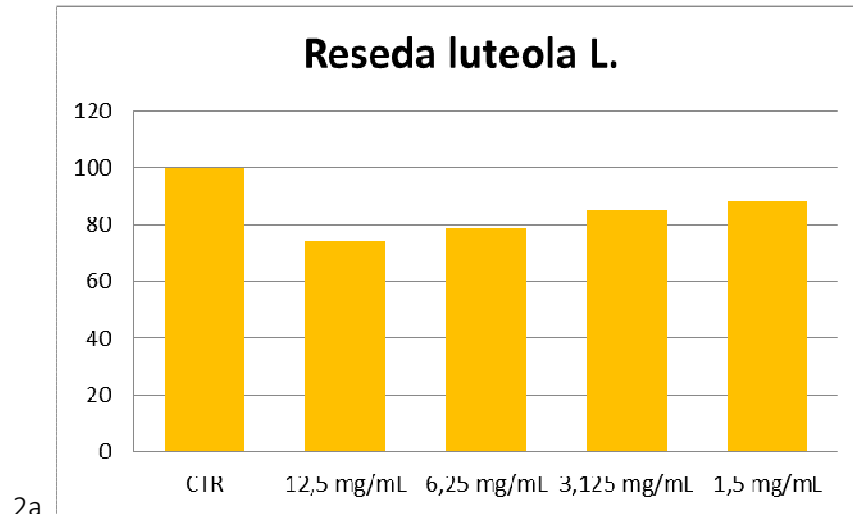
Questo saggio non è stato utilizzato perché i coloranti interferivano con la lettura del substrato cromogeno utilizzato per evidenziare la lattato deidrogenasi.

Valutazione della citotossicità su linea tumorale di HepG2 tramite MTT

La citotossicità è stata così valutata mediante il saggio MTT.

L'MTT è un saggio colorimetrico che sfrutta la capacità delle deidrogenasi mitocondriali di scindere l'anello tetrazolico della molecola di MTT (sale di tetrazolio) di colore giallo per dare un sale di formazano (colore violetto). L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (reduttasi), è attivo soltanto nelle cellule vive, quindi la quantità di formazano prodotta viene misurata allo spettrofotometro ed è proporzionale al numero di cellule vitali.

I risultati ottenuti sono riportati di seguito utilizzando diverse concentrazioni dei coloranti (Figura 2a, 2b, 2c, 2d e 2e).



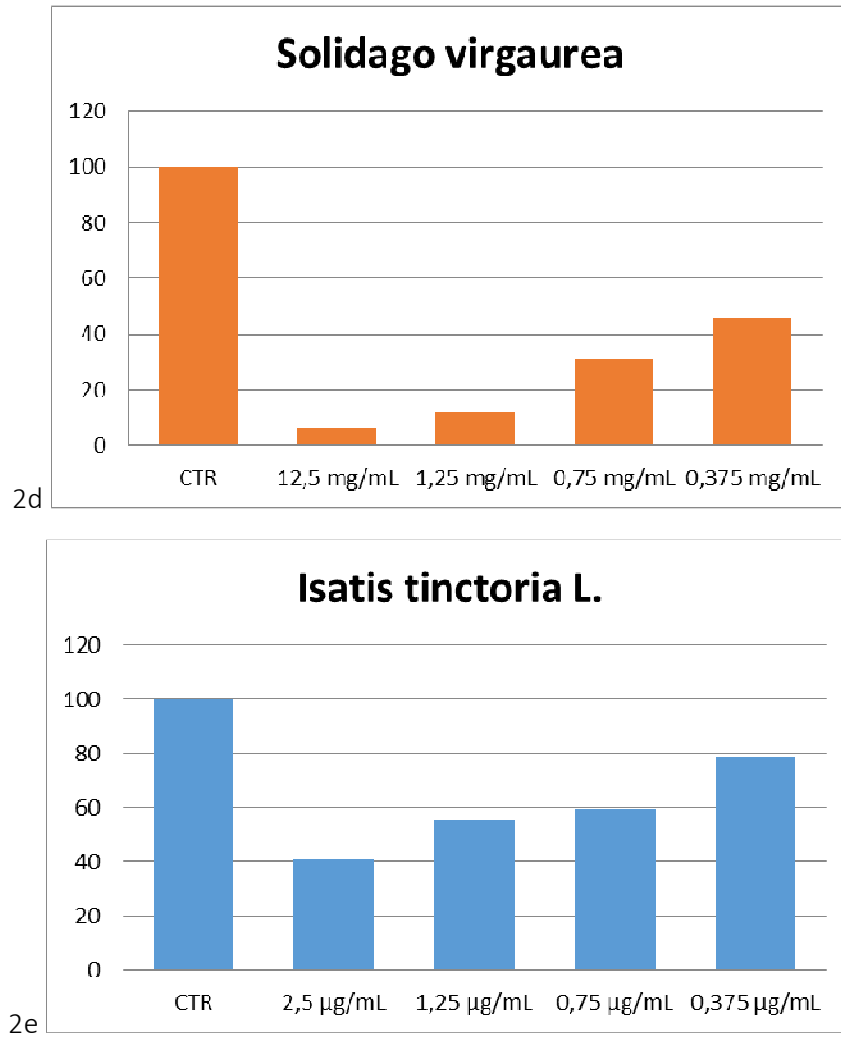


Figura 2. MTT assay per le 5 diverse piante prese in esame.

I risultati ottenuti indicano che possono essere citotossiche ad elevate concentrazioni la Reseda lutea e la Solidago virgaurea.

4. Apoptosi e ciclo tramite lettura al FACS

Sono stati anche effettuati esperimenti per testare la vitalità e il ciclo cellulare mediante il citofluorimetro a flusso (EPICS XL-MCL flow cytometer, Instrumentation Laboratory, Beckman Coulter, Miami, FL. Data were processed by an Intercomp computer and analyzed with EXPO 32 software).

I risultati, ottenuti sempre sulla linea cellulare di epatoma HepG2 opportunamente trattate con i 5 diversi coloranti per 24 ore, sono riportati di seguito in Tabella 1. Per ciascun campione saggiato sono specificate le diverse concentrazioni testate.

		FACS	Ciclo		
		Apoptosi %	G0-G1	S	G2-M
	CTR	2	58,32	22,71	18,96
Reseda luteola L.	12,5 mg/mL	5,1	65,36	4,89	29,75
	6,25 mg/mL	4,3	49,18	33,23	17,58
	3,125 mg/mL	3	47,48	35,37	17,15
	1,5 mg/mL	1,7	54,26	27,34	18,4
Reseda lutea L.	12,5 mg/mL	94,5			
	1,25 mg/mL	31,2	98,94	0	1,06
	0,75 mg/mL	10,8	25,51	38,59	35,9
	0,375 mg/mL	5,7	47,89	29,4	22,71
l'Anthemis tinctoria L.	12,5 mg/mL	12,9	70,29	6,05	23,66
	6,25 mg/mL	6,8	50,39	34,1	15,51
	3,125 mg/mL	5,2	52,18	30,09	17,73
	1,5 mg/mL	3,4	52,83	29,59	17,58
Solidago virgaurea	12,5 mg/mL	97,1			
	1,25 mg/mL	48,5	83,31	15,11	1,58
	0,75 mg/mL	20,8	53,01	27,32	19,67
	0,375 mg/mL	12,6	51,72	28,96	19,32
Isatis tinctoria L.	2,5 µg/mL	28,3	48,6	39,41	11,99
	1,25 µg/mL	19,4	47,07	36,68	16,24
	0,75 µg/mL	11,2	47,02	37,71	15,27
	0,375 µg/mL	4,8	49,98	33,76	16,26

Tabella 1. Vitalità e ciclo cellulare grazie alle analisi effettuate con il citofluorimetro a flusso per le 5 diverse sostanze.

I risultati confermano che possono essere citotossiche, con un apoptosi superiore al 20%, la Reseda lutea e la Solidago virgaurea, ma solo ad elevate concentrazioni. Al contrario Reseda luteola, Camomilla dei tintori e Isatis tintoria non risultano avere effetti diretti sul ciclo cellulare e sull'apoptosi.

5. Valutazione della vitalità cellulare con il metodo del Tripan Blue

La vitalità cellulare è stata anche valutata con il saggio del Trypan.

Il Trypan Blue viene comunemente usato nella colorazione vitale con un metodo definito come colorazione per esclusione. Infatti, le membrane cellulari sono normalmente impermeabili a tale colorante, mentre le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, si colorano di blu (senza possibilità di distinzione).

