

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”

SCUOLA DI DOTTORATO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE



*Dottorato di Ricerca in  
Tecnologie e Sistemi di Produzione  
XXIV Ciclo (2008 – 2011)*

**Nuova tecnica di sterilizzazione al plasma freddo a ridotto  
impatto ambientale**

Coordinatore  
Ch.mo Prof. Giuseppe Giorleo

Tutor  
Ch.mo Prof. Francesco Bellucci

Co-Tutor  
Ch.mo Ing. Tullio Monetta

Candidato  
Ing. Attilio Scala

*ANNO ACCADEMICO 2010 - 2011*

*Alle mie tre donne*

## Sommario

1. Introduzione.....	1
2. Sterilizzazione .....	3
2.1. Sterilizzazione mediante sistemi chimici .....	3
2.1.1. Ossido di etilene .....	4
2.1.2. Formaldeide .....	8
2.2. Sterilizzazione mediante sistemi fisici .....	11
2.2.1. Radiazioni ultraviolette .....	11
2.2.2. Raggi $\gamma$ .....	12
2.2.3. Microonde .....	12
2.2.4. Calore Secco.....	13
2.2.5. Calore umido (sterilizzazione in autoclave).....	14
2.2.6. Gas Plasma .....	16
2.3. Norme in materia di sterilizzazione .....	18
3. Il Plasma .....	19
3.1. Il plasma freddo.....	19
3.2. Interazioni plasma-superficie .....	21
3.3. Parametri caratteristici del plasma .....	22
3.4. Applicazioni dei trattamenti al plasma .....	25
4. La sterilizzazione al plasma – analisi costi/benefici.....	30
4.1. Sviluppo della sterilizzazione al plasma.....	33
5. Materiali e Metodi .....	36
5.1. Materiali .....	36
5.2. I reattori al plasma .....	36
5.3. Controlli di sterilità.....	43
5.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	51
5.4. Spettroscopia di Impedenza Elettrochimica .....	54
5.4.1. Teoria delle misure .....	54
5.4.2. Apparecchiature e celle di misura.....	61

5.4.3. Misure EIS a tre elettrodi .....	62
5.5. Analisi dell'energia superficiale .....	64
5.5.1. Procedura sperimentale.....	65
6. Risultati Sperimentali .....	66
6.1. Energia superficiale .....	66
6.2. Valutazione della resistenza a corrosione .....	79
6.3. Attività antibatterica indotta.....	92
7. Conclusioni.....	99
Ringraziamenti .....	100
Riferimenti Bibliografici.....	101

# 1. Introduzione

L'attività di ricerca dal titolo "Nuova tecnica di sterilizzazione al plasma freddo a ridotto impatto ambientale" si è svolta nell'ambito della convenzione tra il Dipartimento di Ingegneria dei Materiale e della Produzione dell'Università di Napoli "Federico II" e l'Adiramef s.r.l.

Garantire l'igiene e prevenire le infezioni è un compito importante e fondamentale nel settore della sanità. La scoperta nel XIX secolo secondo cui le malattie infettive sono causate da microrganismi (germi) ha dato avvio alla messa a punto di strategie e soluzioni per ridurre il numero di germi con lo scopo di impedire la trasmissione di microrganismi ai pazienti e al personale sanitario.

In linea di massima si distinguono due metodi per ridurre il numero di germi: la disinfezione e la sterilizzazione. La disinfezione ha lo scopo di ridurre la carica microbica di un certo fattore (di regola da  $10^4$  a  $10^5$ ). Ben superiori sono per contro i requisiti richiesti ai metodi di sterilizzazione. Dai metodi riconosciuti ci si attende una riduzione dei germi di un fattore  $10^6$  già dopo mezzo ciclo di sterilizzazione.

La diffusione di materiali e apparecchi termosensibili nel settore della sanità ha richiesto nuovi processi di sterilizzazione. Oltre ai metodi «classici», come la sterilizzazione a vapore, si dovevano trovare processi che garantissero una distruzione affidabile dei germi anche a basse temperature.

L'obiettivo era quello di mettere a punto una nuova tecnica di sterilizzazione che unisse il vantaggio del basso impatto ambientale e dal basso costo. Le richieste del mercato prevedevano che tale tecnica consentisse la sterilizzazione sia di materiali metallici sia di quelli polimerici termolabili. In particolare l'apparecchiatura doveva essere di semplice utilizzo, non necessitare di particolare addestramento del personale, rispettare gli obblighi di legge riguardanti le norme di sicurezza e di

sterilizzazione in campo medico e non deteriorare gli attrezzi anche se processati più volte.

La soluzione era progettata per rivolgersi agli ambienti ospedalieri. Era quindi importante che la tecnica fosse comparabile, se non migliore, alle soluzioni attualmente presenti nel mercato di riferimento e che soddisfacesse i requisiti legali. La scelta è caduta sull'utilizzo di un reattore al plasma freddo, perché permette di avere un sistema semplice, con basse richieste di elettricità e che, studiando in maniera opportuna le combinazioni di gas da usare, ha un ridotto impatto ambientale.



**Figura 1 - Esempi di ferri chirurgici; ognuno di essi deve essere sterilizzato prima dell'operazione.**

## **2. Sterilizzazione**

La sterilizzazione consiste in qualsiasi processo chimico o fisico che porti all'eliminazione di ogni forma microbica vivente, sia patogena che non, comprese le spore e i funghi. Un materiale è considerato sterile se il LAS (livello di sicurezza di sterilità) è inferiore a  $10^{-6}$ ; ovvero quando la probabilità di trovarvi un microrganismo è inferiore ad uno su un milione. I vari processi distruggono i microrganismi provocando l'alterazione letale di alcune loro componenti essenziali; in particolare la sterilizzazione determina la denaturazione delle proteine e degli acidi nucleici e la degradazione di componenti della membrana e parete cellulare.

### **2.1. Sterilizzazione mediante sistemi chimici**

La sterilizzazione con gas è una sterilizzazione chimica praticata da circa 50 anni. Essa si può far derivare dalle tecniche di fumigazione con agenti gassosi sviluppate per applicazioni agricole ed industriali negli anni 1920-30. La diffusione della tecnica di sterilizzazione con gas (formaldeide, ossido di etilene, Propiolattone) è legata al fatto che essa permette di sterilizzare materiali termosensibili.

La diffusione di materiali e strumenti termosensibili e le accresciute esigenze qualitative poste ai prodotti medici hanno portato allo sviluppo di metodi di sterilizzazione a bassa temperatura ( $< 100^{\circ}\text{C}$ ), che usano sostanze chimiche dal forte impatto sia ambientale che per le difficoltà di gestione.

Nel settore della sanità si è affermato il metodo di sterilizzazione con ossido di etilene o miscele di ossido di etilene e gas inerte. Tale metodo è utilizzato anche nell'industria per la produzione di materiale medico.

Come metodo alternativo, in ambito sanitario trovava impiego anche il processo LTSF (a bassa temperatura a vapore d'acqua e a formaldeide). La formaldeide è stata utilizzata in passato come sterilizzante chimico ma il suo uso è stato fortemente limitato per legge avendo mostrato indizi di essere cancerogeno.

### 2.1.1. Ossido di etilene

Le proprietà battericide dell'ossido di etilene (EtO) sono note da oltre 70 anni. La sua prima applicazione documentata come gas sterilizzante risale alla fine degli anni '40. Inizialmente è stato utilizzato come disinfestante in campo alimentare. Successivamente il suo uso si è ampiamente diffuso ed esso è oggi utilizzato nella sterilizzazione di materiali di interesse farmaceutico sensibili al calore e all'umidità, compresi molti dispositivi medico-chirurgici.

L'ossido di etilene (ossirano, epossietano) è un gas incolore che a bassa temperatura condensa a liquido incolore (punto di ebollizione a pressione atmosferica = 10.4°C). Si ottiene per ossidazione di etilene in aria o ossigeno in presenza di un catalizzatore di ossido di argento. È miscibile in tutte le proporzioni con acqua, alcool, etere e con la maggior parte dei solventi organici.

Un'importante proprietà fisica dell'ossido di etilene, legata alle ridotte dimensioni della sua molecola, è il suo elevatissimo coefficiente di diffusione in materiali come carta, cartone e plastica. Questo permette di condurre la sterilizzazione con EtO sulle confezioni finite.

I vapori di EtO possono essere infiammabili ed esplosivi se miscelati con aria in percentuale superiore al 2%. Per eliminare l'infiammabilità. L'EtO come mezzo di sterilizzazione viene spesso venduto in miscela con gas inerti. L'EtO è generalmente non corrosivo per i metalli e non lascia né odori né sapori residui.

L'ossido di etilene possiede un'attività biocida ad ampio spettro: agisce su batteri, funghi e virus. Le sue proprietà microbicide dipendono dalla sua capacità di alchilare vari gruppi funzionali (sulfidrilici, amminici, carbossilici, fenolici, ossidrilici), soprattutto a livello degli acidi nucleici.

L'inattivazione dei microorganismi da parte dell'EtO è influenzata da vari fattori che sono:

- Concentrazione del gas
- Temperatura
- Umidità relativa
- Tempo di esposizione

L'azione antimicrobica è dose-dipendente. Se si tengono fissi i valori di temperatura ed umidità relativa, aumentando la concentrazione del gas il tasso di inattivazione dei microorganismi aumenta e quindi diminuisce il tempo di inattivazione, fino ad arrivare ad un plateau di concentrazione. Ulteriori incrementi nella concentrazione del gas riducono il tasso di inattivazione.

Per poter esercitare il suo effetto sterilizzante l' EtO ha bisogno di umidità. Il valore ottimale di umidità relativa (RH) richiesto nel sito di sterilizzazione è 35%, però nella pratica comune i valori di RH nelle autoclavi sono un po' più alti, 40-60%. Le ragioni dell' esigenza di umidità per una buona sterilizzazione con EtO sono diverse. La prima è che l'acqua è un reattivo che partecipa alle reazioni di alchilazione dell' EtO, poiché ne apre l'anello epossidico. La seconda è che l'umidità favorisce la permeazione dell'EtO attraverso membrane o film polari, ad esempio di nylon o cellophane. D'altra parte, l'EtO favorisce la permeazione dell'acqua attraverso film di polimeri apolari, es. Il polietilene.

La temperatura esercita un notevole influsso sulla efficacia sterilizzante dell'EtO; per ogni incremento di 10°C nella temperatura il tempo di riduzione decimale diminuisce di circa 3 volte.

L'ossido di etilene è mutogeno e cancerogeno per gli animali e si sospetta che lo sia anche per l'uomo. Le autorità hanno stabilito che la quantità ammessa in un posto di lavoro è 1 ppm. Sono perciò richiesti dei sistemi che riducano le emissioni di EtO da parte degli sterilizzatori nell'ambiente come:

- Idrolisi acida (“acid scrubber”) a glicole etilenico
- Incinerazione

Inoltre sono necessari sistemi di monitoraggio sia personale (indossati dagli operatori) che ambientale (collocati in varie aree degli ambienti di lavoro)

Oggi nel settore della sanità si utilizzano principalmente due diversi processi e apparecchi:

- **Sterilizzatrici a pressione positiva con miscele di ossido di etilene e gas inerte**

Gli apparecchi funzionano con una miscela gassosa composta per il 6% di ossido di etilene e per il 94% di CO<sub>2</sub> e una sovrappressione di 1,7 bar. La miscela gassosa non è esplosiva. Il CO<sub>2</sub> ha inoltre effetti positivi sul desorbimento dell’ossido di etilene. Gli apparecchi sono alimentati con bombole di gas compresso.

