

Green Home day

Polo di Innovazione per l'Edilizia Sostenibile



Ricerca e Innovazione con Green Home s.c.ar.l.

23 febbraio 2023 ore 09:30

 University Club, Università della Calabria, Rende (CS)

Ecocalmix project: ECOFRIENDLY MIX BASED ON CALABRIAN CLAY FOR TANNING APPLICATIONS

M.F. La Russa¹, L. Randazzo², M. Ricca¹, **S.A. Ruffolo¹**, C. Diliberto Cascio¹, G. Cozza³, A. Luraghi³, G. Barsotti³, A. Caserta³, M. Barone³, L. Gargani³

¹ Department of Biology, Ecology and Earth Science, University of Calabria, Italy

² Department of Earth and Marine Sciences, University of Palermo, Italy

³ ALPA S.p.A., Italy



POR Calabria
2014-2020
Fesr-Fse

il futuro è un lavoro quotidiano



UNIVERSITÀ
DELLA CALABRIA



DIAM



ORDINE
INGEGNERI
COSENZA



ORDINE DEGLI
ARCHITETTI
PIANIFICATORI
PAESAGGISTI
CONSERVATORI
COSENZA

Con il patrocinio di



ECOCALMIX PROJECT: ECOFRIENDLY MIX BASED ON CALABRIAN CLAY FOR TANNING APPLICATIONS



PARTNERS OF THE PROJECT ECOCALMIX



FUNDED BY



POR Calabria
 2014-2020

Fesr-Fse

il futuro è un lavoro quotidiano



STARTING DATE: 29/09/2021
 DURATION 18 MONTHS



WORKING PLAN: 5 WORK PACKAGES (WP1, WP2, WP3, WP4 and WP5)



Selection of clayey raw materials, selection of the type of tanning material to be treated

WP1

WP2

Application of treatments (classic and with new formulations) to selected skin types

Comparison between the various types of treatment and choice of the solution with the best performances

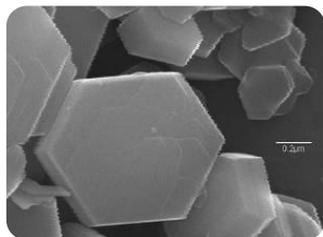
WP3

WP4

Project coordination and management

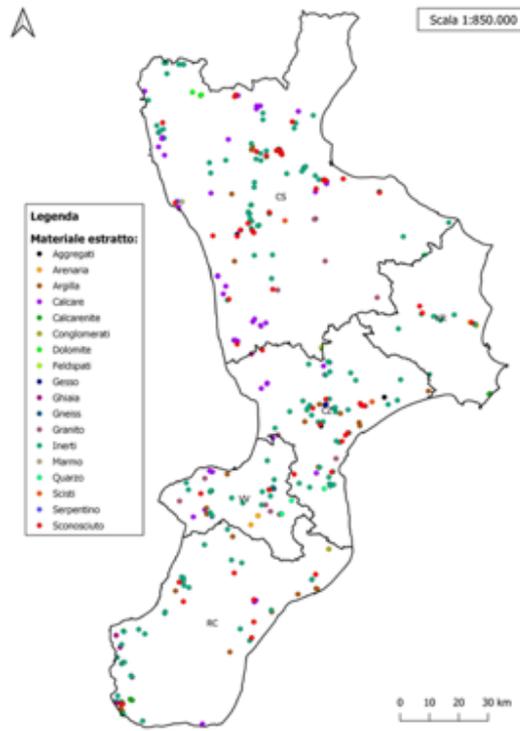
Dissemination and exploitation of results

WP5





WP1: SELEZIONE DELLE MATERIE PRIME ARGILLOSE (UNICAL) E SELEZIONE DEL TIPO DI PELLAME DA TRATTARE (ALPA)



1. CORIGLIANO-ROSSANO (CS)
2. LATTARICO (CS)

*scelta dettata oltre che dalle caratteristiche delle materie prime argillose anche dalla presenza di una concessione attiva per l'attività estrattiva

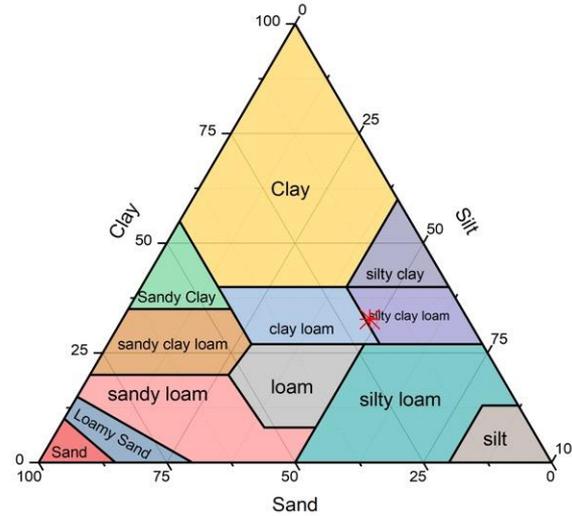
SITI ESTRATTIVI NEL TERRITORIO CALABRESE E INDICAZIONE DELLA TIPOLOGIA DI MATERIALE ESTRATTO (Fonte Regione Calabria)

(Fonte ISPRA)

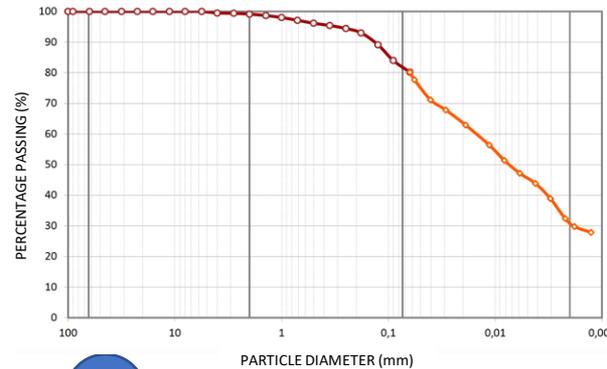


Campionamento e caratterizzazione preliminare dei depositi argillosi

1 SAMPLING



PEBBLES	GRAVEL	SAND	SILT	CLAY
---------	--------	------	------	------



2 PRELIMINARY ANALYSIS



POR Calabria
 2014-2020

Fesr-Fse

il futuro è un lavoro quotidiano



UNIONE EUROPEA
 FASD/STRUTTURA LE SVILUPPO EUROPEO



REPUBBLICA ITALIANA



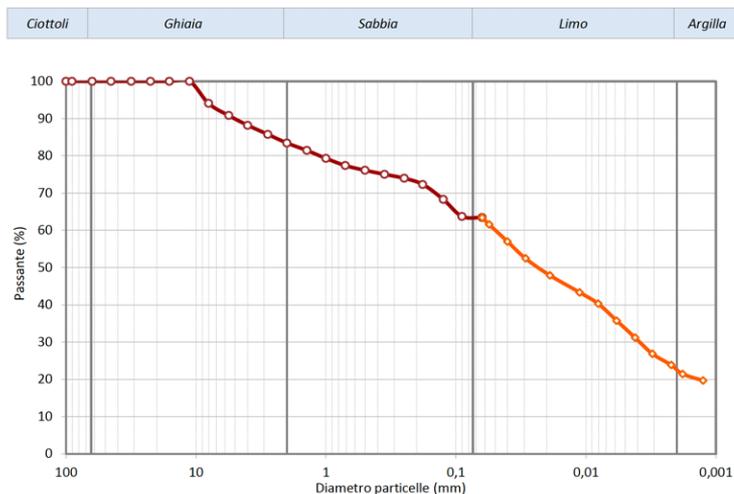
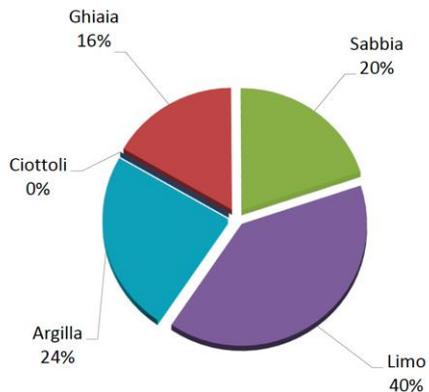
REGIONE CALABRIA