Il Trypan Blue, essendo un cromoforo carico negativamente, non è in grado di attraversare la membrana di cellule intatte, ma attraversa quella delle cellule morte, colorandole di blu. Questo permette la facile discriminazione delle cellule vive (che hanno escluso il colorante) con semplice osservazione al microscopio. La linea cellulare impiegata per questo studio è sempre quella derivante da cellule epatiche immortalizzate: le HepG2. Queste cellule sono state trattate con un'unica concentrazione per ciascun campione in esame, la concentrazione ritenuta non citotossica in base ai risultati ottenuti tramite i precedenti saggi già illustrati.

Le concentrazioni non ritenute citotossiche sono state confermate grazie anche a questo ulteriore saggio, come si evince in Tabella 2.

CAMPIONE	Concentrazione	Vitalità	% cellule vive
CTR (controllo negativo)	-	$5,4 \times 10^5/\text{mL}$	95%
Reseda luteola L.	6,25 mg/mL	$4,9 \times 10^5/\text{mL}$	92%
Reseda lutea L.	0,375 mg/mL	$3,4 \times 10^5/\text{mL}$	71%
L'Anthemis tinctoria L.	6,25 mg/mL	$5,1 \times 10^5/\text{mL}$	91%
Solidago virgaurea	0,375 mg/mL	$2,9 \times 10^5/\text{mL}$	56%
Isatis tinctoria	0,375 µg/mL	$4,5 \times 10^5/\text{mL}$	87%

Tabella 2. Conta cellulare e vitalità delle cellule HepG2 trattate per 24h con i 5 campioni in esame.

6. COMET Assay

La gel elettroforesi su singola cellula (SCGE, single cell gel electrophoresis) fu introdotta per la prima volta da Ostling e Johanson nel 1984 come tecnica adatta per la visualizzazione diretta del danno al DNA in cellule individuali. Un esiguo numero di cellule irradiate e sospese in un gel di agarosio su un vetrino da microscopio, vengono lisate da detergenti ed alte concentrazioni saline, e sottoposte ad elettroforesi, in condizioni di neutralità. Il DNA danneggiato, estratto dal nucleo durante la corsa elettroforetica, migra verso l'anodo conferendo alla cellula la morfologia caratteristica di una cometa. Il DNA migrato viene quantificato utilizzando il bromuro di etidio, un colorante specificamente affine per il DNA stesso, e misurandone l'intensità di fluorescenza .

Il metodo originale è stato successivamente modificato al fine di accrescerne la sensibilità: sono state introdotte condizioni denaturanti (pH elevato) durante la corsa elettroforetica, e ciò ha permesso di rilevare rotture del DNA a singolo filamento e siti sensibili agli alcali. Cellule con aumentato danno al DNA mostrano un incremento di migrazione del DNA, a partire dal nucleo, verso l'anodo (Figura 3a e 3b).

Il Comet Assay consente l'analisi quantitativa del danno presente nel DNA cellulare attraverso la valutazione del livello di frammentazione del DNA stesso. Le concentrazioni scelte per ciascun campione sono riportate in Tabella 3.

CAMPIONE	Concentrazione
CTR (controllo negativo)	-
Reseda luteola L.	6,25 mg/mL
Reseda lutea L.	0,375 mg/mL
L'Anthemis tinctoria L.	6,25 mg/mL
Solidago virgaurea	0,375 mg/mL
Isatis tinctoria	0,375 µg/mL

Tabella 3. Concentrazioni scelte in base ai precedenti risultati.



Figura 3a. CTR negativo, cellula sana

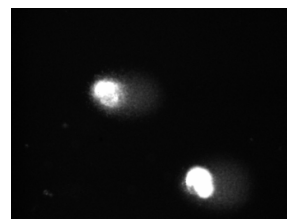


Figura 3b. CTR positivo, cellule con DNA frammentato

Alle concentrazioni scelte, in base ai precedenti risultati ottenuti, il Comet Assay è risultato non essere genotossico per nessuna delle sostanze in esame, come si evince dalla figura 4.

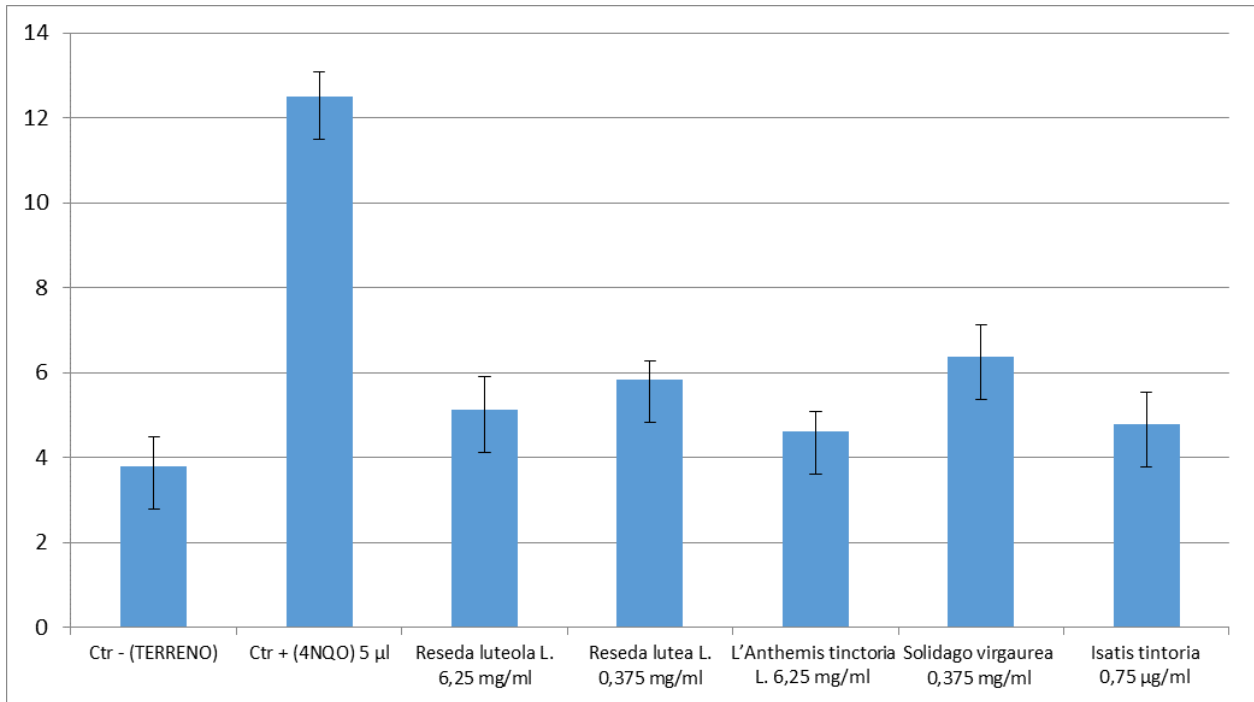


Figura 4. Comet Assay su cellule epatiche HepG2 trattate con i 5 coloranti in esame alle concentrazioni risultate non citotossiche con i saggi precedentemente effettuati.

7. Gene Expression tramite Real-Time PCR

Data la possibile azione sulla crescita e la diffusione tumorale dei polifenoli e delle altre molecole biologicamente attive, presenti nelle 5 diverse sostanze naturali saggiate, è stata valutata la possibile azione sulla regolazione di un pannello di geni umani, rappresentanti i principali meccanismi molecolari coinvolti nella progressione tumorale e nella metastatizzazione. Le cellule di epatoma umano HepG2 sono state trattate e mantenute a contatto con la concentrazione di estratto non citotossica e non genotossica per 24 ore.

Il pannello di geni è stato acquistato già preformato dalla Applied Biosystem.

Le cellule trattate con gli estratti per 24 ore sono state utilizzate per l'estrazione dell'RNA totale (Kit della Applied Biosystem) e una adeguata quantità di RNA messaggero è stata retro trascritta (Kit della Applied Biosystem) ed il cDNA ottenuto è stato impiegato per eseguire una RealTime-PCR.

Con il metodo della quantizzazione relativa sono stati calcolati gli "exponential fold" relativi ad ogni gene del pannello, valori che consentono di stabilire se un gene del pannello viene ipo o alternativamente iperespresso rispetto ad un controllo.