Le sterilizzatrici a pressione positiva sono dei sistemi completamente automatici. La sovrappressione interna in fase di esercizio presuppone un controllo preventivo dell’ermeticità, per evitare una fuoriuscita incontrollata di gas. Gli apparecchi possono essere aperti solo dopo una disaerazione e un desorbimento minimo.

- **Sterilizzatrici a pressione negativa**

Le sterilizzatrici a pressione negativa utilizzano di regola ossido di etilene puro (100 %). Gli apparecchi sono alimentati con cartucce, che vengono inserite nella sterilizzatrice e perforate durante il processo di sterilizzazione, o con bombole di gas compresso.

La maggior parte delle sterilizzatrici a ossido di etilene utilizzate in ambito sanitario in Svizzera sono a pressione negativa.



**Figura 2 - Sterilizzatrice a pressione negativa, alimentata con cartucce di ossido di etilene.**

Gli apparecchi automatici di entrambi i sistemi hanno un ciclo di desorbimento integrato che si attiva subito dopo la sterilizzazione e la ventilazione dell'apparecchio e consente un desorbimento attivo e controllato del materiale sterilizzato. Inoltre, gli apparecchi automatici vengono spesso utilizzati in combinazione con armadi o locali ventilati separati.

L'ossido di etilene presente nella camera di sterilizzazione al termine del processo non viene scaricato direttamente nell'atmosfera, bensì trasformato, tramite un catalizzatore o un altro sistema, in sostanze innocue che in seguito possono essere rilasciate nell'ambiente circostante. La trasformazione catalitica dell'ossido di etilene in biossido di carbonio e acqua ha un'efficienza caratteristica del 99.9 %, con cui si garantisce un livello di emissioni provenienti dalla camera entro i valori limite ambientali riconosciuti internazionalmente. L'ossido di etilene può anche essere smaltito con lo stesso risultato utilizzando una fiamma permanente di gas propano. Per i precisi requisiti si rimanda alla legislazione vigente.

Durante la sterilizzazione, l'ossido di etilene penetra nel materiale o si combina sulla superficie (adsorbimento). La quantità di ossido di etilene fissata per adsorbimento

dipende dal materiale. Di regola, le materie sintetiche adsorbono una quantità di ossido di etilene nettamente superiore rispetto ad esempio ai metalli. Indicazioni precise sul comportamento di adsorbimento e desorbimento dei diversi materiali sono disponibili presso i rispettivi produttori e fornitori.

Durante il desorbimento, l'ossido di etilene viene nuovamente ceduto all'ambiente in una reazione di equilibrio. Nelle vicinanze del materiale sterilizzato si possono pertanto avere notevoli concentrazioni di ossido di etilene, che costituiscono un pericolo per la salute sia degli addetti alla sterilizzazione, sia dei pazienti. I requisiti di protezione dei pazienti sono disciplinati dalla norma ISO 10993-7.

La velocità di desorbimento dipende dal materiale, dalla temperatura ambiente e dalla concentrazione ambientale di ossido di etilene. Pertanto, un desorbimento all'interno della sterilizzatrice o nell'armadio di degassaggio con temperatura elevata e ventilazione costante è di regola più efficiente di un desorbimento in un locale ventilato o nel locale di deposito del materiale sterilizzato.

La maggior parte dei fabbricanti di sterilizzatrici a ossido di etilene forniscono indicazioni sui tempi minimi di desorbimento per i diversi materiali. Per motivi di igiene del lavoro devono essere osservate le seguenti regole:

- il tempo minimo di desorbimento è definito dal materiale con il tempo di desorbimento più lungo;
- il desorbimento deve essere eseguito per quanto possibile nella sterilizzatrice subito dopo il ciclo di sterilizzazione;
- il tempo totale di desorbimento non dovrebbe essere inferiore alle 8 ore.

### 2.1.2. Formaldeide

La combinazione vapore d'acqua e formaldeide in presenza di un vuoto frazionato, il cosiddetto processo a bassa temperatura a vapore d'acqua e a formaldeide (LTSF),

consente anch'esso una sterilizzazione affidabile della maggior parte dei materiali e degli oggetti termolabili.

Gli apparecchi moderni sono dotati di un controllo di processo completamente automatico che previene ampiamente una liberazione di formaldeide. Il processo prevede un ciclo di sterilizzazione seguito da una ventilazione e un lavaggio a vapore per ridurre i residui. Se il processo di sterilizzazione non funziona correttamente, l'apparecchio può essere aperto solo al termine di una fase di desorbimento e ventilazione.

La temperatura di processo è compresa tra i 50 e i 60°C con una concentrazione di formaldeide di circa il 3% (soluzione stock). La soluzione di formaldeide viene prelevata automaticamente da contenitori di stoccaggio chiusi.

Anche nella sterilizzazione con formaldeide rimangono residui sul materiale sterilizzato, soprattutto sotto forma di paraformaldeide. I residui vengono eliminati dalla superficie del materiale mediante un lavaggio a vapore. La miscela di acqua e formaldeide condensata viene evacuata con una pompa a vuoto.

La formaldeide è a questo punto presente in forma fortemente diluita. Con questa procedura si formano solo quantità minime di formaldeide libera gassosa. Tuttavia, la potenziale sensibilizzazione a questa sostanza deve essere considerata anche con concentrazioni di formaldeide inferiori ai valori limite di igiene del lavoro. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC) sin dal 2004 ha inserito la formaldeide nell'elenco delle sostanze considerate con certezza cancerogene per la specie umana[2]. Va considerato che le concentrazioni di formaldeide presenti normalmente all'interno degli edifici sono generalmente basse, mentre vanno accuratamente valutati i rischi per gli addetti alle lavorazioni industriali che impiegano formaldeide.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha indicato, come limite massimo di concentrazione accettabile di formaldeide in casa, 100 microgrammi / metrocubo (pari a 0,1 parti per milione - ppm).



**Figura 3 - apparecchio per la sterilizzazione a bassa temperatura a vapore d'acqua e a formaldeide (LTSF).**

## **2.2. Sterilizzazione mediante sistemi fisici**

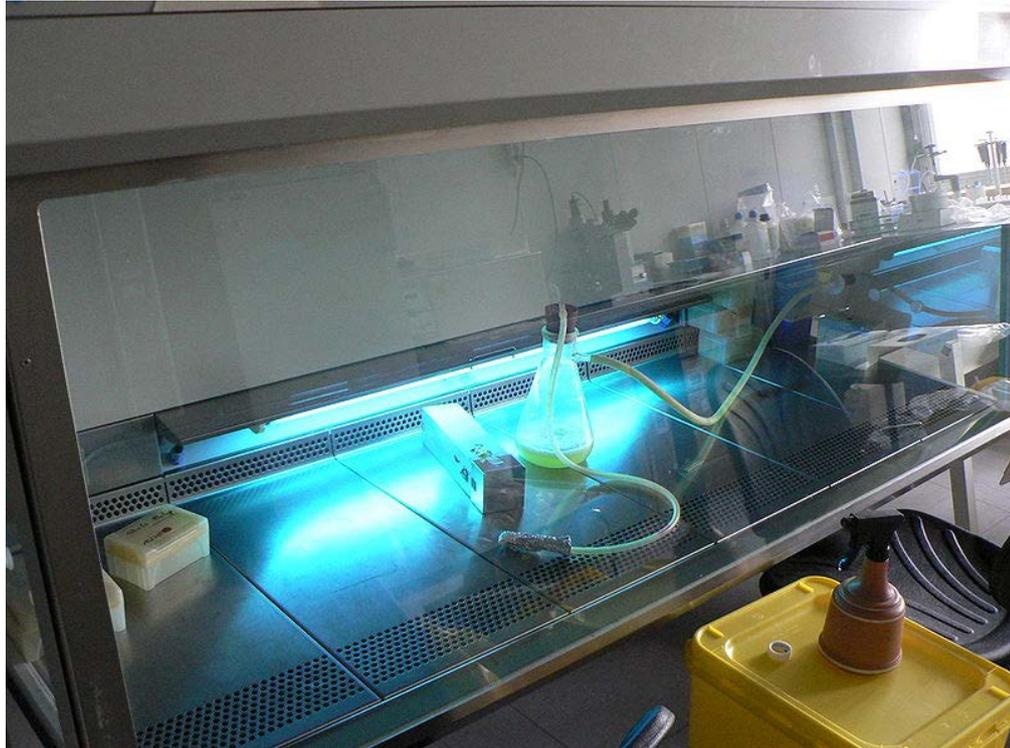
La sterilizzazione con radiazioni è un metodo a bassa temperatura, utilizzabile per prodotti termolabili. A causa della complessità degli impianti e dei costi questo metodo è applicabile solo su grande scala. Le radiazioni possono essere classificate in due tipi:

- Corpuscolare (raggi  $\alpha$ , raggi  $\beta$ , protoni e neutroni)
- Elettromagnetiche (raggi  $\gamma$ , raggi x, raggi uv)

In generale le radiazioni particellari sono più difficili e costose da produrre. I sistemi a radiazioni si dividono in sistemi a radiazioni ionizzanti e non ionizzanti.

### **2.2.1. Radiazioni ultraviolette**

Sistema non ionizzante. I sistemi a raggi ultravioletti non possono essere considerati sterilizzanti, hanno principalmente una azione batteriostatica, mantenimento di sterilità (antisettico fisico). Sono utilizzate soprattutto per la batteriostaticità dei piani di lavoro o dell'aria sotto cappa. Le radiazioni prodotte hanno lunghezza d'onda di 240-280 nm (optimum 253.7 nm). L'azione microbica è dovuta allo specifico assorbimento di uv da parte delle basi del DNA con formazione dei dimeri di timina. La morte cellulare sopravviene quando questo danno chimico è prodotto a livelli troppo elevati. Non hanno grande capacità di penetrazione per questo sono efficaci solo su oggetti non troppo spessi o su liquidi fatti passare attraverso recipienti sottili. Devono essere utilizzate con cautela e a distanza dagli operatori, essendo agenti mutageni ed estremamente dannosi per gli occhi. Sono prodotte da lampade a vapori di mercurio.



**Figura 4 - Una lampada agli UV accesa per sterilizzare un piano di lavoro, quando questo non è utilizzato**

### 2.2.2. Raggi $\gamma$

Sistema ionizzante. I principali vantaggi offerti dalla sterilizzazione con raggi gamma sono l'altissimo potere di penetrazione di queste radiazioni e il modesto incremento termico durante il processo (meno di 5°C). Questa tecnica è applicabile a materiali termosensibili già confezionati, Il materiale non diventa radioattivo e la sterilizzazione con raggi gamma si presta ad essere condotta come processo continuo. Infatti questa tecnica è utilizzata prevalentemente in ambito industriale avendo un'ottima capacità di penetrazione e avendo la possibilità di trattare contemporaneamente grandi quantità di oggetti.