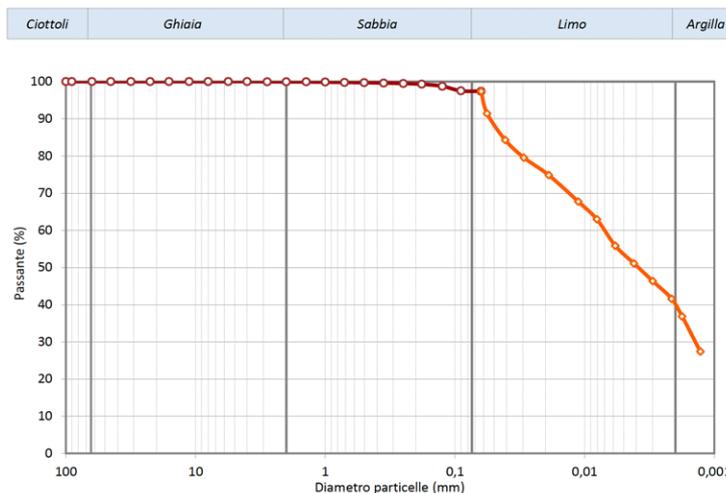
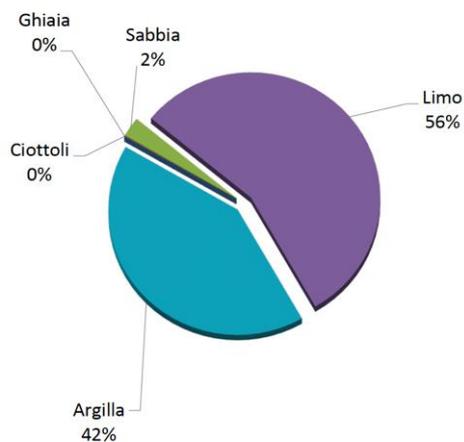
1