Come controllo sono state utilizzate le cellule HepG2 non trattate, ma semplicemente lasciate per 24 ore a contatto terreno completo.

I valori ottenuti, quelli relativi alle cellule trattate con *Reseda luteola* L., *Reseda lutea* L., *l'Anthemis tinctoria* L. (Camomilla dei tintori), *Solidago virgaurea* (Verga d'oro) e *l'Isatis tinctoria* sono riportati di seguito in tabella 4.

Alle concentrazioni utilizzate le sostanze saggiate non hanno effetti regolatori sulla gene expression, ovvero non ci sono geni down-regolati o alternativamente up-regolati in maniera evidente. I cambiamenti non sono significativi, infatti solo i geni con "exponential fold" inferiore a 0,6 o superiore a 2 possono essere considerati rispettivamente sinonimo di mancata trascrizione o aumentata trascrizione.

GENI	Reseda luteola L.	Reseda lutea L.	L'Anthemis tinctoria L.	Solidago virgaurea	Isatis tinctoria
18S	0,92	1,01	0,95	0,93	0,96
GAPDH	1,00	1,00	1,00	1,00	1,07
HPRT1	1,31	1,01	1,24	1,56	1,04
GUSB	1,21	0,98	1,23	1,00	0,98
ABL1	1,22	1,08	1,44	0,95	1,00
AKT1	1,20	1,07	1,41	0,82	1,06
AKT2	1,01	0,98	1,36	1,15	1,01
APC	1,00	1,24	0,86	1,04	1,00
BAX	1,26	1,12	1,40	0,99	1,01
BCAR1	0,73	1,12	1,21	1,55	0,98
BCL2	0,86	1,47	1,45	1,24	1,08
BCL2L1	0,81	1,03	1,66	1,48	1,07
BCL2L11	0,87	0,96	0,96	0,74	0,98
BID	1,19	1,07	1,39	1,29	1,24
BRAF	1,03	1,04	0,84	0,83	1,12
CASP8	1,09	0,98	0,82	1,11	1,12
CASP9	1,10	1,00	1,17	0,97	1,21
CCND1	0,98	1,06	1,05	1,00	1,22
CCND2					
CCND3	1,59	1,75	1,51	1,17	1,11
CCNE1	1,22	1,34	0,80	0,93	0,97
CDC42					
CDH1	1,30	0,96	0,74	0,86	0,84
CDK2	1,35	1,08	0,93	0,86	0,82
CDK4	1,53	1,07	1,11	0,80	0,93
CDKN1A	1,13	1,25	1,64	1,32	1,11
CDKN1B	0,85	0,98	1,34	1,22	1,48

CDKN2A	1,49	1,51	1,48	0,96	0,74
CDKN2B					
COL1A1	1,21	1,12	0,79	0,89	0,95
CRK	0,81	1,26	1,86	1,64	0,82
CTNNB1	0,82	0,95	0,92	1,07	1,15
CYCS	1,32	1,35	0,80	1,00	1,04
DVL1	0,85	1,01	1,73	0,97	0,99
E2F1	1,30	1,13	1,37	1,45	1,55
EGFR	0,54	0,99	1,82	1,51	1,12
ELK1	1,07	1,19	1,04	1,13	1,47
ERBB2	0,93	0,94	0,80	1,04	1,03
FADD	0,96	0,96	0,82	0,90	0,96
FAS	1,27	1,04	0,89	1,06	1,07
FASLG					
FGF2					
FN1	0,67	0,93	1,62	1,04	1,00
FOS	1,12	1,45	1,77	0,90	1,06
FYN					
FZD1	1,33	1,38	1,28	0,96	1,00
GRB2	1,00	1,19	0,85	1,36	1,04
GSK3B	1,01	1,13	0,91	1,19	0,98
HGF					
HRAS	1,29	1,13	0,98	0,87	0,94
IGF1					
IGF1R	0,86	0,96	1,58	0,81	0,88
ITGA2B					
ITGAV	0,72	0,96	1,73	1,01	1,29
ITGB1	0,88	1,50	1,12	1,37	0,83
ITGB3	1,56	1,02	1,49	0,80	1,11
JUN	1,13	0,95	1,31	1,01	0,97

KDR					
KIT					
KRAS	0,61	1,48	0,81	0,79	1,74
LEF1	1,20	1,27	1,63	0,82	1,56
MAP2K1	0,64	1,06	1,10	0,94	1,06
MAP3K5					
MAPK1	0,98	1,01	0,89	0,93	0,96
MAPK14	0,89	0,94	1,47	1,78	1,50
MAPK3	1,08	0,97	1,59	1,43	1,02
MAPK8	0,99	0,95	0,77	0,83	0,95
MAX					
MDM2	1,06	1,01	0,95	1,31	0,72
MYC	0,76	0,97	1,22	1,74	0,88
NFKB1	1,24	1,03	1,11	1,56	1,56
NFKB2	0,80	1,01	1,74	1,06	1,13
NFKBIA	1,26	0,98	1,36	0,84	0,89
NRAS	0,98	1,03	0,75	1,13	1,47
PIK3CA					
PIK3R1	0,85	0,96	0,90	1,11	1,01
PTEN	0,74	0,95	0,77	0,77	0,97
PTK2	0,76	0,99	1,33	0,96	1,03
PTK2B	0,90	0,95	1,10	0,77	1,01
RAC1	0,89	0,99	0,91	0,93	0,98
RAF1	0,91	1,39	1,17	0,89	1,22
RB1	0,79	0,95	0,91	0,99	1,11
RELA	0,88	1,16	1,03	0,95	0,91
RHOA					
SHC1	0,99	1,25	1,39	1,07	0,93
SMAD4	0,79	0,96	0,97	1,19	1,78
SOS1	0,58	0,92	1,64	1,43	1,43

SPP1	1,09	0,95	1,38	1,92	0,83
SRC	0,82	0,98	1,56	0,92	0,96
TCF3	1,10	1,58	1,72	1,37	0,92
TGFB1	1,24	1,12	1,73	1,30	1,15
TGFBR1	0,77	0,97	0,83	0,82	0,98
TGFBR2	0,91	0,97	1,53	1,39	0,93
TP53	1,48	1,46	1,09	1,06	1,29
VEGFA	0,75	0,97	1,42	0,97	0,99
WNT1					

Tabella 4. Gene expression tramite Real Time PCR.

I risultati ottenuti su questo pannello di geni indicano che i colorati utilizzati non sono fattori di rischio per lo sviluppo di tumori. Infatti i coloranti alle concentrazioni utilizzate non sembrano interferire con i meccanismi molecolari coinvolti nella progressione tumorale e nella metastatizzazione. Questi risultati unitamente a quelli che indicano che i coloranti naturali non sono ne citossici ne genotossici sono a favore di un loro maggiore utilizzo nei processi di colorazione.

Bibliografia:

1. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96(2-3):67-202.
2. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002; 13(10):572-584.
3. Kaur S, Kenny HA, Jagadeeswaran S, Zillhardt MR, Montag AG, Kistner E, Yamada SD, Mitra AK, Lengyel E. β 3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. *Am J Pathol.* 2009; 175(5):2184-2196.
4. Pliny. Natural History, Volume VII, Books 24-27. Index of Plants, 1956. Loeb Classical Library N° 393. Harvard University, Press, Cambridge.
5. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology.* 1999; 299C: 152-178.
6. Woelfle U, Simon-Haarhaus B, Merfort I, Schempp CM. Reseda luteola L. extract displays antiproliferative and pro-apoptotic activities that are related to its major flavonoids. *Phytother Res.* 2010; 24(7):1033-6.
7. Xu K, Liu B, Ma Y, Du J, Li G, Gao H, Zhang Y, Ning Z. Physicochemical properties and antioxidant activities of luteolin-phospholipid complex. *Molecules.* 2009; 14(9), 3486-3493.

Azione 6 – Test di tinteggio di fibre di lana e cashmere

Partner coinvolto FERRINI SRL

Le prove tintorie mediante estratti acquosi ottenute da piante coloranti (bagni di colore) sono inizialmente state realizzate in maniera tradizionale, in modo da avere un confronto con le tecnologie derivanti dall'uso delle argille sintetiche (oggetto del progetto). In questa prima parte del progetto sono state studiate le capacità tintorie della Reseda lutea, della Anthesis tinctoria, della Solidago virgaurea e dell'Isathis tinctoria. Questi risultati sono necessari per un'adeguata comparazione con i coloranti realizzati in questo progetto che coinvolgono le argille sintetiche nel processo tintorio al fine di valutarne il loro vantaggio nel processo.