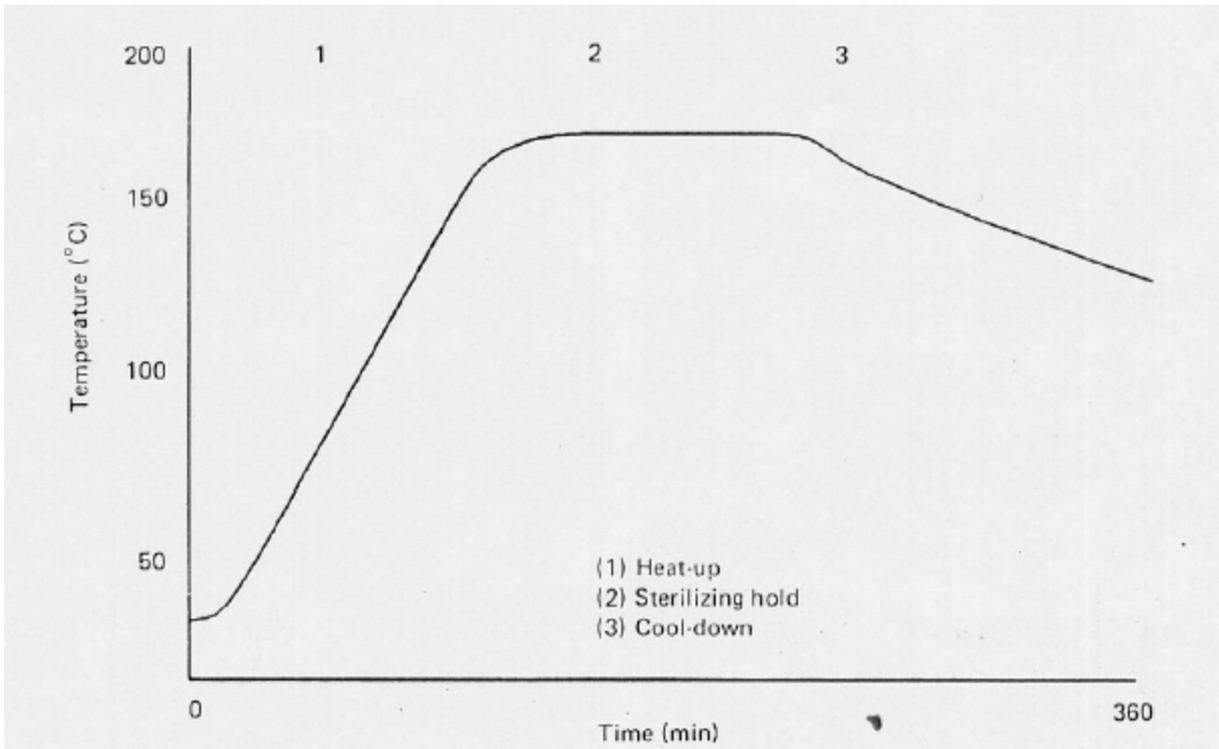
### 2.2.3. Microonde

Tecnica utilizzata in vari ambiti data la sua praticità d'uso è il basso costo. L'azione dei sistemi a microonde si basa su i due principi, termico e non termico. L'effetto termico deriva dalla capacità di generare rapidissime vibrazioni molecolari determinando un aumento della temperatura alterando le capacità vitali e funzionali dei microrganismi. L'effetto non termico è dovuto all'energia trasportata dalle onde elettromagnetiche

che viene trasferita alla materia colpita. Si ha così la trasformazione di alcuni amminoacidi, trasporto di ioni che influenzano il metabolismo, modifica di segnali elettrici, accelerazione della sintesi del DNA. Questo effetto è molto importante, si è visto infatti che la riduzione microbica è maggiore se alla stessa temperatura raggiunta sussiste anche un effetto non termico. È compatibile con tutti i materiali, metallo, vetro, plastica, ceramica, gomma, senza alterarne le qualità. Questo è dovuto al fatto che strumenti metallici raggiungano al massimo la temperatura di 74°C. L'azione sterilizzante si esplica in tempi brevissimi 90-150 sec. Ma la sicurezza è con cicli da 4 minuti.

#### 2.2.4. Calore Secco

La sterilizzazione avviene attraverso il contatto dell'oggetto con aria calda che agisce per ossidazione dei componenti cellulari; sono utilizzate la stufa a secco o il forno Pasteur. In media, per una sterilizzazione completa è necessario che sia raggiunta una temperatura di 160° per un'ora o di 180° per 30 minuti. A questi tempi si devono aggiungere poi i tempi di riscaldamento e raffreddamento che portano un ciclo a 180-240 minuti (Figura 5). È comune uso lasciare aperto lo sportello dell'apparecchio per la sterilizzazione fino a temperature di 80/100°: in questo modo si permette la fuoriuscita dell'eventuale vapore acqueo che si potrebbe creare e che andrebbe a ridurre l'efficienza del processo. Gli indicatori biologici per la sterilizzazione a secco (stufe a circolazione forzata d'aria) sono costituiti da spore di *Bacillus Subtilis* var. *Niger* atcc 9372. È comunque una tecnica ormai in disuso e soppiantata dalla sterilizzazione a vapore, avendo lo svantaggio, a causa delle temperature molto alte, di non poter utilizzare molti materiali termosensibili. Oltre al difetto di tempi tanto lunghi per una routine di sterilizzazione va aggiunto l'impossibilità di verificare l'avvenuta sterilizzazione e il mantenimento nel tempo del risultato raggiunto fino al momento dell'utilizzazione dello stesso.



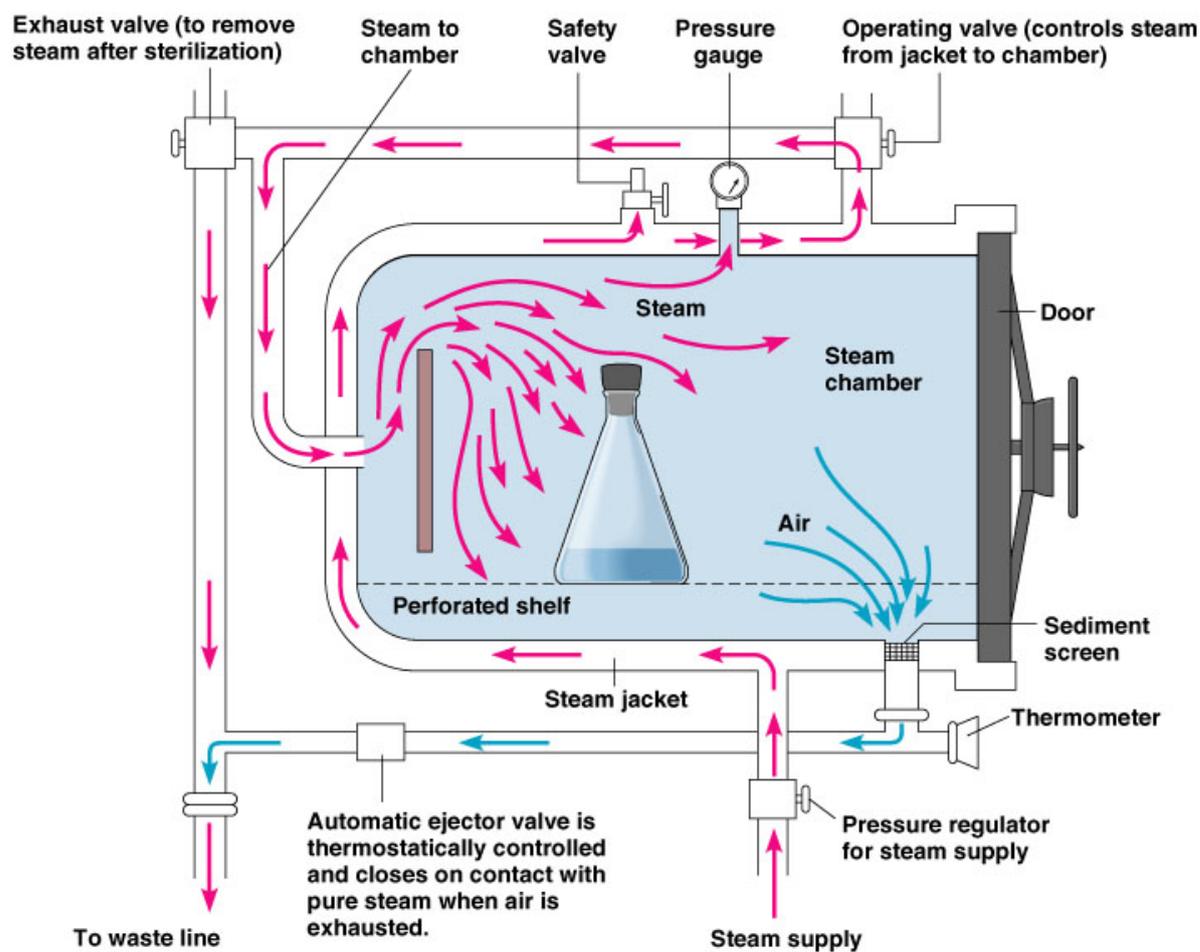
**Figura 5 - Andamento della temperatura nel ciclo di sterilizzazione al calore secco**

### 2.2.5. Calore umido (sterilizzazione in autoclave)

Questo sistema elimina i microrganismi mediante denaturazione di loro proteine e altre biomolecole. La sterilizzazione mediante autoclave è quella più diffusa essendo poco costosa e non tossica e data la sua buona capacità di penetrazione. L'autoclave (Figura 6) è una caldaia all'interno della quale si produce vapore sotto pressione per raggiungere alte temperature con lo scopo di eliminare i germi.

Si inizia con una fase di riscaldamento in cui si verifica un progressivo aumento della temperatura sia della camera che del prodotto; giunti ad una temperatura di 121° (temperatura necessaria per rendere inattivi i processi vitali di ogni tipo di cellula), questa viene mantenuta per almeno 20 min (*plateaux*) dopodiché inizia la fase di raffreddamento che deve avvenire in modo molto lento e graduale in modo da non compromettere le caratteristiche del prodotto.

In un grafico tipo di un ciclo di sterilizzazione: le autoclavi moderne registrano ogni singolo ciclo e monitorizzano sia la temperatura della camera, che la temperatura del campione, che, ovviamente, la pressione che viene applicata in camera.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figura 6 - Schema di funzionamento dell'autoclave

Il vapore deve essere saturo (cioè vapore acqueo in presenza del suo liquido) e pertanto tutta l'aria all'interno dell'autoclave deve essere rimossa.

#### 2.2.5.1. Regolazione del processo di sterilizzazione mediante la funzione F0

Introdotta nel 1976 dalla F.D.A. (food and Drug Administration) Americana nel settore farmaceutico, il calcolo tramite la funzione F0 (o Fattore di letalità) rappresenta il sistema di gestione e di controllo di un ciclo di sterilizzazione a vapore ad acqua con calore umido. Esso esegue infatti il calcolo matematico dell'abbattimento della carica batterica di un prodotto da sterilizzare in autoclave.

Esiste infatti una relazione tra il tempo e la temperatura di sterilizzazione:

tale relazione può essere espressa dalla formula:

$$F_0 = \tau \times 10^{(T-121/10)}$$

dove:

$F_0$  è il tempo di letalità

$\tau$  è il tempo di permanenza ad una data temperatura

$T$  è la temperatura

Il calcolo di  $F_0$  può essere effettuato a partire da temperature superiori ai 100°C poiché al di sotto di tale temperatura l'inattivazione della carica batterica è pressoché insignificante. Il valore di  $F_0$  di ciclo di sterilizzazione completo sarà quindi calcolato come la sommatoria dei singoli valori di  $F_0$  relativi ad ogni temperatura superiore ai 100°C e al tempo in cui questa è stata mantenuta.

### 2.2.6. Gas Plasma

Rappresenta una delle tecniche più avanzate per la sterilizzazione: consiste nell'applicazione di perossido di idrogeno allo stato gassoso in presenza di un forte campo elettrico. Questo porta il perossido allo stato di plasma strappandone gli elettroni e generando radicali liberi. I radicali hanno un'alta capacità germicida andando a danneggiare notevolmente le membrane cellulari. Il vantaggio è dovuto al fatto che si può preservare la sterilità fino a 12 mesi. Il gas plasma è molto promettente in quanto: assolutamente non tossico (genera solo acqua e ossigeno); ha una temperatura operativa molto bassa, intorno ai 40-45 °C; può essere utilizzato praticamente su ogni materiale, tranne alcune stoffe e composti in grado di assorbire il perossido.