CORIGLIANO-ROSSANO



2

LATTARICO



Analisi granulometrica dei depositi argillosi



POR Calabria
 2014-2020

Fesr-Fse

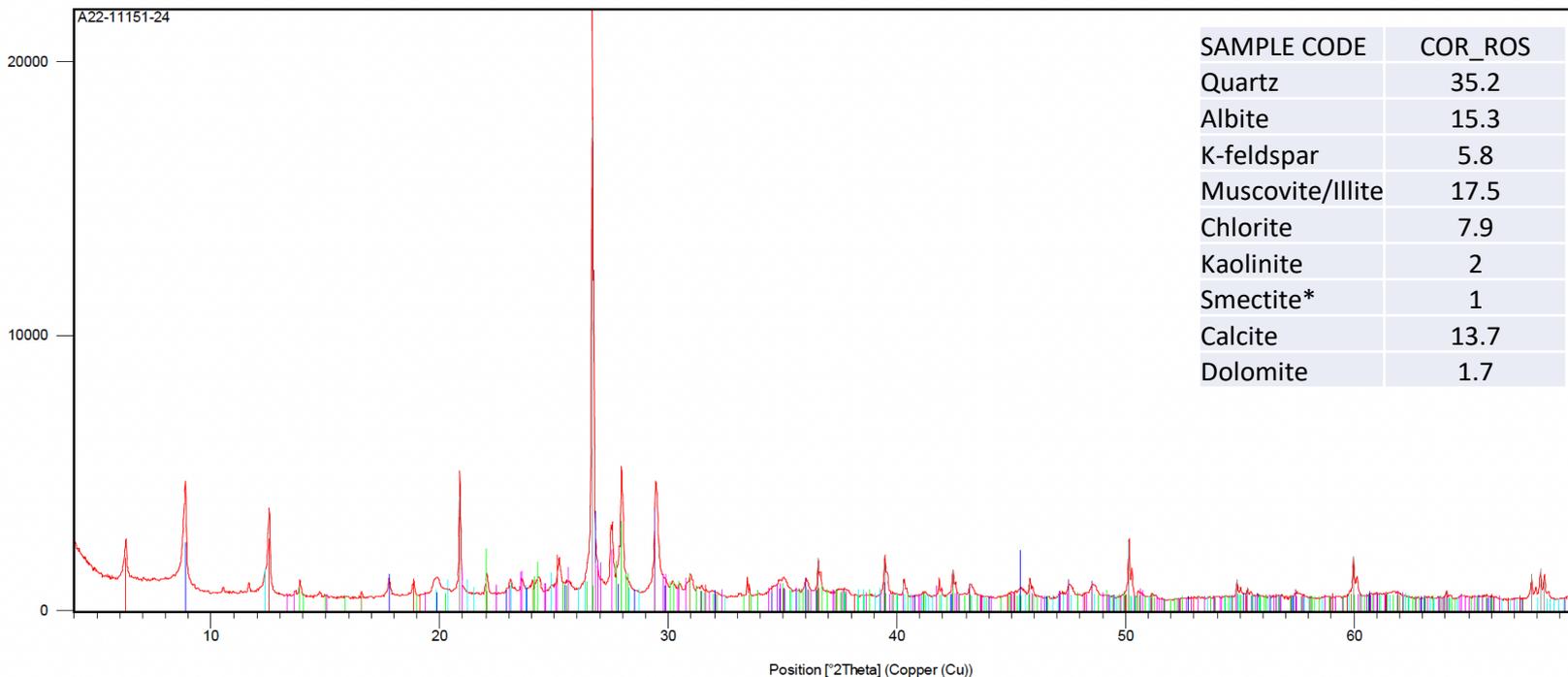
il futuro è un lavoro quotidiano





1 CORIGLIANO-ROSSANO

Analisi MINERALOGICA dei depositi argillosi

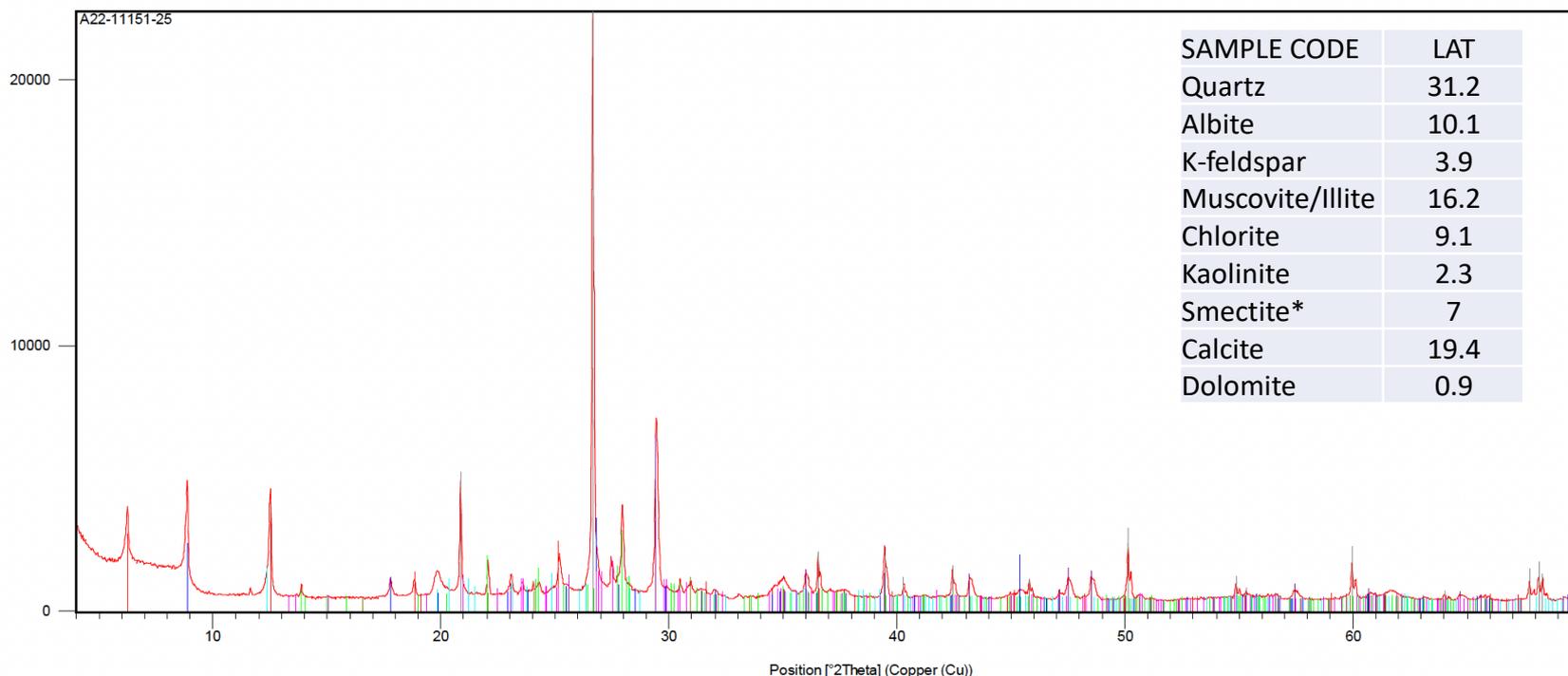


Peak List
Clinchlore-1Mlb, ferroan
Muscovite-2M1
Dolomite
Kaolinite-1A
Calcite
Quartz
Albite
Microcline



2 LATTARICO

Analisi MINERALOGICA dei depositi argillosi

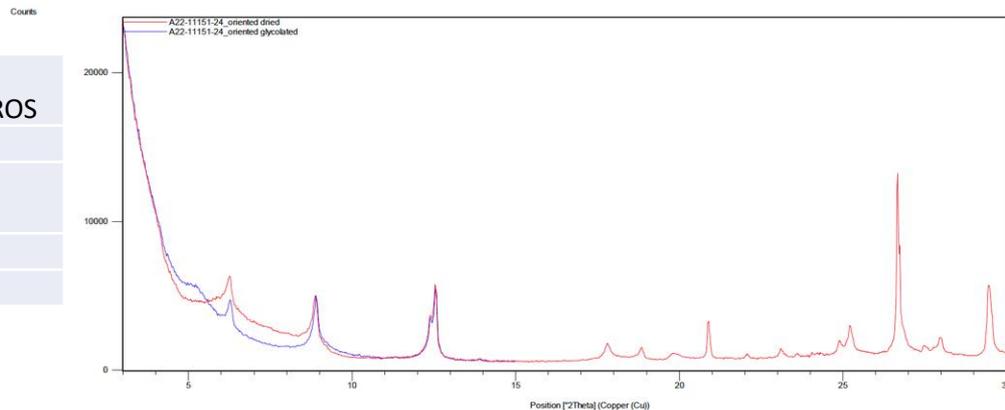


Peak List
Clinocllore-1Mlb, ferroan
Muscovite-2M1
Dolomite
Kaolinite-1A
Calcite
Quartz
Albite
Microcline



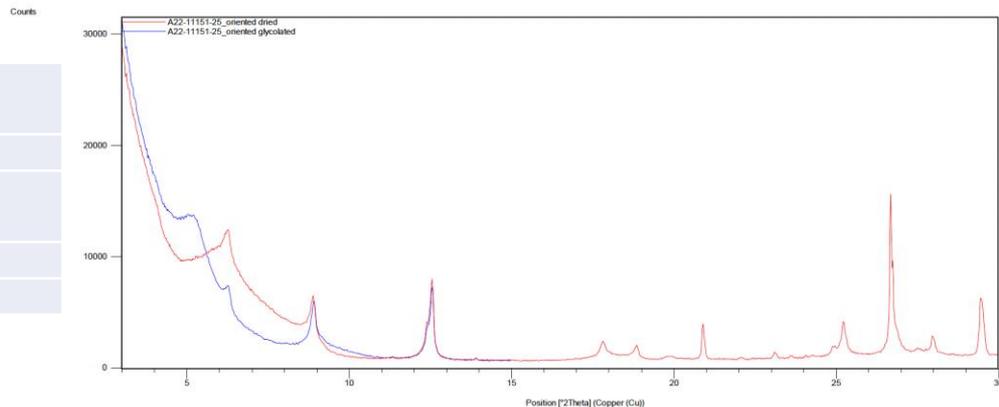
1 CORIGLIANO-ROSSANO

SAMPLE CODE	COR_ROS
Smectite	4
Muscovite/Ilite	56
Chlorite	27
Kaolinite	13



2 LATTARICO

SAMPLE CODE	LAT
Smectite	19
Muscovite/Ilite	44
Chlorite	28
Kaolinite	9



CLAY speciation



POR Calabria

2014-2020

Fesr-Fse

il futuro è un lavoro quotidiano





ANALISI CHIMICA

1 CORIGLIANO-ROSSANO

Analyte	LOI	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	Total
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
LOD		0.01	0.01	0.01	0.001	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	0.01	0.01
COR_ROS	12.85	51.34	13.93	5.21	0.082	2.66	9.16	1.46	2.69	0.615	0.15	100.1

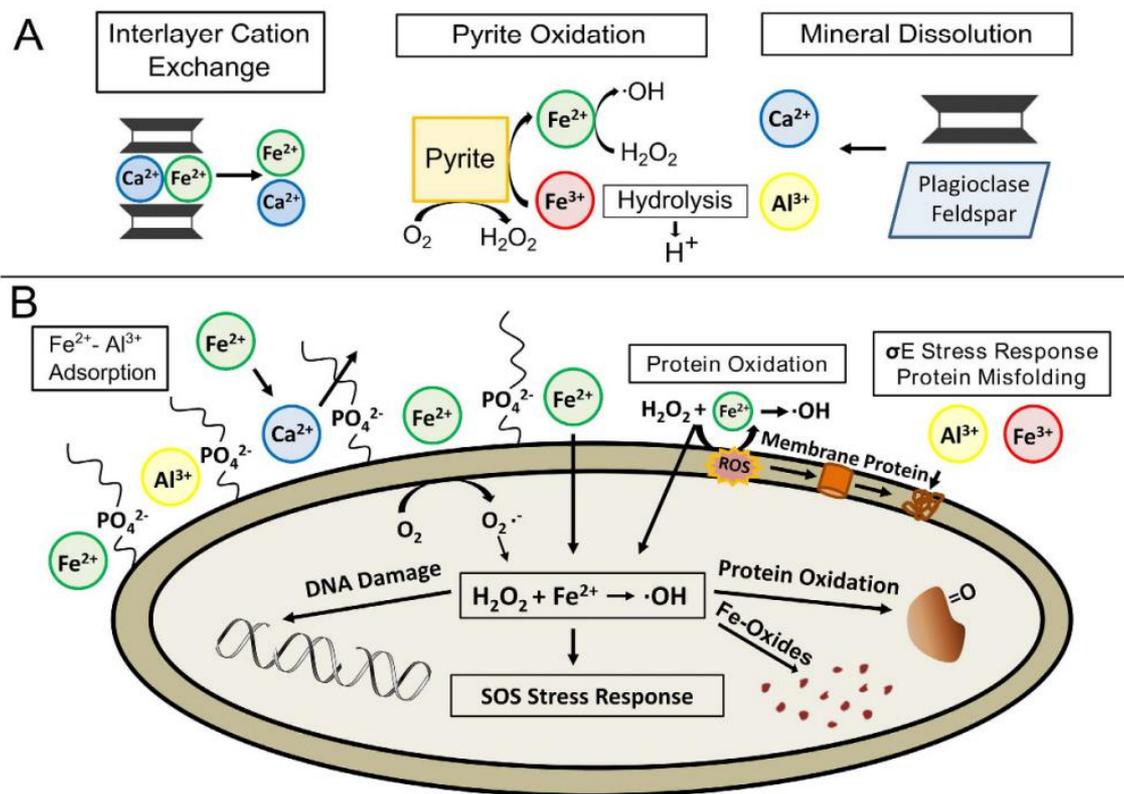
2 LATTARICO

Analyte	LOI	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	Total
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Detection Limit		0.01	0.01	0.01	0.001	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	0.01	0.01
LAT	14.54	50.54	13.59	5.09	0.064	2.38	9.56	1.01	2.43	0.641	0.13	99.99