Il gruppo di lavoro

Il gruppo di lavoro che ha eseguito le prove tintorie presso il laboratorio interno delle tintorie Ferrini Srl è composto da quattro operatori specializzati in diverse mansioni. Il gruppo in genere si riunisce il lunedì per definire il programma della settimana insieme al titolare. In queste occasioni il responsabile scientifico del gruppo organizza la discussione degli argomenti e raccoglie i suggerimenti sulla fattibilità dei progetti oggetto della discussione. Per il progetto in esame, dato l'alto grado di innovazione e di riservatezza delle tecnologie, sono stati organizzati numerosi incontri di approfondimento con i responsabili della Prolabin & Tefarm (Capofila del progetto) e con il coordinatore amministrativo e scientifico del progetto (Fioretti Bernard). Le mansioni presenti nel gruppo di lavoro sono:

Attività recettoriale: la figura che svolge questa attività ha il compito di elaborare i processi propedeutici al tinteggio, come l'imbianchimento e la mordenzatura, e di definire l'esatta sequenza e parametrizzazione della tintura; valuta le materie prime da utilizzare; accede all'archivio dell'azienda per studiare prove tintorie pregresse su cui apportare razionalmente le modifiche. Questa operazione viene svolta principalmente dalla Dr.ssa Teresa Biondi.

Attività tintorie: la figura che svolge questa attività ha il compito di eseguire praticamente le fasi propedeutiche alla tintura e la tintura stessa. La sua principale expertise è quello di conoscere il funzionamento delle macchine per la tintura e di programmarle. Questa operazione viene svolta principalmente dal Sig. Elio Checcarelli.

Attività analitica per la verifica della solidità della tintura: per ogni tinta realizzata sono eseguite le prove di solidità in base alla normativa di riferimento. I principali test eseguiti sono solidità del colore allo sfregamento sia secco che umido, al lavaggio a 40 gradi e nelle condizioni di sudore alcaline e per fotostabilità. Questa operazione viene svolta principalmente dalla Dr.ssa Teresa Biondi.

Attività archivistica: la figura che svolge questa attività ha il compito di organizzare la cartella con tutti i test eseguiti su un determinato campione e di catalogare la prova fatta per suo futuro riesame depositandola nell'archivio dell'azienda. Questa operazione viene svolta principalmente dal Sig. Marco Zucchettini.

Responsabile del laboratorio e dell'attività di valutazione. La sua funzione è quella di armonizzare il gruppo di lavoro e seguire ogni fase del processo in sinergia con il personale specializzato. Alla fine del processo valuta

la qualità della tintura attribuendo giudizi in base alla normativa vigente. Questa operazione viene svolta principalmente dal Dr. Andrea Papi.

La tintura

Quando si parla di tintura in senso industriale, si intende quella operazione che consente la colorazione dei tessuti, dei filati e delle pelli: non si tratta, quindi, di una vera e propria pittura, dato che provoca la penetrazione del colore in tutto il corpo dell'oggetto. La colorazione stessa avviene sia per mezzo dell'assorbimento meccanico da parte del tessuto, sia per reazione chimica di questo con il cosiddetto colorante. I due effetti avvengono di solito in contemporanea, sebbene in misura differente a seconda del tipo di colore e di materiale. La tintura delle stoffe in alcuni casi è preceduta dalla fase di imbianchimento e dalla mordenzatura.

Scopo del progetto è risolvere alcuni aspetti negativi inerenti la tintura con piante tintorie e in questa fase del progetto l'intero partenariato, compresa la tintoria Ferrini srl, si è concentrato sulle piante tintorie tradizionalmente utilizzate per tingere i tessuti di giallo (Verbale del 9 settembre 2013). Le specie prese in considerazione nell'intera filiera sono l'Anthesis tinctoria, la Reseda lutea e Solidago virgaurea, tutte piante contenenti flavonoidi (vedi Tabella 4.1). Nella fase di ricettazione (protocollo utilizzato per tingere una fibra generalmente bianca) per recuperare in senso industriale queste tecniche tradizionali sono state prese in considerazioni molte variabili come il tipo di mordenzante e il tempo di mordenzatura, il tipo di acidificante, il tempo di tinteggio e la temperatura di tinteggio etc. Le ricette nel dettaglio saranno descritte nelle sezioni dei risultati, mentre qui descriviamo le varie operazioni intorno ad un processo di tintura. Una ricetta per la tintura con Reseda lutea è illustrata nella foto di seguito (Figura 6.1)

gr/l O %	RICETTA	QUANTITÀ
15%	CON ACQUA DI POZZO PAIMORDENT SOFT RIMANERE A 90°C PER 60' SCIACQUARE FINO AD ACQUA LIMPIDA	5gr
10%	RESEDA BIO-U RESEDA BIO-U 50' x 10' RIMANERE A 90°C PER 60'	4gr
1,5 cc/lit	TOGLIERE IL SACCHETTO E STRIZZARE, POI: ACIDO ACETICO MESCOLARE INSERIRE IL FIOCCO 90 A 90°C PER 60' SCIACQUARE, SCARICARE	1,2 cc

Figura 6.1. Tipica ricetta di tintura con Reseda lutea. In questa semplice ricetta si possono osservare due fase: 1) la fase di mordenzatura e 2) la fase di tintura.

Nella ricetta sopra mostrata è prevista una propedeutica mordenzatura della fibra, trattamento al quale vengono sottoposti i filati, in genere prima della tintura, per favorire il legame tra la fibra e il colorante. La maggior parte dei coloranti naturali infatti non riesce a legarsi alle fibre in maniera stabile senza l'utilizzo di un mordente. I mordenti sono solitamente sali di metalli che vanno a formare dei complessi metallici tra le fibre e i composti coloranti.