La sterilizzazione ossidativa a bassa temperatura per dispositivi medici e strumenti chirurgici è una alternativa sicura alla sterilizzazione con ossido di etilene. Uno dei

metodi di sterilizzazione ossidativa a bassa temperatura più promettenti è la sterilizzazione con plasma di perossido d'idrogeno, sviluppato dalla advanced sterilization products (asp) e commercializzato con il nome registrato di Sterrad™.

Un altro metodo, basato sulla tecnologia del gas plasma da acido peracetico, sviluppato dalla Abtox col nome di Plazlyte™, non ha ricevuto l'approvazione della FDA.

Esiste uno specifico indicatore biologico per la sterilizzazione con plasma di perossido d'idrogeno: sono fiali contenenti spore di *Geobacillus Stearothermophilus* (commercialmente cyclesure biological indicator) che vengono inserite in autoclave ad ogni ciclo di sterilizzazione e poi messe ad incubare. Se le spore sono state inattivate il terreno resta viola, altrimenti si intorbida e diventa giallo.

Con questa tecnica si possono sterilizzare dispositivi o strumenti chirurgici puliti e asciutti, confezionati in materiali porosi non cellulosici (es buste di polipropilene o tyvek®):

- Apparecchiature per stereotassi
- Endoscopi
- Cavi a fibre ottiche
- Lame

## 2.3. Norme in materia di sterilizzazione

Le norme UNI EN 285, UNI EN 550, 552, 554, 556 e 868 descrivono le esigenze in materia di sterilizzazione a vapore e all'ossido di etilene (Tabella 1). Attualmente non esistono norme che contengono indicazioni in materia di esigenze per la sterilizzazione al plasma.

**Tabella 1 - Riassunto delle norme importanti per la sterilizzazione negli ospedali**

UNI EN 285	Sterilizzazione - Sterilizzazione a vapore - Grossi sterilizzatori
UNI EN 550	Sterilizzazione di strumenti medici - Procedure per la validazione ed il controllo di routine della sterilizzazione mediante ossido di etilene
UNI EN 552	Sterilizzazione di strumenti medici - Procedure per la validazione ed il controllo di routine della sterilizzazione mediante irradiazione
UNI EN 554	Sterilizzazione di strumenti medici - Procedure per la validazione ed il controllo di routine della sterilizzazione mediante vapore
UNI EN 556	Sterilizzazione di strumenti medici - Esigenze di sterilità per i strumenti medici etichettati come "sterili"
UNI EN 866-1	Sistemi biologici per testare gli sterilizzatori e le procedure di sterilizzazione - Parte 1: Esigenze generali
UNI EN 866-2 - 866-8	Sistemi biologici per testare gli sterilizzatori e le procedure di sterilizzazione - Parte 2-8: Esigenze
UNI EN 867-1 - 867-3	Sistemi non biologici per testare gli sterilizzatori
UNI EN 868-1 - 868-10	Materiali di imballaggio per la sterilizzazione di strumenti medici
ISO 14937	Sterilization of medical devices - General requirements for characterization of sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process

Per l'ottenimento del marchio CE, requisito indispensabile per la messa sul mercato di questi apparecchi sia in Svizzera che negli altri paesi dell'UE, si esige la distruzione di  $10^6$  spore. La sterilizzazione al plasma si è sviluppata più rapidamente in Europa rispetto agli Stati Uniti, malgrado gli apparecchi siano fabbricati negli USA.

## 3. Il Plasma

Il plasma è considerato il quarto stato della materia, accanto allo stato gassoso, liquido e solido. Il plasma rappresenta lo stato della materia più abbondante in natura: infatti sono plasmi gli strati superiori dell'atmosfera terrestre (ionosfera), gli strati gassosi esterni del Sole e delle stelle e gli spazi interstellari (*plasmi naturali*).

Il nome plasma indica un gas interamente o parzialmente ionizzato, macroscopicamente neutro, in cui le specie che si possono individuare sono le molecole del gas, frammenti delle stesse (ioni positivi e negativi, radicali, atomi) e prodotti di reazione fra tutte le specie presenti. Tali specie possono trovarsi in differenti stati di eccitazione corrispondenti a diverse distribuzioni di energia nel sistema.

Un plasma si può generare artificialmente fornendo ad un gas un'energia sufficientemente alta mediante laser, onde d'urto (*shock waves*), arco elettrico, campi elettrici e magnetici (*glow discharge*).

Esistono due tipi di plasma:

- 1) il "plasma freddo", prodotto a bassa pressione in condizioni di non equilibrio
- 2) il "plasma ad alta temperatura", prodotto da archi elettrici, torce al plasma, fusione nucleare, caratterizzato da valori di energia e pressione più elevati del plasma freddo.

### 3.1. Il plasma freddo

La generazione di un plasma mediante l'applicazione di campi elettrici o magnetici è dovuta al fenomeno del breakdown elettrico di un gas.

Se si applica un campo elettrico ad un gas mediante una coppia di elettrodi, l'energia cinetica acquisita dagli elettroni (che solitamente sono le specie cariche presenti più

leggere e che quindi acquisiscono più velocità degli ioni) viene trasferita alle altre specie tramite collisioni, provocando eccitazioni, frammentazioni e ionizzazioni. Si innesca così un nuovo regime di conduzione che si autosostiene mediante collisioni tra particelle cariche e neutre. Le collisioni provocano anche l'eccitazione di alcuni elettroni atomici nel loro stato fondamentale: quando questi ritornano allo stato non eccitato emettono una luce incandescente (scarica a bagliore o *glow discharge*).

La caratteristica principale del plasma è la neutralità macroscopica dovuta alla reciproca compensazione della carica spaziale degli ioni positivi e degli elettroni. La neutralità elettrica si realizza solo in volumi abbastanza grandi e in tempi sufficientemente lunghi: all'interno di un volume limitato di plasma è violata e si origina un campo elettrico fra strati di cariche elettriche positive e negative. In genere si osserva che il bulk del plasma è carico positivamente mentre la periferia è carica negativamente a causa dell'elevata mobilità degli elettroni (di piccola massa ma elevata energia) che tendono a diffondere verso le regioni esterne. Tutte le superfici a contatto con il plasma si caricano negativamente e si crea una sottile guaina (*sheath*) di campo elettrico dovuto alla separazione delle cariche.

La pressione di generazione del plasma è bassa (0.001 – 10 torr). A tale pressione si ha un ridotto numero di collisioni e quindi si formano poche specie cariche. Le basse pressioni impediscono l'instaurarsi di una situazione di equilibrio termodinamico. Infatti, una bassa pressione implica un lungo cammino libero medio delle specie presenti nel plasma e quindi l'energia acquistata dagli elettroni non è efficacemente distribuita tra i vari gradi di libertà delle molecole a causa dell'esiguità degli urti. Si avranno in ciascun punto del plasma quattro diverse temperature tra le quali esiste la relazione:  $T_{el} > T_{vibr} > T_{rot} \approx T_{trasl}$ .  $T_{el}$  è la temperatura elettronica ( $\sim 10^4 K$ ),  $T_{vibr}$  è la temperatura associata ai moti vibrazionali ( $\sim 100 K$ ) mentre  $T_{rot}$  e  $T_{trasl}$  sono associate rispettivamente ai moti rotazionali e traslazionali ( $\sim 298 K$ , ambiente).

Il sistema è altamente reattivo, grazie alle alte temperature elettroniche e vibrazionali che facilitano la frantumazione delle molecole e la formazione di una notevole quantità di radicali, atomi, oltre a ioni e elettroni. La bassa temperatura traslazionale e rotazionale (da cui la denominazione di plasma freddo), permette il trattamento di substrati termolabili quali le materie plastiche.

### **3.2. Interazioni plasma-superficie**

Le varie specie presenti nelle scariche a bagliore interagiscono con le superfici esposte tramite processi di tipo chimico, di cui sono responsabili le specie neutre, e processi di tipo fisico dovuti agli ioni positivi. Ogni trattamento con plasma è caratterizzato dalla presenza di entrambe queste componenti.

Nei processi di tipo chimico, le specie reattive, atomi e radicali, possono interagire con le superfici a contatto con rimozione di materiale dal substrato e produzione di composti volatili (*etching*) oppure con deposizione di materiale tramite reazioni di polimerizzazione (*coating*) o innesto di nuovi gruppi funzionali (*grafting*).

I processi di tipo fisico sono dovuti alla già citata maggiore mobilità degli elettroni rispetto agli ioni positivi nel campo elettrico del plasma. Le superfici a contatto con il plasma assumono un potenziale elettrico negativo per cui subiscono bombardamento da parte degli ioni positivi. Il bombardamento ionico ha effetto sulla velocità dei processi di trattamento, sulla composizione e sulla struttura risultante dei materiali trattati, e sullo *sputtering* (rimozione aspecifica di materiale).

### 3.3. Parametri caratteristici del plasma

Ogni trattamento via plasma è influenzato da un certo numero di variabili che possiamo dividere in due gruppi:

- Parametri sperimentali del processo
- Parametri interni del plasma.

I parametri sperimentali sono impostati prima dell'inizio del processo e sono:

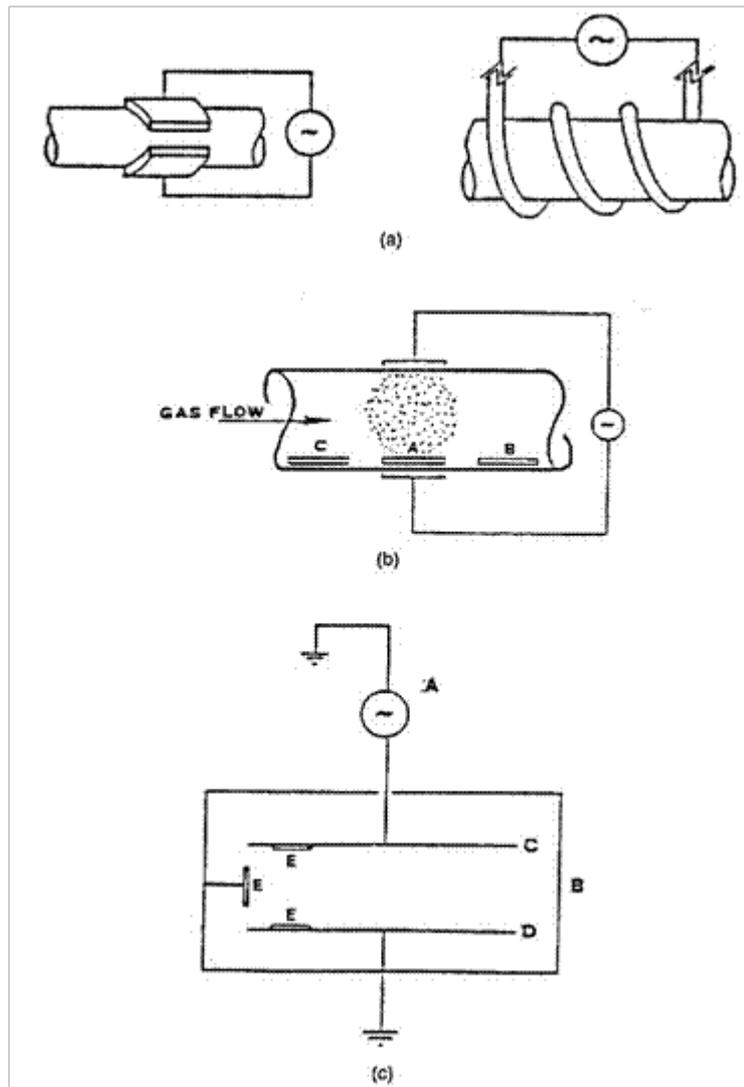
- Pressione
- Composizione del gas di alimentazione
- Flusso della miscela di alimentazione
- Potenza (densità) del campo elettrico
- Campo elettrico (DC, AC: frequenza)
- Temperatura del substrato
- "bias" del substrato
- geometria e materiali del reattore

I parametri interni possono essere misurati tramite opportune tecniche diagnostiche e sono:

- grado di ionizzazione
- tempo di residenza delle specie
- densità e temperatura elettronica
- distribuzione di energia degli elettroni
- tipo e densità dei neutri (atomi e radicali)
- flusso ed energia del bombardamento ionico sulle superfici esposte al plasma

In relazione, quindi, alle scelte effettuate è possibile scegliere diverse tipologie di architetture di macchine. Quelle più comuni sono riportate

nella Figura 7. In estrema sintesi esse si distinguono in macchine capacitive (a sinistra, b, c) o induttive (a destra), ed ancora, ad elettrodi esterni (a e b) oppure interni (c). Esiste poi la possibilità di introdurre altri elettrodi nella camera di reazione (c) e di posizionare il materiale da trattare in un punto opportuno della camera (b).