Element (ppm)	COR_ROS	LAT
Sc	13	12
Be	2	2
V	102	108
Ba	383	306
Sr	328	315
Y	24	22
Zr	175	148
Cr	80	90
Co	11	11
Ni	30	40
Cu	20	20
Zn	90	90
Ga	18	18
Ge	1	2
As	7	< 5
Rb	116	112
Nb	12	12
Sn	3	3
Sb	1	0.5
Cs	5.3	6.3
La	36	31.9
Ce	71.5	63.5
Pr	8.2	7.39
Nd	31.8	28.7
Sm	6.2	5.6
Eu	1.1	1.09
Gd	4.9	4.4
Tb	0.8	0.7
Dy	4.3	4
Ho	0.8	0.8
Er	2.3	2.3
Tm	0.34	0.33
Yb	2.2	2.1
Lu	0.32	0.31
Hf	4.3	3.7
Ta	1	1
W	2	2
Tl	0.6	0.5
Pb	16	11
Bi	< 0.4	< 0.4
Th	11.3	10.1
U	3.1	2.9



WP2. APPLICAZIONE DEI TRATTAMENTI (CLASSICO E CON I NUOVI FORMULATI) ALLE TIPOLOGIE DI PELLE SELEZIONATE



Valutazione dell'attività antimicrobica e antibiofilm di nuovi prodotti non invasivi ed ecologicamente sostenibili da applicare nei sistemi di finitura del processo conciario grazie alla messa a punto di formulazioni a base di nanoparticelle argillose.



WP2. APPLICAZIONE DEI TRATTAMENTI (CLASSICO E CON I NUOVI FORMULATI) ALLE TIPOLOGIE DI PELLE SELEZIONATE

CAMPIONI DI ARGILLA

- Lattarico (L)
- Corigliano-Rossano (C)
- Synteral (S)*

ESTRAZIONE DELLE NANOPARTICELLE ARGILLOSE

- Preparazione delle miscele argillose in H₂O 1%, 3%, 6% (wt/vol)
- Recupero del surnatante da saggiare

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA

- Test di diffusione
- Metodo della conta vitale
- MIC (Minima Concentrazione Inibente)
- MBC (Minima Concentrazione Battericida)

ATTIVITÀ ANTIBIOFILM

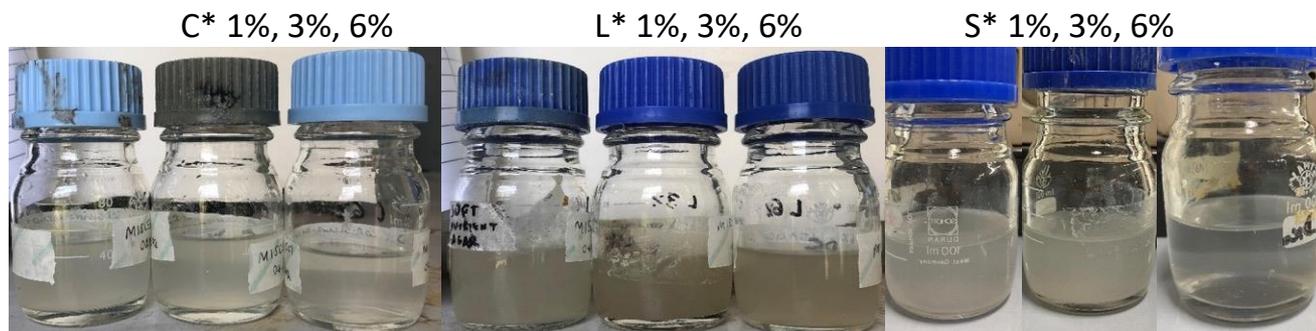
- IBF (Inibizione della Formazione di Biofilm) - Metodo del cristal violetto

*argilla in uso per la finitura di prodotti conciari



Estrazione delle nanoparticelle argillose

1. Essiccamento a 65° C per 48h
2. Preparazione di 3 miscele in acqua (1%, 3% e 6% p/v)
3. Sonicazione per 3 minuti.
4. Centrifugazione a 4000 rpm per 30 min
5. Recupero del surnatante
6. Sterilizzazione surnatante 121° C per 1h



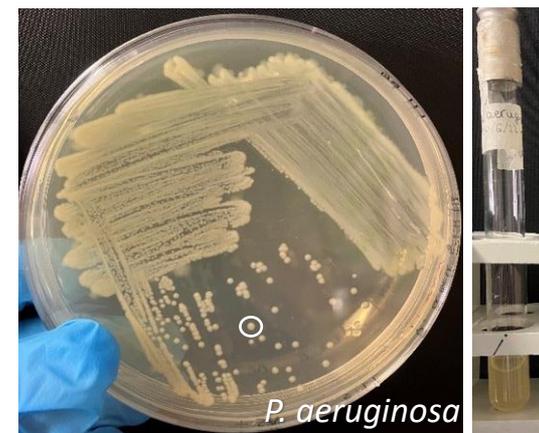


Batteri	Gram
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	negativo
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	positivo

Lieviti
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231

Muffe
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC16404

Preparazione dei microrganismi



Esempio di striscio su piastra di *P. aeruginosa* e inoculo in terreno liquid fino a OD standard.

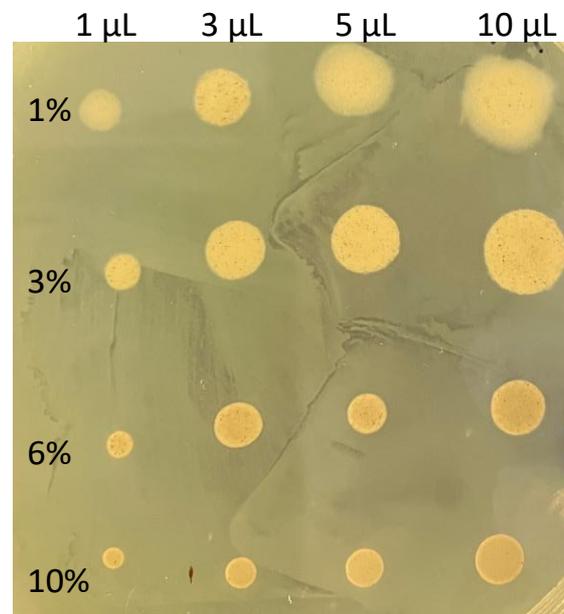
1. Metodo dello striscio su piastra
2. Incubazione o.n. 37°C su TSA (batteri) o Sabouraud (lieviti)
3. Singola colonia è stata inoculata in 3 ml di terreno di coltura (TSB o Sabouraud), incubazione 24 h a 37° C.
4. OD pari a standard McFarland 0,5 (~10⁸ cfu/mL)



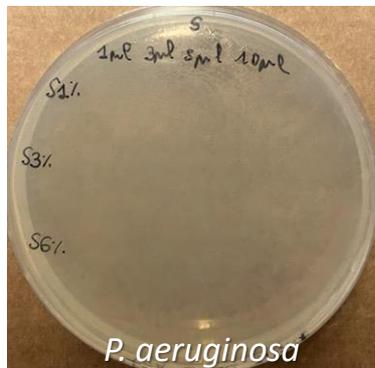
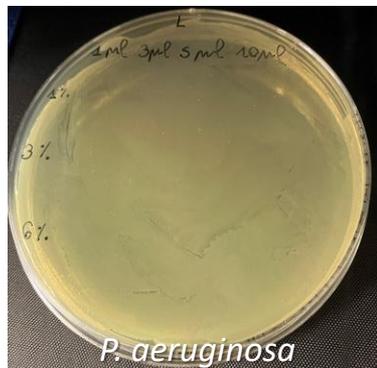
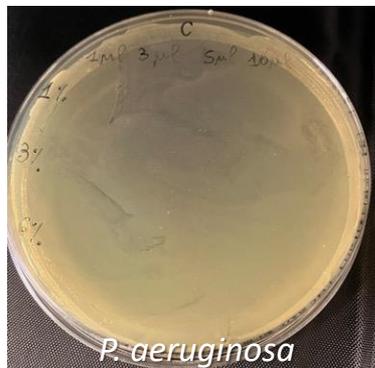
Screening antibatterico delle nanoparticelle argillose

Test di diffusione: si analizza la formazione di un alone di inibizione della crescita intorno allo spot contenente le miscele di argille.