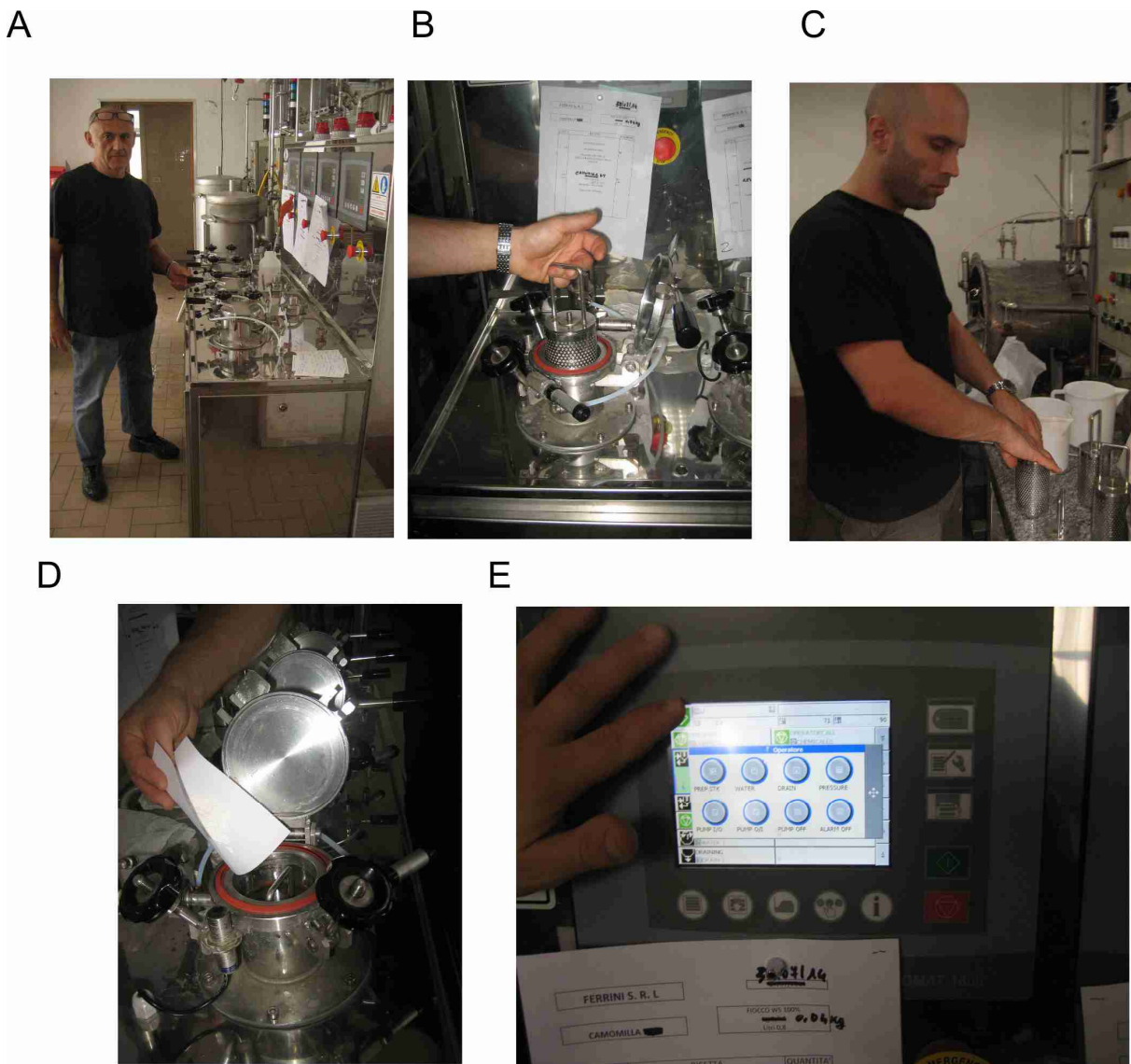


Figura 6.2. La mordenzatura. A) Macchina termica dove viene realizzata, se richiesta, la mordenzatura e il tinteggio; B) Particolare della macchina termica dove è visibile il cestello contenuto all'interno della camicia del cilindro; C) Fase di riempimento del cestello con il cashmere; D) Dopo aver posto il cestello all'interno della camicia viene aggiunto il mordente; E) Display elettronico per controllare i parametri della mordenzatura.

Sia la mordenzatura che la tintura vengono eseguite tramite la stessa macchina costituita da 4 cilindri indipendenti che vengono automaticamente riempiti e il cui grado di riempimento è strettamente controllato elettronicamente e corretto tramite feedback (Figura 6.2 A). L'acqua circola secondo un determinato schema di agitazione e la sua temperatura è regolabile elettronicamente in modo da poter eseguire i profili termici voluti. Il cilindro normalmente è chiuso da una testata che si può rimuovere per ispezionare l'interno e per rimuovere il cestello (Figura 6.2 B) in cui è alloggiata la fibra da tingere, ad esempio il cashmere (Figura 6.2C). Nella Figura 6.2D si può notare il cestello all'interno del cilindro nel momento dell'aggiunta del mordente. Dopo alcuni fasi di mescolamento il cilindro viene chiuso e viene avviato il riscaldamento programmato (Figura 6.2 E). Nella ricetta indicata il volume del bagno tintorio è di 800 ml, la quantità di fiocco è 40 grammi mentre il mordente aggiunto in peso è il 15% rispetto al fiocco cioè 6 grammi. La fase di mordenzatura è condotta a 90 gradi per 60 minuti. Dopo tale periodo il liquido nella camera viene scambiato con acqua fresca e il cestello con il fiocco mordenzato può essere rimosso per alloggiare al suo interno il quantitativo di pianta colorante necessaria per la successiva fase tintoria.

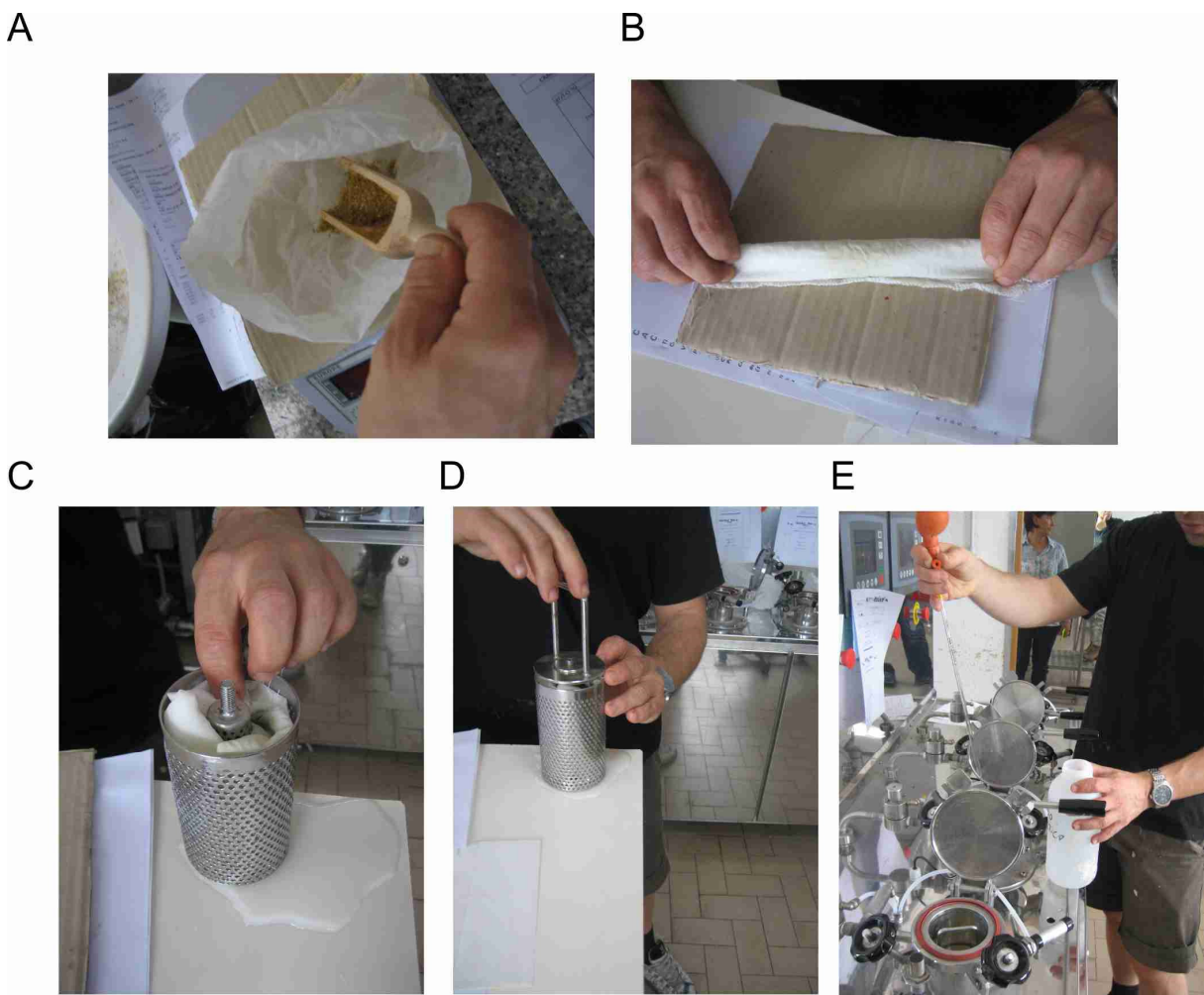


Figura 6.3. Fase del tinteggio.

Il quantitativo di pianta tintoria definito nella ricetta viene pesato (Figura 6.3 A) e posto in una garza (Figura 6.3 B) per essere fisicamente posizionato all'interno del cestello insieme al fiocco mordenzato (Figura 6.3C). Quindi il cestello viene chiuso e riposizionato all'interno del cilindro (Figura 6.3 D e E). Quindi vengono

aggiunti i correttori di pH (in questo caso acido acetico) e la testata viene chiusa per iniziare la fase di tintura (Figura 6.3 E). Il profilo termico nella fase di tinteggio è molto critico, infatti viene programmato anche il tempo necessario per raggiungere la temperatura finale. Nella ricetta in esame la tintura è eseguita a 90 gradi per 60 minuti. Dopo tale periodo il bagno tintorio viene raffreddato ed è possibile ispezionare la camera ripiena del bagno tintorio (Figura 6.4).