**Figura 7 - Possibili configurazioni della camera di reazione**

Un reattore al plasma è, solitamente, costituito da una serie di apparecchiature, Figura 8, in cui sono presenti, oltre alla camera di reazione, l'impianto di alimentazione dei gas, l'impianto per la generazione e gestione della scarica ed il sistema di pompaggio. Ognuno di questi impianti necessita di un sistema di controllo. Usualmente si accompagnano una serie di apparecchiature per l'analisi del plasma.

Tutte le apparecchiature sono gestite da un software sviluppato ad hoc.

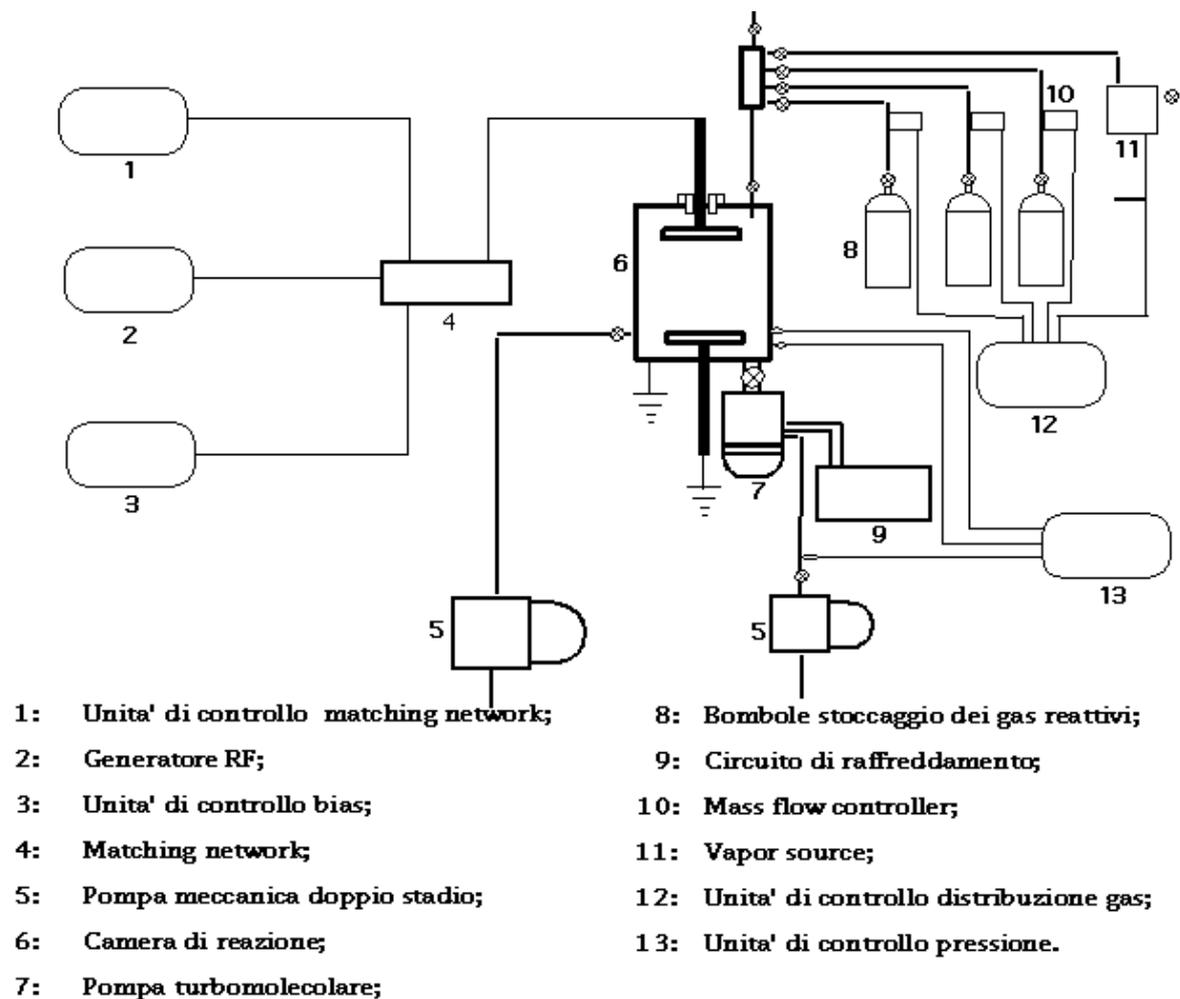


Figura 8 - Schema di un sistema per il trattamento al plasma freddo

### **3.4. Applicazioni dei trattamenti al plasma**

Le tecnologie basate sull'utilizzo del plasma freddo sono numerose e spaziano in diversi settori. Nel campo della microelettronica sono ampiamente usati fin dai primi anni '70, consentendo la riduzione delle dimensioni della componentistica elettronica.

A seconda delle applicazioni, le tecnologie 'plasma enhanced' (PE) si dividono in due grossi settori:

- (i) quelle che prevedono la deposizione di film organici o inorganici (plasma coating)
- (ii) quelle che utilizzano il plasma per attivare e modificare le superfici con o senza la sua funzionalizzazione. E' importante sottolineare la peculiarità dei trattamenti via plasma freddo che possono essere effettuati su ogni tipo di materiale (polimerico, metallico o ceramico), in quanto la temperatura media dei gas a contatto con il manufatto è in pratica, quella ambiente.

Alcuni esempi delle applicazioni del "plasma processing", utilizzate in campo industriale o in via di sperimentazione, vengono riportate di seguito:

- Microelettronica, (dry-etching e deposizione di film dielettrici);
- Ottica (deposizione di film con indice di rifrazione variabile, film antiscattering per lenti di plastica, film colorati, ecc.);
- Tool Hardening (indurimento superficiale di attrezzi da taglio, punte di trapano, film di diamante e diamond-like, Ti-N, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, ecc.);
- Film Barriera ed antibatterici (food e pharmaceutical packaging , protezione dalla corrosione);
- Coating Biocompatibili (biomateriali e attrezzature biomedicali);
- Metallizzazione (film a tenore variabile di metalli)
- Attivazione di metalli (aumento delle bagnabilità ed adesione)

**Tabella 2 - Applicazioni tecnologiche del plasma freddo**

<b>Caratteristica da variare</b>	<b>Possibili utilizzi</b>	<b>Settori d'impiego</b>
Adesione	Adesione di: metalli, polimeri, carta, inchiostri, colori, resine, fibre, ecc.	Settori industriali: tessile, carta, componentistica per industria auto e trasporti, moda, elettronica, imballaggi, ...
Effetto barriera	Film barriera trasparenti e colorati per imballaggi alimentari e non, membrane per separazione di più componenti.	Industria imballaggi, chimica alimentare.
Biocompatibilità	Protesi vascolari, protesi ossee, valvole cardiache, ecc.	Industria per prodotti biomedicali.
Antifouling	Rivestimenti antialghe e antifunghi, protesi, sensori immersi in ambienti inquinati,	Industria componenti per trattamenti acque e liquami, tessile, biomedicale.
Antibatterico	Cateteri, tessuti per applicazioni diverse, materiali in contatto con fluidi corporei.	Industria tessile, biomedicale, alimentare.
Conducibilità elettrica	Capacità su film, PTC, NTC, imballaggi antistatici.	Settori elettronica e imballaggi.
Durezza superficiale	Indurimento di lenti oftalmiche, parabrezza in plastica, fari per automobili.	Ottica, componentistica trasporti.
Rivestimenti idrofobi e oleofobi	Rivestimenti autopulenti.	Industria ottica, componentistica edilizia, autotrasporti, ecc.
Rivestimenti idrofili	Carta, plastica, materiali biomedicali.	Industria della carta, dei tessuti, dei componenti biomedicali.
Rivestimenti protettivi	Anticorrosione, protezione dagli agenti aggressivi.	Industria componenti auto, recupero beni culturali e restauro.

In generale le modifiche superficiali plasma assistite, per esempio di un materiale polimerico, permettono di modificare le proprietà fisiche e chimiche (conducibilità, trasparenza, durezza, adesività, compatibilità biologiche, resistenza agli agenti atmosferici) agendo solo sulla sua superficie senza interessare il bulk del manufatto. I

film depositati via plasma possono essere più o meno sottili (da meno di 1  $\mu\text{m}$  all'ordine della decina di micron) ed aderenti. E' ovvio quindi pensare a dispositivi funzionali di interesse biomedicale, realizzati nel materiale ritenuto più opportuno da un punto di vista dinamico-meccanico, che saranno in seguito trattati superficialmente per renderli compatibili con i tessuti umani.

Il film biocompatibile deve essere impermeabile e non deve rilasciare composti nell'ambiente circostante che provocherebbero reazioni citotossiche ed infiammatorie nei tessuti. Analogamente, anche i trattamenti superficiali plasma-assistiti (non depositivi) possono migliorare le prestazioni dei materiali utilizzati.

Il rapido e crescente sviluppo della microelettronica negli ultimi decenni è stato senza dubbio determinato dall'impiego di tecniche plasmochimiche quali il dry-etching. Queste infatti hanno permesso l'evolversi dei metodi di integrazione dalla LSI, ovvero integrazione su larga scala ( $10^3 - 10^5$  componenti/chip), alla VLSI, integrazione su larghissima scala ( $10^5 - 10^6$  componenti/chip), fino alla ULSI, integrazione su ultralarga scala ( $> 10^6$  componenti/chip). Allo stesso tempo il grande interesse tecnologico per la microelettronica ha accresciuto l'interesse per le tecniche condotte via plasma sicché si può dire che l'evolversi di queste due aree di ricerca (microelettronica e plasmochimica) proceda su vie parallele.

Di notevole interesse applicativo è il dry etching di Pd e TiN. Il primo è utilizzato nella fabbricazione di circuiti integrati nella fase di metallizzazione, il TiN in quella di passivazione. Il dry etching di questi materiali è realizzabile in plasmi a radiofrequenza alimentati con miscele  $\text{CF}_4/\text{O}_2$  o  $\text{SF}_6/\text{O}_2$ .