1. Sospensione microbica trasferita su TSA e Sabouraud a formare un tappeto di cellule
2. Volumi diversi (1, 3, 5, 10 μ L) di nanoparticelle argillose delle miscele (C, L, S) a varie concentrazioni sono stati aggiunti alla piastre come spot
3. Incubazione



Esempio di test di diffusione contro *P. aeruginosa* con miscele tal quali (no surnatante)

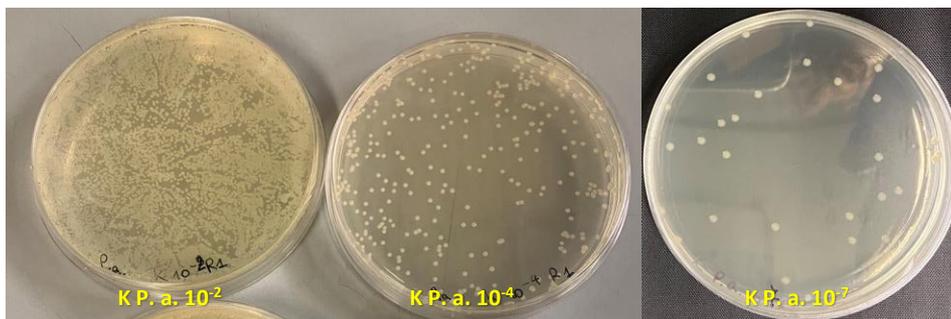




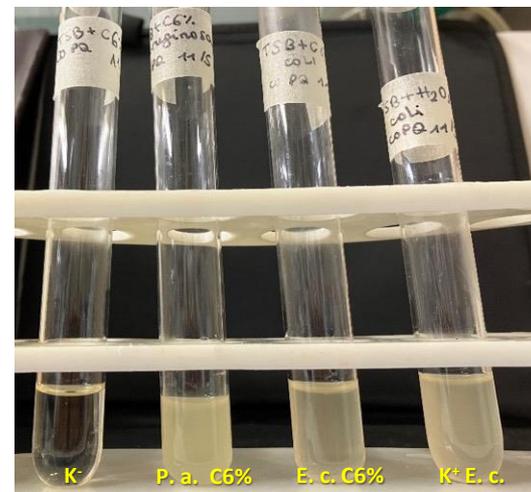
Screening antibatterico delle nanoparticelle argillose

Metodo della conta vitale: si misura il numero di unità formanti colonie dopo incubazione in presenza delle argille rispetto a controllo senza argille.

1. Preparazione della sospensione microbica a concentrazione nota (~10⁸ cfu/mL)
2. Inoculo della sospensione microbica in rapporto 1:1 con le miscele di nanoparticelle argillose (C, L, S*) a varie concentrazioni (1%, 3%, 6%), incubazione 24 h, 37°C, 180 rpm
3. Diluizioni seriali e conta vitale su piastra



Esempio di diluizioni seriali del controllo di *P. aeruginosa*.



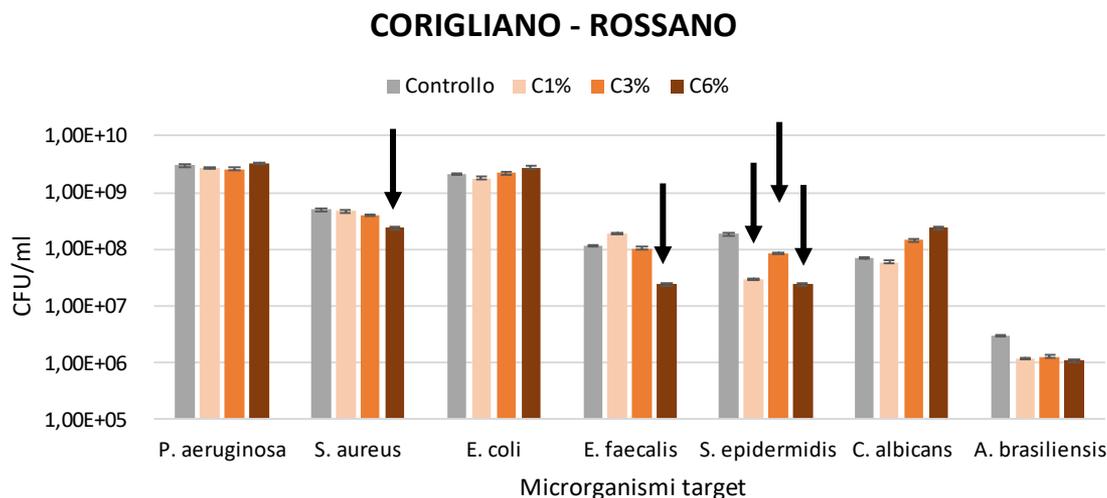
Esempio di inoculo con la miscela di argilla C6% di *P. aeruginosa* e *E. coli* contro il controllo di *E. coli* (K+ E.c.) e il terreno senza argilla né ceppo (K-).



Screening antibatterico delle nanoparticelle argillose

- METODO DELLA CONTA VITALE

Risultati: si osserva attività antimicrobica della miscela argillosa di Corigliano-Rossano al **6%** contro batteri **Gram+**.



	x 10 ⁸ CFU/ml (unità formanti colonie)			
	Controllo	C*1%	C*3%	C*6%
<i>P. aeruginosa</i>	30	27	26	33
<i>S. aureus</i>	5	4,7	4	2,4
<i>E. coli</i>	21	18	22	28
<i>E. faecalis</i>	1,1	1,9	1	0,2
<i>S. epidermidis</i>	1,8	0,3	0,8	0,2
<i>C. albicans</i>	0,7	0,6	1,4	2,4
<i>A. brasiliensis</i>	0,003	0,001	0,001	0,001

*Miscela argillosa in H₂O (wt/vol) del campione Corigliano-Rossano

Si considera efficace una sostanza che inibisce la crescita di almeno un'unità nella scala logaritmica

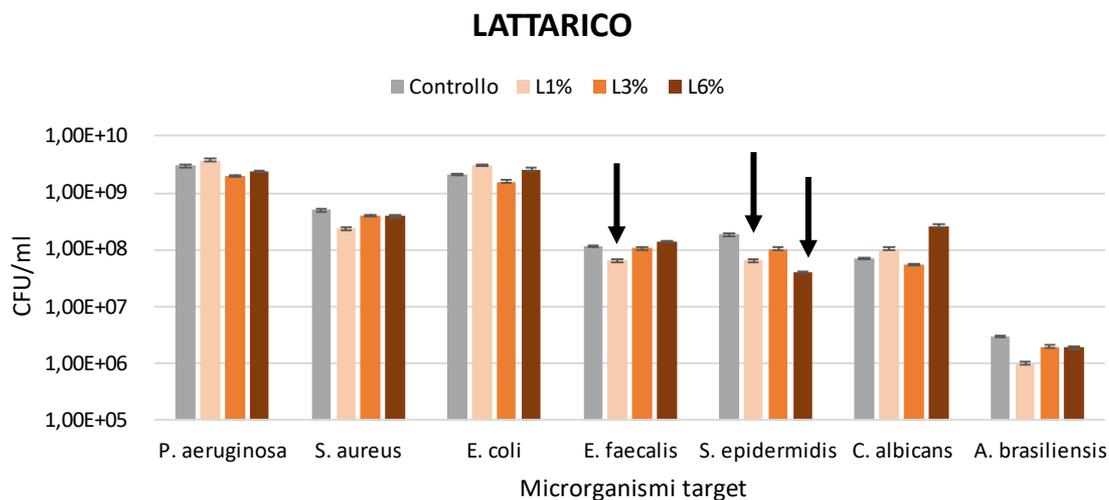
Suscettibilità antibatterica dell'argilla proveniente da Corigliano-Rossano (C) determinata mediante il metodo delle conte vitali dopo 24h di incubazione contro batteri patogeni *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC 12228 e contro il fungo *C. albicans* ATCC10231. L'argilla è stata saggiata come miscela in H₂O a varie percentuali peso/volume.