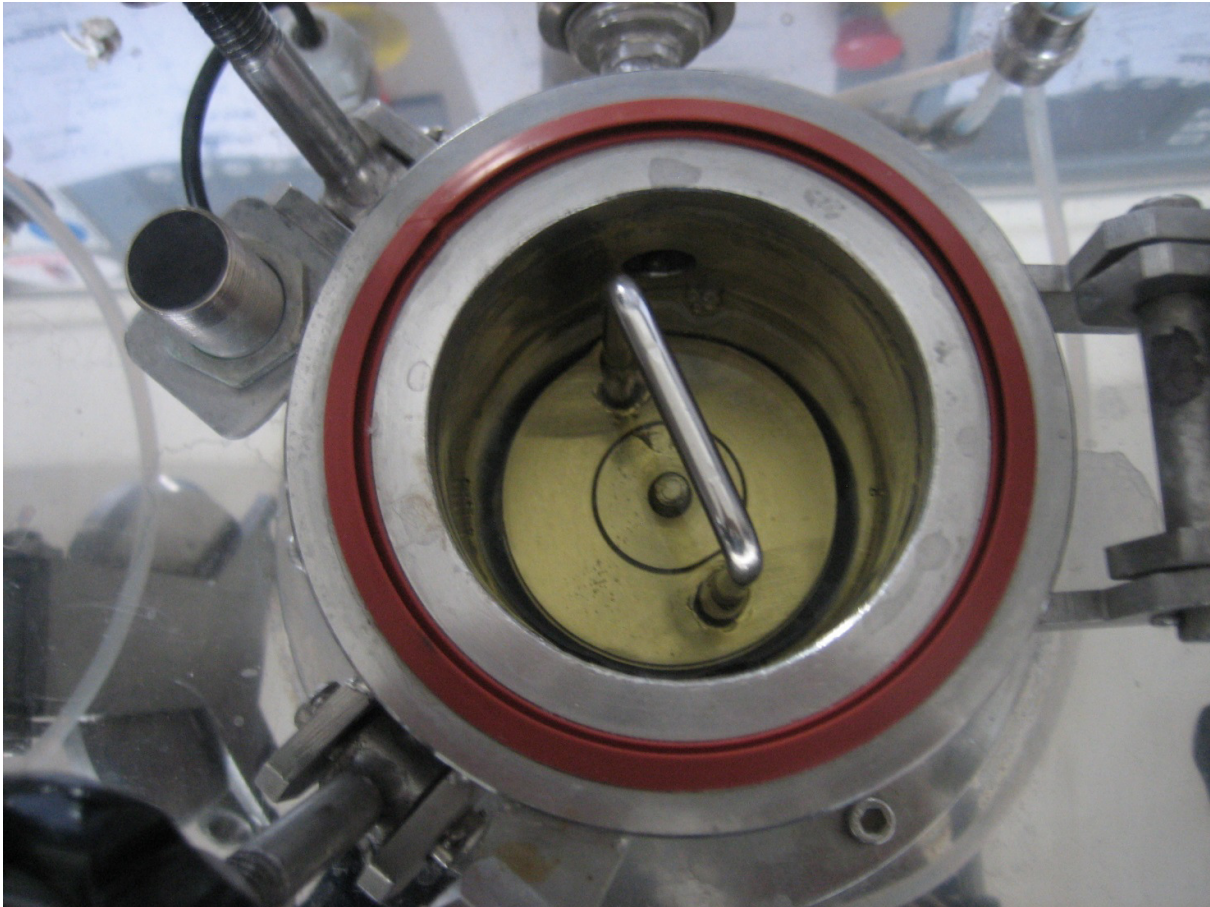


Figura 6.4. Il bagno tintorio. Particolare del bagno tintorio residuo dopo la fase di tintura.



Figura 6.5. Fasi finali della tintura. A) Il cestello aperto la garza contenente la pianta tintoria esausta viene allontanata. B) Il fiocco dopo centrifugazione viene disposto su un supporto di plastica per asciugarlo.

Quindi il cestello viene rimosso dal cilindro, viene aperto e il filtro con il residuo di pianta viene separato dal fiocco tinto (Figura 6.5 A) che viene centrifugato per allontanare l'acqua di imbibizione. Il fiocco disteso su un film di plastica viene lasciato asciugare in attesa dei test di solidità della tintura (Figura 6.5 B).

Test di solidità della tintura

Aspetti normativi

Ogni paese è disciplinato da una propria normativa che definisce gli standard merceologici. Ad esempio la Cina con la normativa 18401/2003 stabilisce i requisiti per il rilascio di un certificato per i prodotti di abbigliamento a tutela del consumatore suddividendoli per tre categorie:

- A) Abbigliamento per bambini
- B) Abbigliamento a contatto con la pelle
- C) Abbigliamento non a contatto con la pelle

Per queste categorie è necessario possedere dei requisiti minimi espressi come indici e delle prove standardizzate per definirli. Di seguito riporto ad esempio la tabella standard dei requisiti minimi per prodotti per export cinese:

Prospetto dei requisiti previsti dallo standard cinese GB 18401-2010

Requisiti		Categoria A	Categoria B	Categoria C
Formaldeide (mg/kg) ≤		20	75	300
Solidità del colore	All'acqua	3-4	3	3
	Al sudore acido	3-4	3	3
	Al sudore basico	3-4	3	3
	Allo sfregamento a secco	4	3	3
	Alla saliva	4	-	-
pH dell'estratto acquoso		4.0-7.5	4.0-8.5	4.0-9.0
Determinazione dell'odore		Nessun odore		
Azocoloranti che possono rilasciare ammine (24 ammine compreso il 4-amminoazobenzene)		Non utilizzo Limite massimo per ciascuna ammina: 20 mg/kg		

Tra i sistemi standard di riferimento esiste un buon accordo tra le principali normative che di seguito indico:

- UNI: Ente Nazionale Italiano di Certificazione
- ISO: International Organization for Standardization
- BSI: British Standard
- DIN: Deutsches Institut für Normung
- ASTM: American Society for testing and Materials
- AATCC: American Association of Textile Chemists and Colorists
- GB: Standard Nazionali Cinese
- AFNOR: Association Française de Normalisation
- JIS: Japanese Standards Association

Test di solidità delle tinte naturali

Le tabelle degli standard riportano gli indici di solidità che è necessario possedere per la tutela del consumatore all'interno delle categorie. I metodi da utilizzare per l'esecuzione delle prove allo scopo di determinare tali indici sono descritti in norme ufficiali che definiscono in modo puntuale la preparazione del campione (provette), le composizioni delle varie soluzioni (ove applicabile), le apparecchiature e le relative specifiche, le condizioni operative, le modalità di valutazione dei risultati.

La preparazione del tessuto per i test di solidità

Dopo la tintura del fiocco quest'ultimo viene lavorato al fine di ottenere un campione di tessuto così come definito dalle varie normative. Infatti i principali test descritti prevedono l'utilizzo di tessuto in quanto rappresenta meglio la forma utilizzata dal consumatore. Per ottenere un pezzo di tessuto, il fiocco deve essere cardato, filato e quindi tessuto. L'azienda Ferrini srl è fornita di una cardatrice da laboratorio, che lavora piccole quantità di fiocco prodotte dalle macchine tintorie descritte nelle sezione precedente (Figura 6.6A). Con la cardatura le singole fibre di cashmere vengono disposte in parallelo il più possibile (Fiocco 6.6B). Il fiocco così cardato viene tagliato e inserito in una macchina filatrice (Figura 6.6 C) e viene trasformato in un filo che viene avvolto in una bobina (Figura 6.6 D). Il filo viene quindi tessuto tramite una macchina tessitrice manuale (Figura 6.6 E) e la quantità di fiocco iniziale di circa 40 gr di cashmere viene trasformato in un tessuto della forma circolare del diametro di circa 5 cm e di lunghezza 15 cm (Figura 6.1 E).

A



B



C



D



E



F



Figura 6.6. La preparazione del tessuto campione. A) Cardatrice di laboratorio in funzione: è possibile vedere in alto il fiocco in fase di caricamento; B) Filo cardato, prodotto finale ottenuto dal fiocco dopo il passaggio della macchina in A); C) Filatrice da laboratorio in funzione: è possibile vedere in centro in basso il filo cardato che alimenta la macchina e il prodotto filato che viene raccolto al centro in alto intorno ad una bobina; D) Bobina di filo ottenuta dopo il processo di filatura; E) Tessitrice manuale: la macchina permette di ottenere un campione di tessuto partendo dalla bobina di filo mostrata in D; F) Campioni di tessuto ottenuti dalla tessitura: quest'ultimo, di forma circolare, ha una lunghezza di circa 15 cm. Da destra a sinistra i campioni sono stati ottenuti utilizzando come tinte naturali *Anthemis tinctoria* e *Reseda lutea* con diverse concentrazioni in tintura.