Ampio e crescente interesse stanno riscuotendo le tecnologie al plasma freddo nel campo ottico e molti sforzi sono diretti nella realizzazione di lenti intraoculari, ma dell'utilizzo del plasma nel campo biomedicale si è già parlato. L'interesse industriale verso processi economici per l'indurimento superficiale delle lenti in plastica e la loro colorazione, è palese.

Le problematiche riguardanti l'indurimento superficiale hanno poi assunto sempre vasto interesse nell'ambito dell'industria meccanica, dove si è sempre intervenuti in modo rilevante sulla struttura superficiale dei materiali quando bisogna realizzare, ad es., strati antiusura.

Altro campo di vasto interesse è quello della metallizzazione delle materie plastiche. La peculiarità delle tecnologie al plasma è dovuto alla possibilità di realizzare film sottili estremamente aderenti ed inoltre è possibile realizzare riporti con contenuto variabile di metallo lungo lo spessore eliminando, in pratica, l'interfaccia tra il riporto ed il substrato.

Le tecnologie al plasma freddo possono essere utilizzate per l'attivazione superficiale dei materiali metallici. In tale campo possiamo far rientrare i processi di pulizia chimica delle superfici, l'aumento della bagnabilità, la deposizione di film sottili o di "grafting" di particolari gruppi funzionali che possono incrementare l'adesione con l'eventuale ricoprimento organico o conferire alla superficie particolari caratteristiche di reattività e selettività.

La realizzazione di film barriera viene effettuata allo scopo di migliorare le proprietà barriera ai gas degli imballaggi utilizzati nell'industria alimentare, farmaceutica ed elettronica tramite il riporto di film sottili di materiali opportunamente scelti. In particolare è importante limitare la permeabilità dell'O<sub>2</sub> e dell'H<sub>2</sub>O attraverso le "pellicole" polimeriche impiegate per il food-packaging, dato che questi ultimi sono responsabili della gran parte dei fenomeni di ossidazione e/o degradazione degli alimenti nonché della formazione di sostanze tossiche e della loro disidratazione.

In genere i rivestimenti realizzati via plasma freddo, producono film aventi effetto barriera (ai gas, al vapore d'acqua) più elevato rispetto ai coatings realizzati con altri processi in quanto si può avere un più accurato controllo della composizione del riporto in fase di deposizione. Inoltre, spesso, i costi di produzione sono sensibilmente più bassi.

Le modifiche superficiali via plasma freddo di film polimerici destinati all'industria alimentare sono caratterizzate dall'innesto di specifici gruppi funzionali che determinano la non proliferazione di agenti patogeni.

Il grafting di gruppi funzionali può essere realizzato, tra gli altri, con gas quali ammoniacca, etano miscelati o non ad idrogeno. Il Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e della Produzione ha esperienza nelle applicazioni al plasma nello specifico settore dei film antibatterici. I risultati ottenuti dai ricercatori del DIMP hanno dimostrato che in un trattamento di ammoniacca, le funzionalità apportate variano tra gruppi amminici primari, secondari, gruppi imide, nitrile, etc. data la intrinseca specificità di un plasma. In questo tipo di trattamento è stato possibile determinare le condizioni operative per cui si realizza una elevata selettività verso la formazione di gruppi amminici primari, come è evidente a seguito di analisi XPS che mostra la derivatizzazione della superficie trattata.

In ogni trattamento al plasma, particolarmente nella aminazione, è stata riscontrata, generalmente, una eccellente stabilità operativa e di conservazione del trattamento effettuato. L'attività antibatterica dei film trattati è stata dimostrata da una serie di test su diverse famiglie di batteri.

## 4. La sterilizzazione al plasma – analisi costi/benefici

Come affermato precedentemente, esiste in commercio una macchina che utilizza un plasma di perossido di ossigeno per la sterilizzazione. La macchina è prodotta da una multinazionale ed il processo è identificato con il nome Sterrad™. Il processo si basa sull'azione sinergica del perossido d'idrogeno e del plasma a bassa temperatura per distruggere rapidamente i microrganismi. Al termine del processo di sterilizzazione, nessun residuo tossico rimane nei materiali trattati, gli oggetti da sterilizzare vengono posti nella camera di sterilizzazione.



**Figura 9 - Alcuni dei modelli Sterrad™**

Il funzionamento dello Sterrad™ prevede che venga ridotta la pressione nel sistema e iniettata una soluzione acquosa di perossido di idrogeno nella camera in cui viene vaporizzata. Dopo avere ridotto nuovamente la pressione nella camera di sterilizzazione, viene generato il plasma a radio-frequenza (RF). Nel plasma, il perossido di idrogeno si dissocia in specie reattive le quali collidono/reagiscono ed uccidono i microrganismi; dopo aver reagito con gli organismi e fra loro, i componenti attivati perdono la loro energia e si ricombinano per formare O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, ed altri prodotti secondari non tossici. Il plasma viene mantenuto attivo per un tempo sufficiente a realizzare la sterilizzazione; a processo completato, l'energia viene

interrotta, il vuoto viene rilasciato, la camera ritorna alla pressione atmosferica mediante l'introduzione di aria attraverso un filtro HEPA.

Il sistema è molto efficiente e utilizzato in numerose strutture pubbliche e private.

Un'analisi dei costi, Tabella 3, espressa in dollari americani, confronta la metodologia al plasma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con la sterilizzazione chimica con ossido di etilene.

**Tabella 3 - Analisi dei costi e confronto tra il trattamento Sterrad™ (perossido di idrogeno) e quello con ossido di etilene (ETO).**

	<b>EtO Sterilization</b>	<b>Hydrogen Peroxide Plasma Sterilization</b>
<b>Capital and Installation Costs:</b>		
Sterilization unit cost, including installation and initial supplies.  This cost also includes the 1 <sup>st</sup> year maintenance contract for the STERRAD™ only:	\$40.000	\$100.000
<b>Operational Costs (1st year):</b>		
Supplies:	\$28.521	\$28.040
Utilities:	\$6.627	\$468
EtO tanks:	\$63.440	\$0
Hydrogen peroxide cassettes:	\$0	\$37.206
Maintenance, service:	\$16.000	\$0
Training, protective attire:	\$2.000	\$0
EtO recovery cost:	\$10.000	\$0

Risk management cost:	\$5.000	\$0
<b>Total Costs: (not including capital and installation costs):</b>	\$131.588	\$65.714
<b>Total Income:</b>	\$0	\$0
<b>Annual Benefit:</b>	-\$131.588	-\$65.714
<b>Economic Analysis Summary</b>		
Annual savings for hydrogen peroxide plasma sterilization:	\$65.874	
Capital Cost for Equipment/Process:	\$100.000	
Payback Period for Investment in Equipment/Process:	1,5	years

Il nuovo processo di sterilizzazione studiato consente di trattare oggetti in modo tale che essi siano riutilizzabili utilizzando una tecnica completamente innovativa rispetto a quelle esistenti. I materiali da trattare dovranno essere solidi e potranno essere sia metalli sia materiali polimerici. E' possibile l'utilizzo del plasma generato nel campo della radio frequenza (13,56 MHz) con gas di basso costo e non dannosi per l'ambiente.

Nella Tabella 4 è riportato un confronto tra le principali peculiarità e differenza relative al processo al plasma freddo analizzato ed i processi disponibili.

Sono stati presi in considerazione solo il processo ETO e quello Sterrad in quanto gli altri sono considerati, o non competitivi con questi ultimi perché non applicabili in alcune applicazioni, o di prestazioni inferiori.

**Tabella 4 – Confronto costi tra sterilizzazione con ossido di etilene ed la nuova tecnica**

	<b>EtO</b>	<b>Plasma</b>
Materiali utilizzati	Ossido di etilene, inquinante	Gas non inquinanti o tali dopo il processo (Ar, O <sub>2</sub> , CF <sub>4</sub> , etc)
Durata	Molto lungo (2- 4 ore)	Breve (meno di 1 ora)
Impatto ambientale	Elevato, necessità di utilizzare numerosi accorgimenti per evitare fughe e/o danni alle persone	Molto ridotto
Consumo energetico	Elevato	Medio
Post-trattamento	Necessario per il desorbimento del gas	Nessuno post-trattamento
	<b>Processo Sterrad (Perossido d'idrogeno)</b>	<b>Plasma</b>
Alimentazione dei gas di scarica	Alimentazione con perossido d'idrogeno liquido	L'utilizzo di gas, invece che di liquidi, per l'alimentazione della sterilizzatrice consentirà di diminuire in modo sostanziale i costi di produzione della macchina, di renderne più semplice l'utilizzo, di ridurre i tempi di trattamento e di ridurre i costi di manutenzione
Costo impianto	Elevato	Medio

#### **4.1. Sviluppo della sterilizzazione al plasma**

Nel 1993 era disponibile unicamente l'apparecchio Sterrad™ 100, costituito da una piccola camera senza doppia porta. Non disponeva di cassette come quelle necessarie per questa forma di sterilizzazione ed inoltre il materiale d'imballaggio era relativamente caro. Il margine di sicurezza, comparato ad altri metodi di sterilizzazione a gas, era relativamente basso. Inoltre, non era chiaro quali fossero i test biologici più indicati per il monitoraggio microbiologico. Questo spiega come mai

gli esperti germanici si siano opposti a questa nuova tecnologia che non garantiva la sicurezza richiesta dalle nuove norme europee.

Molte di queste lacune sono ora state colmate. I test che prevedono l'utilizzo delle spore di *B. stearothermophilus* (prima *B. subtilis*) si sono imposti e sono commercialmente disponibili per il monitoraggio. Il sistema di cassette è stato sviluppato, la taglia della camera di sterilizzazione è stata ampliata ed è stato creato un sistema a doppia porta. L'Abtox Plazlyte Sterilization System, un prodotto della concorrenza che utilizzava l'acido peracetico è stato messo sul mercato. Tuttavia questi apparecchi sono stati ritirati il 13 aprile 1998 a causa di un'epidemia [Food and Drug Administration (FDA) Safety Alert, April 13, 1998]. Infatti 16 pazienti hanno presentato lesioni irreversibili corneali dopo un intervento intra-oculare praticato con strumenti sterilizzati con questo apparecchio. Questo è stato attribuito ad un rilascio di rame e zinco dagli strumenti durante il processo di sterilizzazione [2, 3]. Nel rapporto della FDA si indica che l'apparecchio utilizzato non era approvato per la sterilizzazione di questo strumentario. Questo incidente mostra come -vedi primo articolo di Swiss-NOSO- solo il personale qualificato deve utilizzare questi apparecchi. Sebbene finora non si deplori nessun incidente di questo tipo con gli apparecchi Sterrad™, non è possibile escludere eventuali incompatibilità che possono avere effetti indesiderabili per i pazienti e/o gli strumenti.

Il processo di sterilizzazione è controllato elettronicamente e si interrompe se uno dei parametri non è rispettato. Inoltre, esistono degli indicatori chimici comparabili a quelli disponibili per la sterilizzazione a vapore. Questi indicano semplicemente l'avvenuto contatto con il perossido d'idrogeno e dunque non testimoniano l'adeguatezza del processo di sterilizzazione. Il fabbricante fornisce ugualmente gli indicatori biologici. Questi sono necessari in quanto questa forma di sterilizzazione non è ancora oggetto di una direttiva dell'Unione Europea. In questa situazione, non è raccomandabile un rilevamento unicamente dei parametri di sterilizzazione senza un monitoraggio biologico. In Svizzera, il fabbricante raccomanda di effettuare

settimanalmente i test biologici. Questa frequenza può tuttavia essere modificata da ogni ospedale in quanto la frequenza ottimale non è stata chiaramente stabilita. Questo spiega come mai negli Stati Uniti ed in Francia venga raccomandato un monitoraggio giornaliero.