Screening antibatterico delle nanoparticelle argillose

- METODO DELLA CONTA VITALE

Risultati: si osserva attività antimicrobica della miscela argillose di Lattarico al **1%** e **6%** contro batteri **Gram+**.



	x 10 ⁸ CFU/ml (unità formanti colonie)			
	Controllo	L*1%	L*3%	L*6%
<i>P. aeruginosa</i>	30	38	20	24
<i>S. aureus</i>	5	2,4	4	3,9
<i>E. coli</i>	21	31	16	26
<i>E. faecalis</i>	1,1	0,6	1	1,4
<i>S. epidermidis</i>	1,8	0,6	1	0,4
<i>C. albicans</i>	0,7	1	0,5	2,6
<i>A. brasiliensis</i>	0,003	0,001	0,002	0,002

*Miscela argillosa in H₂O (wt/vol) del campione Lattarico

Si considera efficace una sostanza che inibisce la crescita di almeno un'unità nella scala logaritmica

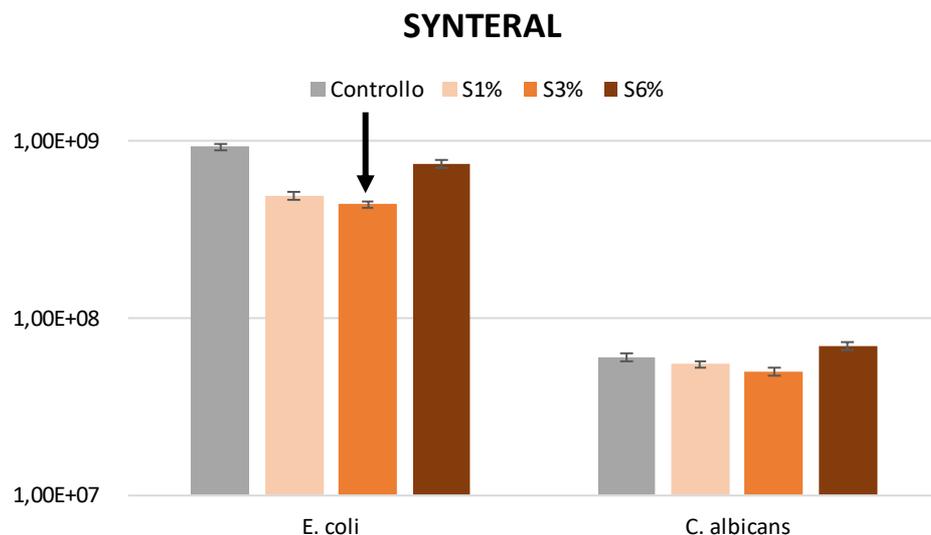
Suscettibilità antibatterica dell'argilla proveniente da Lattarico (L) determinata mediante il metodo delle conte vitali dopo 24h di incubazione contro batteri patogeni *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC 12228 e contro il fungo *C. albicans* ATCC 10231. L'argilla è stata saggiata come miscela in H₂O a varie percentuali peso/volume.



Screening antibatterico delle nanoparticelle argillose

- METODO DELLA CONTA VITALE

Risultati: si osserva attività antimicrobica della miscela argillosa di Synteral al **3%** contro batteri **Gram-**.



	x 10 ⁸ CFU/ml (unità formanti colonie)			
	Controllo	S*1%	S*3%	S*6%
<i>E. coli</i>	9,3	4,9	4,4	7,5
<i>C. albicans</i>	0,6	0,5	0,5	0,7

*Miscela argillosa in H₂O (wt/vol) del campione Synteral

Si considera efficace una sostanza che inibisce la crescita di almeno un'unità nella scala logaritmica

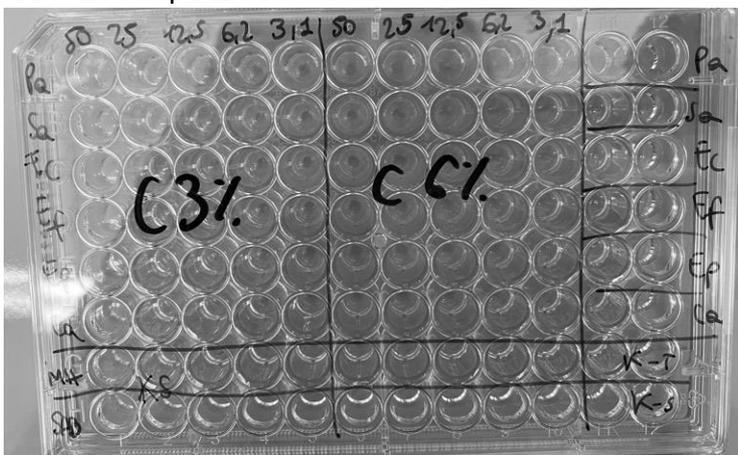
Suscettibilità antibatterica dell'argilla Synteral (S) determinata mediante il metodo delle conte vitali dopo 24h di incubazione contro batteri patogeni *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC 12228 e contro il fungo *C. albicans* ATCC 10231. L'argilla è stata saggiata come miscela in H₂O a varie percentuali peso/volume.



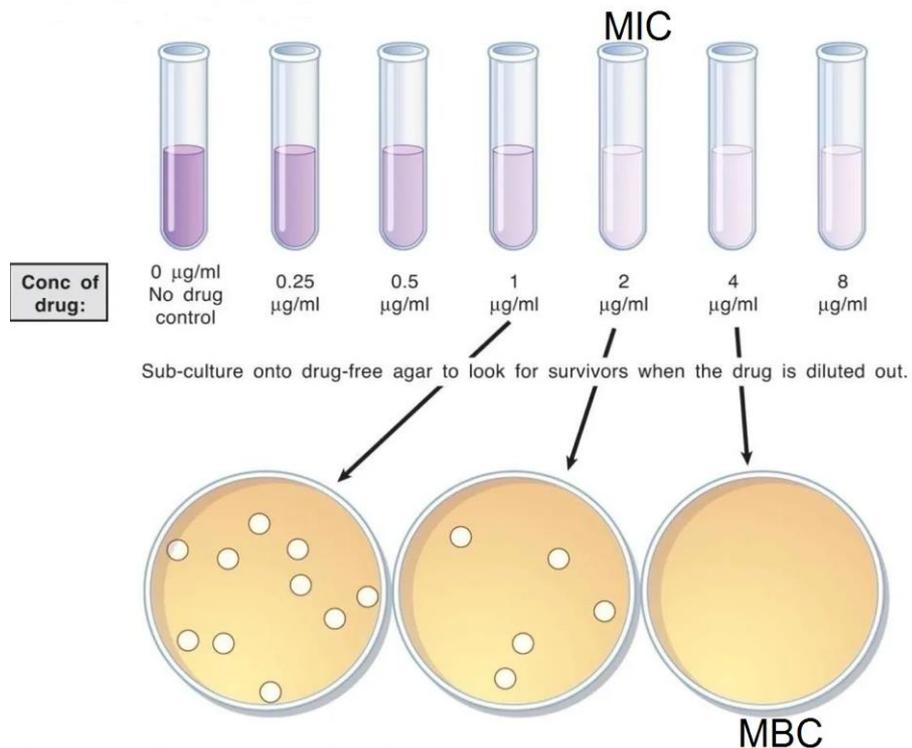
SCREENING ANTIBATTERICO DELLE NANOPARTICELLE ARGILLOSE

Metodo della Minima Concentrazione Inibente (MIC): si analizza la densità ottica della coltura batterica dopo incubazione in presenza delle argille rispetto a controllo senza argille.