Solidità allo sfregamento a secco e a umido

Norma: UNI EN ISO 105-X12

La prova viene eseguita utilizzando un'apparecchiatura munita di una caviglia di sfregamento circolare di 16 mm di diametro che si sposta sulla provetta con un movimento di avanti-indietro in linea retta su una lunghezza di 100 mm con una forza di 9 N esercitata verso il basso (Figura 6.7 D).

Nello specifico il tessuto ricavato così come descritto nella sezione precedente viene inserito in un supporto con una adeguata tensione (Figura 6.7 A). La prova viene eseguita posizionando il tessuto di sfregamento sulla caviglia e valutando dopo 10 sfregamenti da eseguire nel tempo di 10 s, lo "scarico" del colore sul testimone (Figura 6.7 B e C). Sono previste due diverse modalità di esecuzione della prova: "a secco" e "a umido"; nel primo caso il tessuto di sfregamento si usa asciutto, nel secondo caso bagnato con acqua (Figura 6.7 E e F).

A



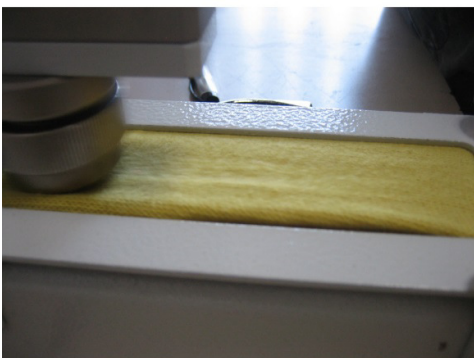
B



C



D



E



F



Figura 6.7. Test sfregamento a secco e a umido. A) Il tessuto da analizzare viene fissato all'interno del supporto in modo da esporre una porzione dove verrà fatto scorrere il testimone. Il alto è possibile vedere il supporto porta testimone, B) Il testimone in tessuto bianco viene alloggiato all'interno del supporto metallico come mostrato in C) e quindi montato sulla macchina; D) Momento dell'atto di sfregamento; E) Preparazione del testimone umido, F) Tessuti testati allo sfregamento con in alto i relativi testimone realizzati secondo la procedura descritta sia con lo sfregamento a secco e in umido.

La preparazione del campione per i test di solidità al lavaggio e al sudore

Per l'esecuzione delle prove di solidità al lavaggio e al sudore alcalino, i campioni (provetta), delle dimensioni di 10 x 4 cm e del peso di circa 1 grammo vengono ricavate dal tessuto descritto nella sezione precedente (Figura 6.8A e B).



Figura 6.8. Preparazione del campione per i test di solidità al lavaggio e al sudore. Il tessuto viene tagliato in pezzi di opportune dimensione A) e peso B).

Il campione viene messo a contatto con i tessuti testimoni multifibra aventi la stessa dimensione (Figura 6.9 A). Il campione e il testimone vengono unite in maniera solidale tramite cucitura (Figura 6.9 C). L'insieme del campione (provetta) e dei tessuti testimoni si definisce provetta composta (Figura 6.9 D). Vengono preparate due provette composte per i due test indipendenti (Figura 6.9 D).

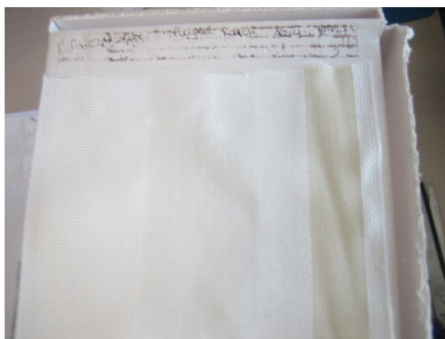


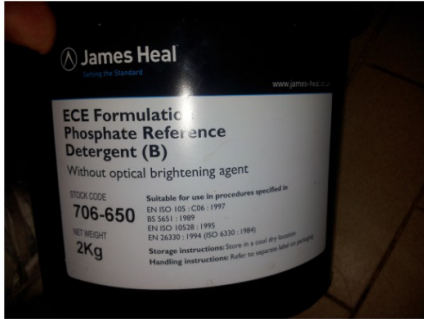
Figura 6.9. Preparazione della provetta composta. A) Nastro di tessuto testimone multifibra; B) Il testimone viene tagliato delle stesse dimensioni del campione da testare; C) Il testimone e campione vengono cuciti in maniera solidale e D) La provetta composta preparata in analoga maniera e vista da lato del testimone in alto e del campione in basso.

Test Solidità al lavaggio a umido

Norma: UNI EN ISO 105-C06

Il test valuta la Solidità del colore al lavaggio domestico e commerciale. La prova si esegue in apparecchiatura di lavaggio in cui viene posta la “provetta composta” e la soluzione di lavaggio in cui è dissolto il detergente. La soluzione di lavaggio è ottenuta diluendo un una standard di detergente ECE alla concentrazione finale di 4 g/l (Figura 6.10A). La provetta composta viene immersa nella soluzione di lavaggio avente volume finale di 50 ml (Figura 6.10B). Le condizioni di lavaggio prevedono di mantenere la temperatura di 40°C per 40 minuti (Figura 6.10C). La valutazione viene effettuata valutando lo scarico del colore sulla fibra testimone utilizzata (Figura 6.10D).

A



B



C



D



Figura 6.10. Test Solidità al lavaggio a umido. A) L’etichetta del detergente ECE, B) Fase di immersione della provetta composta nella beuta con la soluzione che mima il lavaggio domestico e commerciale, C) La condizione di lavaggio viene mantenuta per 40 minuti monitorando continuamente la temperatura (40 gradi). Dopo il tempo indicato la provetta composta viene aperta e asciugata per le successive valutazioni.

Test Solidità al sudore alcalino

Norma: UNI EN ISO 105-E04

Il test valuta la Solidità del colore al sudore.

Il test prevede un’iniziale bagnatura della “provetta campione” mediante immersione in un recipiente a fondo piatto contenente una soluzione alcalina di sudore sintetico per 30 minuti a temperatura ambiente (Figura 6.11). Quindi la provetta composta viene spremuta fino a ottenere un peso complessivo da 2 a 2,5 volte il peso originale e inserita nel dispositivo che mantiene la pressione di 12.5 kPa per 4 ore e alla temperatura di $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 6.12). La pressione viene ottenuto tramite l’utilizzo di un perspirometro dove viene alloggiata la provetta composta. La soluzione alcalina di sudore sintetico ha pH 8 e si ottiene solubilizzando in acqua L-istidina cloridrato, cloruro di sodio, fosfato bisodico, idrossido di sodio secondo una precisa formulazione riportata nella norma. La valutazione della “degradazione” e dello “scarico” del colore del campione sui tessuti testimoni viene effettuata dopo asciugamento della provetta a una temperatura inferiore a 60°C.

A



B



C



D

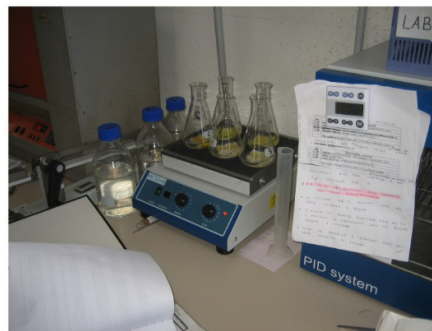
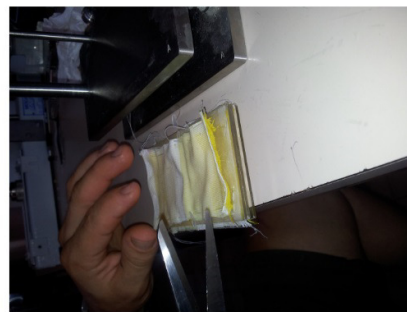


Figura 6.11. Test solidità al sudore alcalino: la bagnatura del campione provetta. A) e B) I campioni provetta vengono inserite in delle indipendenti beute in cui in precedenza sono stati posti 50 ml di sudore sintetico; Le provette vengono quindi immerse con l'ausilio di una bacchetta di vetro e D) messe in agitazione.