Nella primavera del 2000, il primo apparecchio Sterrad™ 200 disponibile in Europa è stato testato in condizioni reali a Basilea. Tutte le esigenze, in particolare la distruzione di  $10^6$  spore nel corso di un semi-ciclo, sono state rispettate. Con l'apparecchio Sterrad™ 200, il ciclo è più lungo rispetto a quello dell'apparecchio Sterrad™ 100S o 50. A causa dell'aumento del volume della camera, la fase di vuoto iniziale e la fase finale si allungano. In laboratorio, i test necessari per l'ottenimento del certificato CE sono già stati realizzati dal fabbricante. Nella pratica, le condizioni non sono tuttavia sempre ottimali: per esempio, gli strumenti non sono sempre perfettamente puliti e soprattutto non è sempre disponibile un'acqua deionizzata che rispetti i criteri di qualità richiesti. L'apparecchio in questione ha rispettato i test qualitativi e quantitativi richiesti, i quali sono stati realizzati in collaborazione con l'Università di Halle (Prof. Borneff, Dr. Okpara). All'infuori del Giappone e della Svizzera, nessuno di questi apparecchi è ancora in funzione. Per questa ragione, la notifica di qualsiasi incidente in Svizzera ("postmarketing surveillance") sarà molto importante. Questi annunci possono essere fatti direttamente al fabbricante o all'Ufficio Federale di Salute Pubblica.

## 5. Materiali e Metodi

### 5.1. Materiali

Il materiale utilizzato nelle attività di ricerca è stato fornito dalla società Adiramef ed è costituito da tre leghe:

- a) leghe di titanio commercialmente puro (CP) grado 1, 2 e 4,
- b) lega di titanio, alluminio e vanadio ( $Ti_6Al_4V$ ),
- c) acciaio inox AISI 316.

Il campioni utilizzati nella fase sperimentale sono ottenuti per laminazione e presentano uno spessore di circa 1 mm.

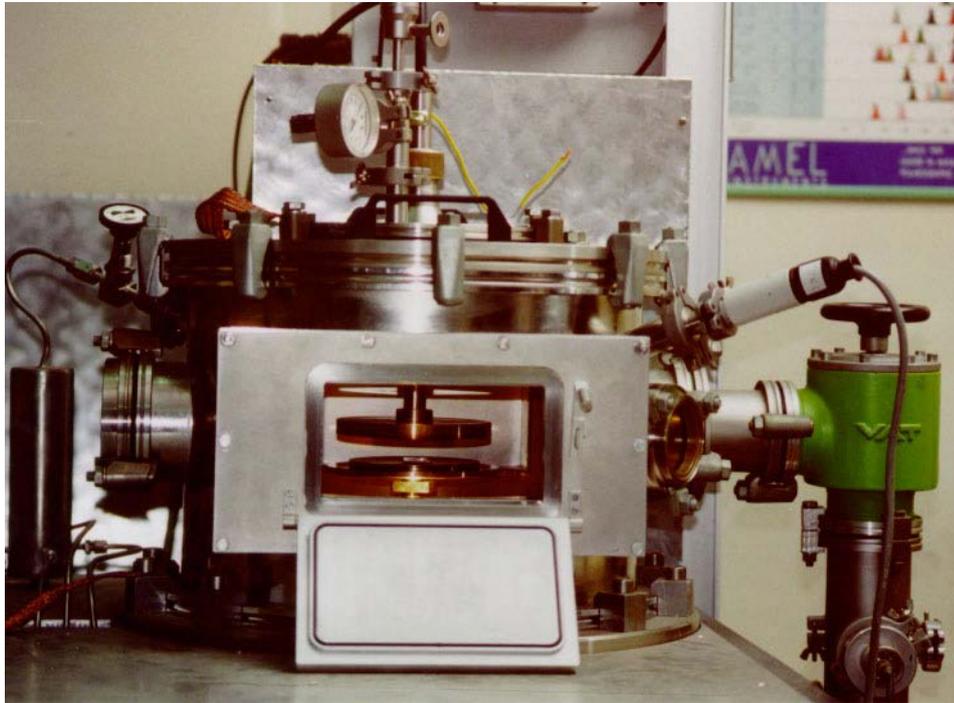
### 5.2. I reattori al plasma

I trattamenti al plasma sono stati effettuati utilizzando diversi gas e, naturalmente, diverse condizioni di scarica in funzione del tipo di gas utilizzato e dell'applicazione prevista per il materiale. Le condizioni sperimentali utilizzate sono riportate nel paragrafo relativo all'analisi dei risultati.

Il reattore utilizzato è del tipo ad elettrodi interni piani e paralleli. Il campione è stato posto sull'elettrodo "a terra", la distanza interelettrodica è di 30 mm. Il reattore e gli elettrodi sono realizzati in acciaio316L.

Il reattore utilizzato per le prove preliminari presso il DIMP, come si evince dalla Figura 10, è di tipo capacitivo ad elettrodi interni piani paralleli. Benché essa sia una macchina efficiente, la sua architettura non è adatta a massimizzare le prestazioni del processo in esame. Ad esempio la distanza interelettrodica è pari a 3 cm (anche se variabile) e gli elettrodi sono circolari. Ciò significa che in una camera simile di possono introdurre solo campioni in cui una delle dimensioni è piccola rispetto alle

altre due (ad esempio film o piccoli oggetti). Non è possibile, inoltre, impilare in pezzi da trattare,



**Figura 10 - Reattore preliminare al plasma freddo presente al DIMP**

Il prototipo realizzato, è stato progettato tenendo conto di quanto appena detto. Al fine di massimizzare lo spazio a disposizione per i pezzi da trattare, ad esempio, l'elettrodo a potenziale è stato posto sulla base inferiore della camera, isolato da essa con da uno strato di teflon. L'elettrodo ground è, in pratica, costituito dalle pareti stesse della camera.

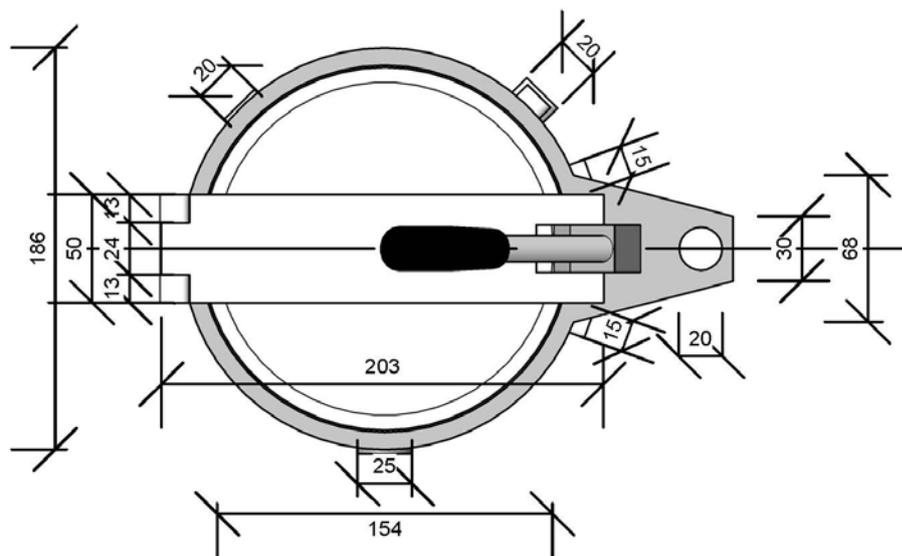


Figura 11 - Vista anteriore del reattore prototipale

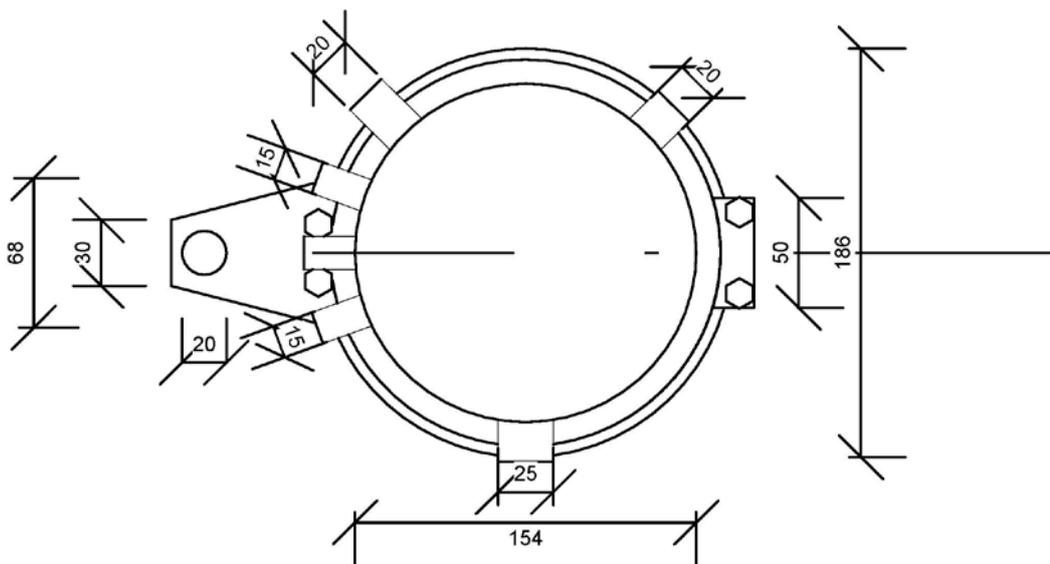
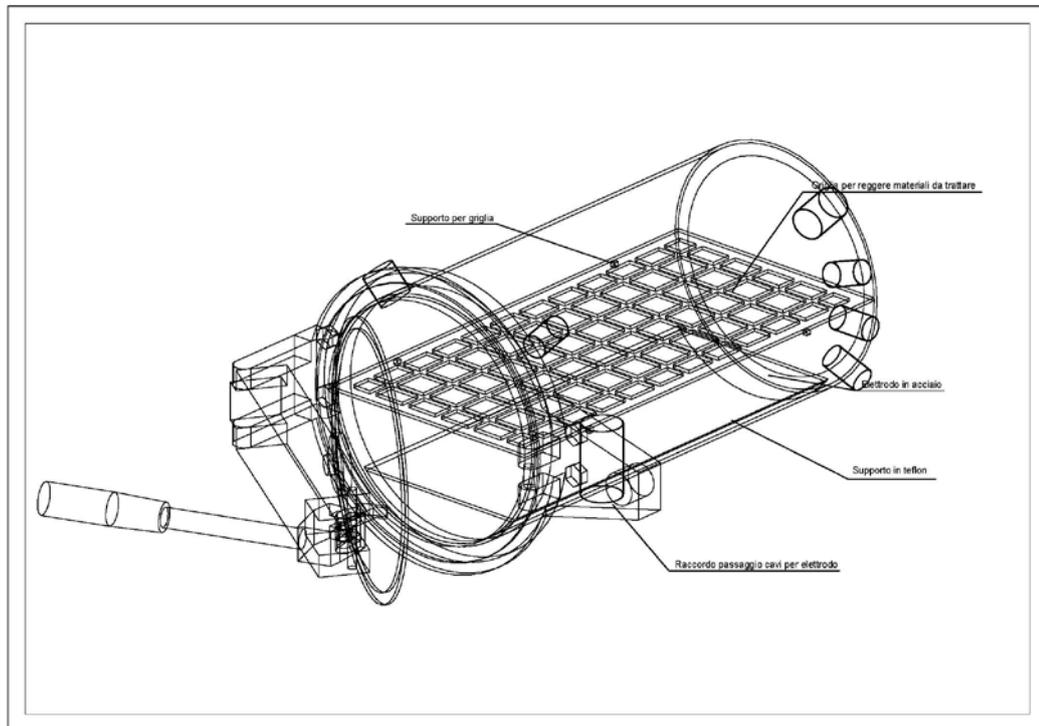
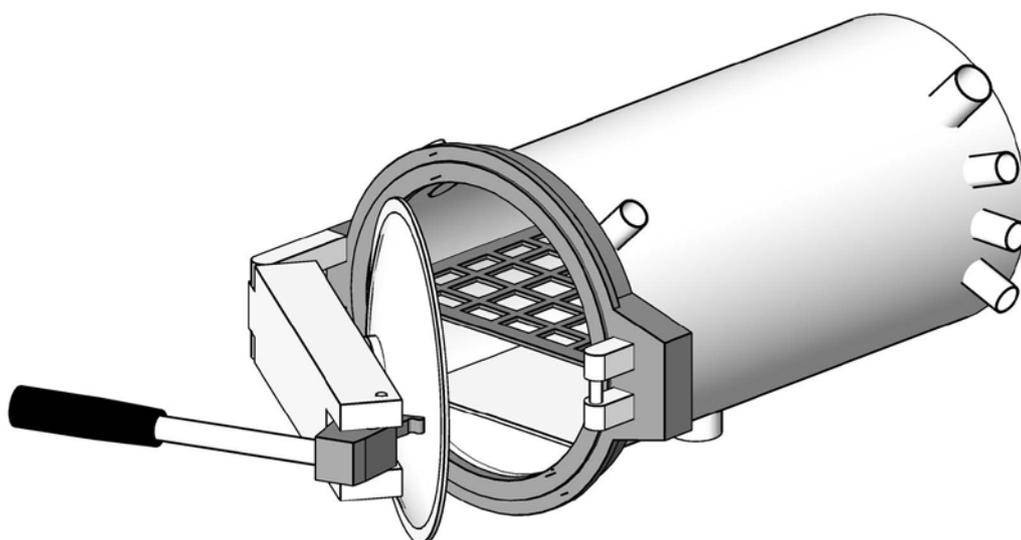