1. Preparazione della sospensione microbica a concentrazione nota ($\sim 10^8$ cfu/mL)
2. Sospensione microbica aggiunta in quantità standard, terreno di coltura e miscele (C, L, S) di nanoparticelle argillose a varie concentrazioni sono state aggiunte in rapporto 50%; 25%; 12,50%; 6,20% e 3,10%
3. Lettura delle plate ed elaborazione dei risultati



Esempio di plate con tutti i ceppi e le miscele C3% e C6%.





SCREENING ANTIBATTERICO DELLE NANOPARTICELLE ARGILLOSE

- METODO DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)

Risultati: si osserva inibizione della crescita con le miscele al 3% e 6% di Corigliano-Rossano contro *C. albicans*, ma NON si osserva inibizione per le altre argille (C, L, S)* a nessuna delle percentuali saggate.

	MIC								
	Corigliano-Rossano			Lattarico			Synteral		
	1%	3%	6%	1%	3%	6%	1%	3%	6%
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. Coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-

*C = Corigliano-Rossano

L= Lattarico

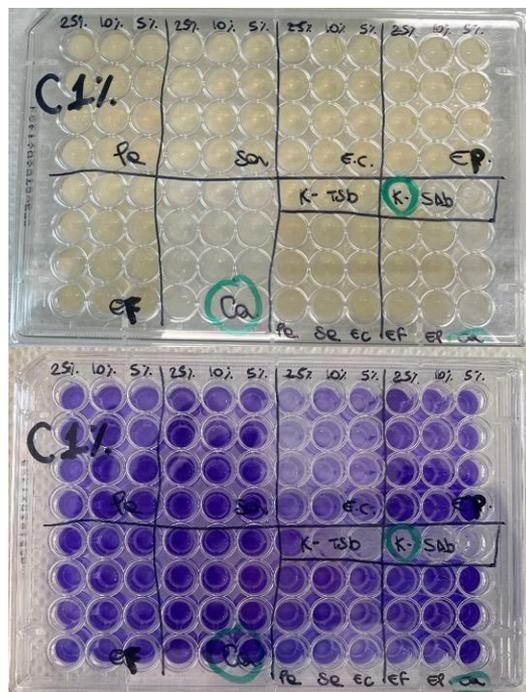
S = Synteral (argilla attualmente in uso)



SCREENING ANTIBATTERICO DELLE NANOPARTICELLE ARGILLOSE

Metodo dell'inibizione della formazione di biofilm (IBF): si analizza la densità ottica del residuo su piastra a seguito di lavaggi con cristal violetto dopo incubazione in presenza delle argille rispetto a controllo senza argille

1. Preparazione della sospensione microbica a concentrazione nota ($\sim 10^8$ cfu/mL)
2. Sospensione microbica aggiunta in quantità standard, terreno di coltura e miscele (C, L, S) di nanoparticelle argillose a varie concentrazioni sono state aggiunte in rapporto 25%; 10% e 5%
3. Lavaggio con cristalvioletto ed etanolo
4. Lettura delle plate ed elaborazione dei risultati



Risultati

	Inibizione della formazione del biofilm (%)								
	Corigliano-Rossano			Lattarico			Synteral		
	1%	3%	6%	1%	3%	6%	1%	3%	6%
<i>P. aeruginosa</i>	-	20	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	74	29	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	17	-	-	44	46	31	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	64	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	21	39	82	74	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	5	-	8	-	-	-	-	-

(-) assenza di attività antibiofilm

Si osserva attività antibiofilm delle miscele argillose di Lattarico contro batteri **Gram-positivi e negativi**.

Le miscele argillose di Corigliano-Rossano mostrano una bassa attività antibiofilm.



Riassumendo

Risultati: si osserva attività antimicrobica contro *S. epidermidis* ed *E. faecalis* per Corigliano e Lattarico. Si osserva attività antibiofilm per C6% contro *S. epidermidis* e L3% contro Gram+ e – anche a basse concentrazioni.

	Corigliano-Rossano				Lattarico				Synteral			
	1%	3%	6%		1%	3%	6%		1%	3%	6%	
	Test di diffusione	Conta vitale	MIC	IBF	Test di diffusione	Conta vitale	MIC	IBF	Test di diffusione	Conta vitale	MIC	IBF
<i>P. aeruginosa</i>	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
<i>S. aureus</i>	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	L3 ✓	✗	✗	✗	✗
<i>E. coli</i>	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	L1,3,6 ✓	✗	✗	✗	✗
<i>E. faecalis</i>	✗	C6 ✓	✗	✗	✗	L1 ✓	✗	L3 ✓	✗	✗	✗	✗
<i>S. epidermidis</i>	✗	C1,3,6 ✓	✗	C6 ✓	✗	L1,6 ✓	✗	L3,6 ✓	✗	✗	✗	✗
<i>C. albicans</i>	✗	✗	C3,6 ✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
<i>A. brasiliensis</i>	✗	✗			✗	✗			✗	✗		

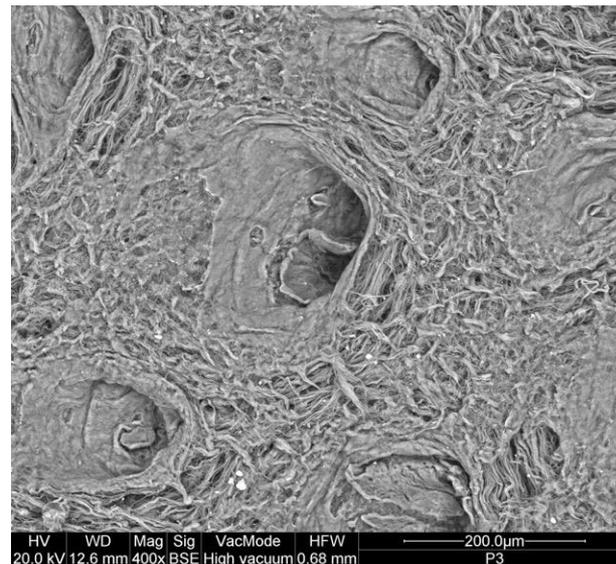
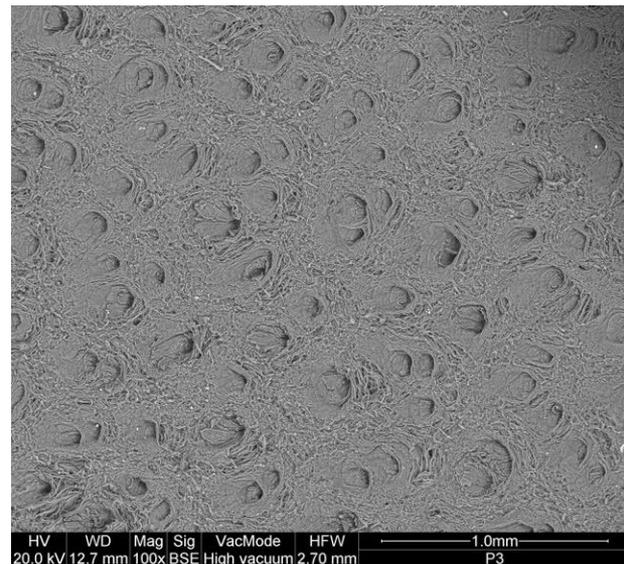
Attualmente in lavorazione: test sulla muffa – eventuali MIC e IBF



WP2. APPLICAZIONE DEI TRATTAMENTI (CLASSICO E CON I NUOVI FORMULATI) ALLE TIPOLOGIE DI PELLE SELEZIONATE

INDAGINI MORFOLOGICHE E COMPOSIZIZONALI AL SEM-EDS

Le caratteristiche morfologiche della pelle tal quale (campione di riferimento) sono state studiate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) per valutare le dimensioni medie dei pori, nonché in sezione trasversale, i vuoti interstiziali tra le fibre di collagene.