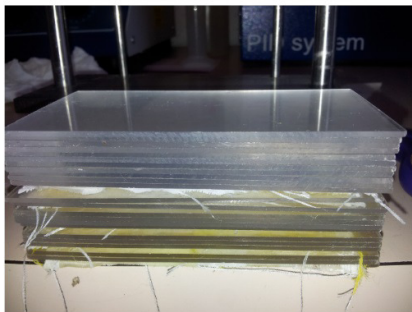
A



B



C



D



Figure 6.12. Test solidità al sudore alcalino: l'uso del perspirometro. A) Il perspirometro prima dell'uso è composto da delle lastre metalliche che esercitano una pressione sugli strati sottostanti. B) Il campione composto viene rimosso dal bagno alcalino e preparato per essere inserito nel perspirometro, C) sandwich formato dalle varie provette composte D) Il perspirometro viene chiuso e applicata una pressione definita quindi il tutto viene termostato per 4 ore.

Solidità alla luce

Norma: UNI EN ISO 105-B02

Test per la solidità del colore alla luce artificiale. La prova viene eseguita posizionando la provetta in una apparecchiatura (solar box) dove viene illuminata da una lampada che mima il sole a 2000 m di altitudine.

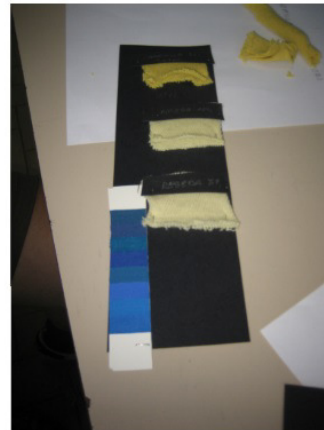
La “degradazione della provetta” viene valutata utilizzando la “scala dei blu”. Le provette vengono fissate su un supporto nero (Figura 6.13 A) insieme ad un testimone costituito da 8 strisce di tessuto di lana blu (Figura 6.13 B), numerate da 1 (solidità alla luce molto debole) a 8 (solidità alla luce molto alta) e costituite in modo che ogni striscia abbia approssimativamente una solidità alla luce doppia della striscia che la precede. Quindi il tutto viene alloggiato nella solar box (Figura 6.13 C e D).

La normativa prevede due fasi: nella prima fase di esposizione, la provetta e la scala sono coperte nella parte centrale con uno schermo metallico. La prova viene interrotta quando si rileva un contrasto tra zona esposta e non esposta pari al 4 della scala dei grigi, mentre nella seconda fase si scherma una seconda parte laterale dell’insieme provetta/scala campione e si procede con l’esposizione fino ad una degradazione tra la parte completamente esposta e la parte non esposta della provetta uguale all’indice 3 della scala dei grigi. Terminata la prova, si tolgono gli schermi dalle strisce esposte e si confrontano, per le 2 superfici esposte per tempi differenti, le degradazioni della provetta con le degradazioni della scala campione. La solidità alla luce è il numero della striscia della scala testimone che risulta approssimativamente degradata come la provetta. Nella pratica corrente di laboratorio si esegue solo una fase di occlusione e il tempo necessario viene determinato dall’esperienza (Figura 6.13).

A



B



C



D

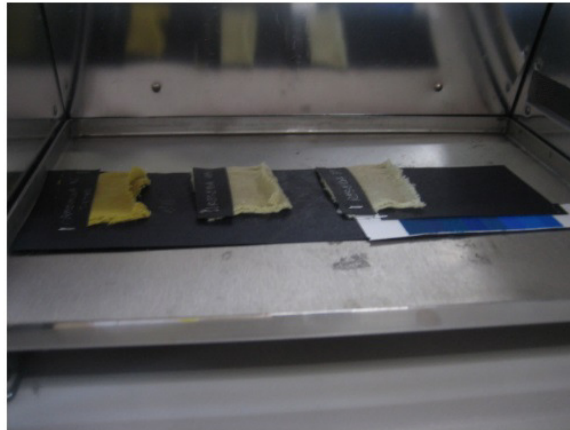


Figura 6.13. Test di solidità alla luce. A) La provetta viene fissata su un supporto nero, B) Varie provette sono alloggiato sullo stesso supporto insieme al testimone con scale dei blue, C) Il tutto viene posto nella solarbox, D) Particolare della camera della solarbox in cui viene alloggiato i campioni e il testimone da irraggiare.

Valutazione della prove tintorie.

La valutazione della solidità, in funzione della tipologia di prova, si valuta in termini di “degradazione del colore” del campione e di “scarico” del colore del campione sui tessuti testimoni.

La valutazione della “degradazione” è basata sulla entità del contrasto tra la provetta dopo la prova e quella del tessuto originale. La valutazione dello “scarico” avviene mediante valutazione visiva della variazione di colore del tessuto testimone.

Il livello di degradazione e scarico si esprime mediante “indici di solidità” definite da scale campione: Scale dei grigi descritte in dettaglio nelle due norme specifiche UNI EN 20105-A02 e UNI EN 20105-A03 e Scala dei blu, nel caso della prova di solidità alla luce.

La valutazione visiva, di gran lunga la più utilizzata, viene effettuata in cabina di valutazione; le provette devono essere disposte affiancate ai campioni originali e i testimoni utilizzati per la prova affiancati ai testimoni originali; sullo stesso piano devono essere poste le scale dei grigi. Le superfici da confrontare sono illuminate dalla luce diurna (D_{65}), con angolo di incidenza di circa 45° e l’osservazione deve essere perpendicolare al piano della superficie.

Scale dei grigi

Per l’assegnazione degli indici di solidità si utilizzano due scale: scala dei grigi per determinare la degradazione del colore; scala dei grigi per determinare lo scarico del colore.

Entrambe le scale sono costituite da una scala base a 5 indici, definite da 5 coppie di strisce non lucide che rappresentano le differenze di colore percepite corrispondenti rispettivamente agli indici di solidità 5 - 4 - 3 - 2 - 1. Queste scale base possono essere completate con altre coppie di strisce che rappresentano le differenze di colore percepite corrispondenti agli indici intermedi di solidità 4-5, 3-4, 2-3 e 1-2; tali scale ampliate sono definite scale a 9 indici.

Nella scala per la valutazione della degradazione, la prima parte di ciascuna coppia è di colore grigio neutro e la seconda parte, che corrisponde all’indice di solidità 5, è uguale alla prima parte. Le seconde parti delle altre coppie sono di colore grigio via via più chiaro così che ciascuna coppia rappresenta contrasti visivi crescenti.

Nella scala per la valutazione dello scarico, la prima parte di ciascuna coppia è di colore bianco e la seconda parte, che corrisponde all’indice di solidità 5, è uguale alla prima parte.

Le seconde parti delle altre coppie sono di colore grigio via via più scuro così che ciascuna coppia rappresenta contrasti visivi crescenti.

Azione 7 – Coordinamento

L'azione prevede il coordinamento amministrativo e scientifico del progetto.

Partner coinvolti: Prolabin & Tefarm (Capofila)

Sono state svolte varie riunioni tra i partner dell'ATS, varie riunioni interne e sopralluoghi. Molte delle attività sono state coordinate dal Dr Fioretti Bernard in base al contratto di consulenza stipulato per il progetto in esame. In particolare:

- a. Attività di raccolta dati ed organizzazione per l'organizzazione del progetto e per la presentazione di integrazioni richieste dalla regione Umbria.
- b. Coordinamento ed esecuzione, adempimenti burocratici per la creazione dell'associazione temporanea di scopo (ATS). Nel periodo in esame sono state organizzate varie riunioni del consiglio dell'ATS (vedi verbali allegati) al fine di organizzare le attività del progetto.
- c. Preparazione domanda di richiesta del SAL attraverso la raccolta della documentazione dai membri dell'ATS i come le fatture, i contratti, le buste paga, i documenti di trasporto, i documenti attestanti i pagamenti del personale e quant'altro necessario per la rendicontazione.
- d. Preparazione domanda di richiesta del SALDO attraverso la raccolta della documentazione dai membri dell'ATS i come le fatture, i contratti, le buste paga, i documenti di trasporto, i documenti attestanti i pagamenti del personale e quant'altro necessario per la rendicontazione.
- e. Aggiornamento della documentazione tecnica (relazione tecnica) e dei documenti amministrativi (relazione analitica dei costi).

Azione 8 – Organizzazione di eventi di diffusione dei risultati

L'attività di divulgazione dei risultati ottenuti nell'ambito del progetto è rivolta ad aziende agricole e della trasformazione

Partner coinvolti: Prolabin & Tefarm (Capofila) e Parco Tecnologico

Le attività promosse dal Parco tecnologico 3A sono state consegnate in un plico cartaceo dedicato insieme alla documentazione amministrativa.