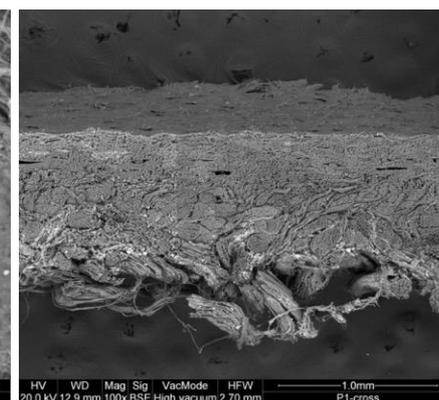
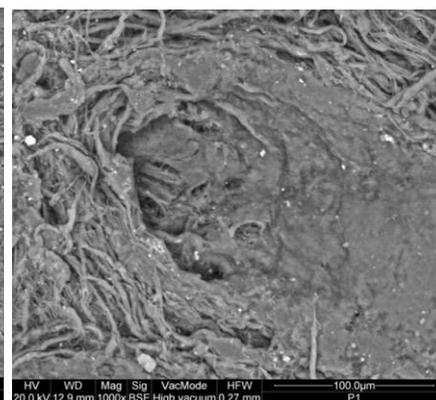
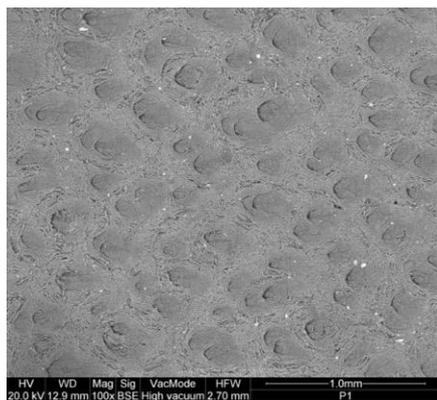
PRIMA DEL TRATTAMENTO



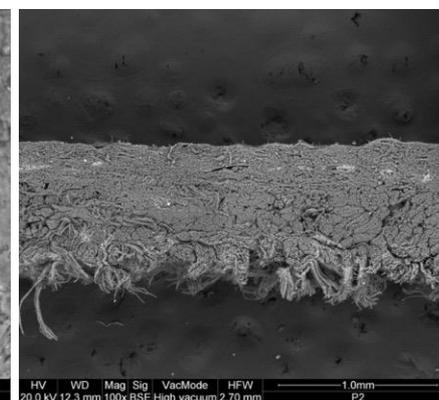
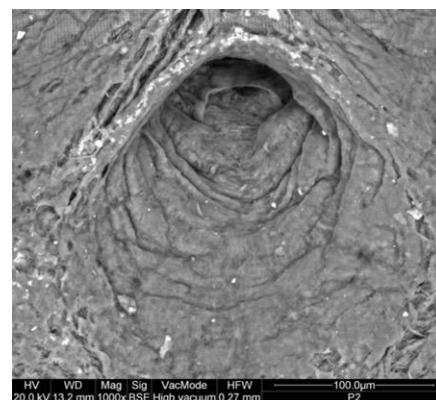
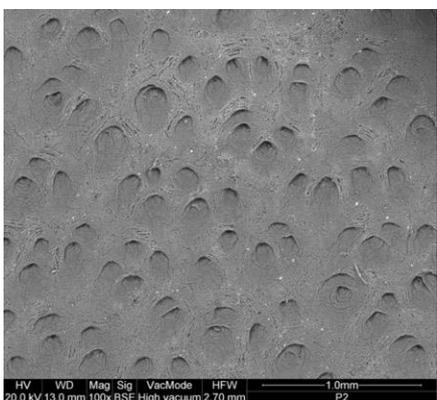
WP2. APPLICAZIONE DEI TRATTAMENTI (CLASSICO E CON I NUOVI FORMULATI) ALLE TIPOLOGIE DI PELLE SELEZIONATE

INDAGINI MORFOLOGICHE E COMPOSIZIONALI AL SEM-EDS

TRATTAMENTO 1



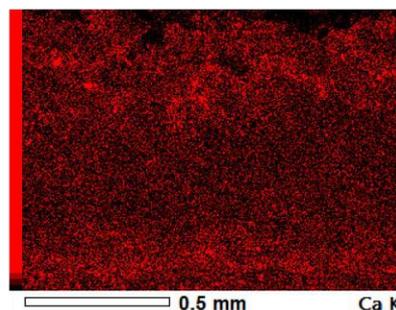
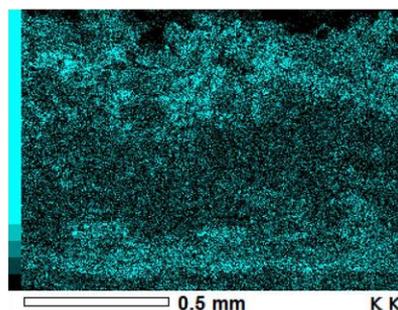
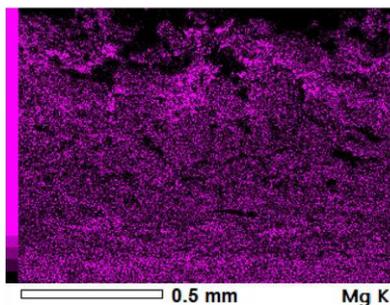
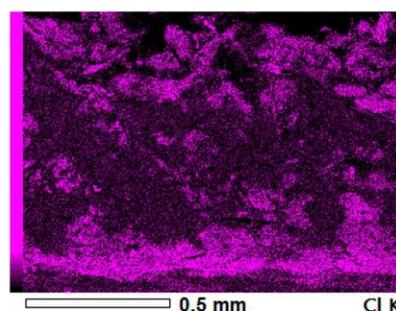
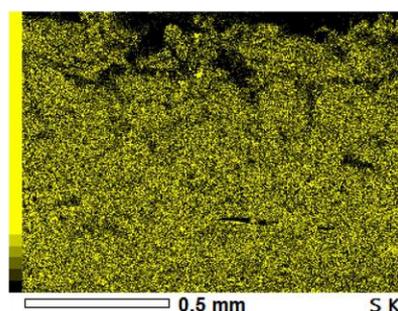
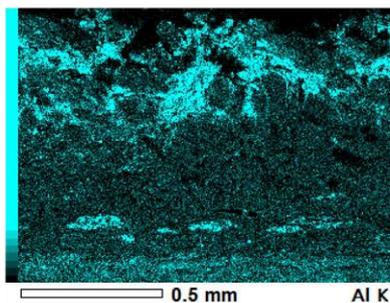
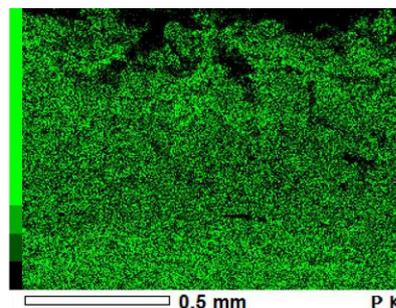
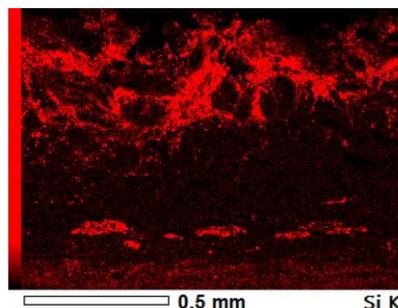
TRATTAMENTO 2





Indagini morfologiche e composizionali al SEM-EDS

DOPO IL TRATTAMENTO



A trattamento effettuato sono state eseguite le stesse analisi per evidenziare la capacità di penetrazione delle particelle argillose all'interno della pelle. Infine, tramite la mappatura chimica degli elementi (in particolare Si, Al e Mg) è possibile valutare l'effettiva distribuzione e diffusione nel mezzo.



Work in progress

- Bagnabilità, attraverso misure dell'angolo di contatto in accordo con la normativa EN 828;
- Effetti sulla morbidezza in accordo con la normativa EN ISO 17235 “Leather — Physical and mechanical tests — Determination of softness”;
- Effetti sulle proprietà meccaniche del cuoio. Misure della resistenza allo strappo in accordo con la normativa EN ISO 3377-1;
- Effetti del trattamento sulla bondability della pelle, in accordo con la normativa EN 1392 “Measurement of T-peel strength”.



Grazie per l'attenzione