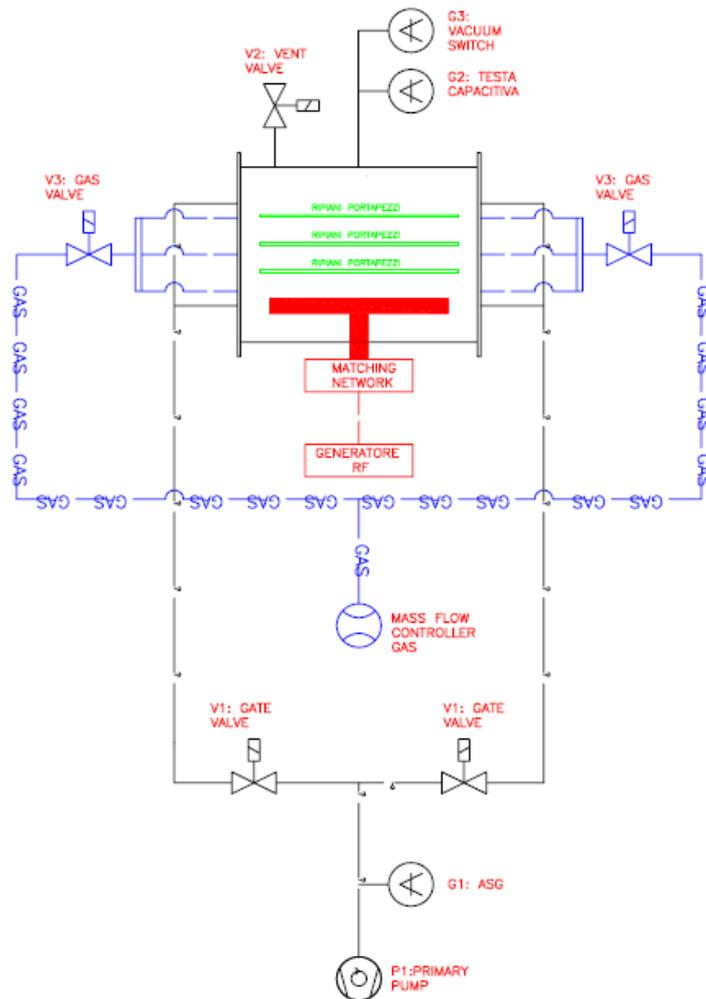
Figura 12 - Vista posteriore del reattore prototipale



**Figura 13 - Assonometria del reattore prototipale**



**Figura 14 - Rendering del reattore prototipale**

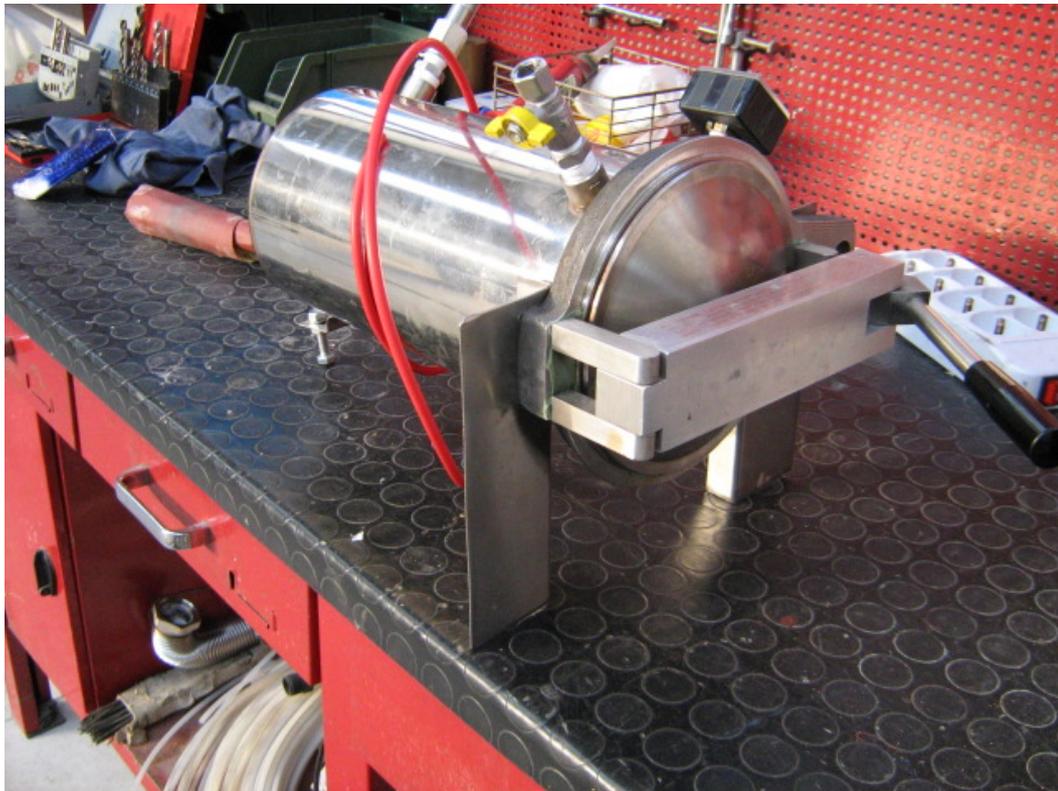


**Figura 15 - Schematizzazione del reattore prototipale**

Nella progettazione del reattore si è voluto seguire lo schema riportato nella Figura 15, in cui è prevista la possibilità di utilizzare più di una griglia per sostenere i pezzi da trattare ed è possibile introdurre i gas di scarica da due posizioni diametralmente opposte rispetto alla posizione dei pezzi.

All'interno della camera è stato realizzato, quindi, un cestello/griglia porta-pezzi rimovibile. La dimensione della maglia della griglia è stata determinata in modo tale da non interferire con il plasma ma, al tempo stesso, capace di sostenere anche oggetti abbastanza piccoli (dagli studi effettuati si è deciso di utilizzare maglie con dimensione 30x30 mm)

Nello schema riportato, che riguarda l'alimentazione dei gas ed il sistema di pompaggio, sono anche illustrate le posizioni e l'hardware necessario al loro funzionamento.



**Figura 16 - Foto del reattore prototipale**

Le attività di ricerca effettuate hanno permesso di affinare le conoscenze relative alla processo di sterilizzazione al plasma. Ciò ha portato alla possibilità di ulteriori sviluppi e miglioramenti, un esempio è quello di far realizzare la macchina da sterilizzazione non cilindrica ma di forma cubica o di parallelepipedo. Tale configurazione, infatti, consente di sfruttare meglio lo spazio a disposizione nella fase di caricamento degli oggetti da trattare ma, soprattutto, a parità di altre condizioni, ottimizza i tempi di raggiungimento della pressione di esercizio della camera.

Una successiva considerazione è relativa alla possibilità di utilizzare una finestra realizzata in quarzo al fine di “vedere” il plasma acceso. Questa condizione non è essenziale per il tecnico, in quanto la presenza o meno del plasma è determinabile dalla presenza dell’instaurarsi di un potenziale di elettrodo che può essere letto dai parametri di processo, ma, per i non addetti ai lavori, ci si è resi conto che vedere il plasma acceso semplifica le cose.

### 5.3. Controlli di sterilità

L'importanza della sicurezza dei processi di sterilizzazione è quanto mai grande.

I casi di infezioni accidentali in pazienti ospedalizzati sono un pericolo imminente di reali proporzioni e per evitarli è necessario che tutti i diversi materiali sottoposti ad un processo di sterilizzazione siano sterili e tali si mantengano per tutto il periodo del loro impiego.

È evidente che non basta controllare il timer e la strumentazione dello sterilizzatore, per avere prove sufficienti della validità del processo di sterilizzazione eseguito.

La valutazione dei processi di sterilizzazione riveste il significato di una prova tecnica.

I controlli di sterilità dei prodotti finiti, d'altro canto, presentano delle notevoli manchevolezze biologiche e Beck ne ha fornito la dimostrazione matematica.

Gli indicatori biologici sono in grado di assicurare, con forte probabilità, il raggiungimento delle condizioni di sterilizzazione di qualsiasi materiale, ma una serie di limitazioni pratiche e teoriche condizionano il loro impiego:

- Il tasso di mortalità di tutti gli indicatori biologici, segue una curva logaritmica per cui, in realtà, la loro distruzione non raggiunge mai lo zero.

Gli specialisti in materia adottano un punto, che chiamano valore D, in corrispondenza del quale viene ucciso il 90 per cento dei microrganismi.

Il valore D per il *Bac. Stearothermophilus* varia con il variare della temperatura: un secondo a 140°C e due minuti a 121°C. Per questa ragione molte autoclavi hanno cicli a valore di 6 D. Il numero delle spore deve essere controllato in modo che possa esserci sopravvivenza al valore 2 D, ma non a 6 D.

La determinazione di questo valore deve essere eseguita in perfette condizioni di temperatura di precisione e di controllo. Un errore di temperatura di 0,5°C, comporta la riduzione del 12 per cento del valore D.

- I conteggi su ogni striscia devono essere fatti con l'accuratezza necessaria alla definizione degli standard di lavoro, come ad es. tempo di sopravvivenza, a 121°C, 5 minuti; tempo di uccisione 15 minuti.
- Come attesta Pflug, un indicatore biologico, date le caratteristiche nella distribuzione della popolazione di spore, non può fornire elementi sicuri per decidere se accettare o respingere un prodotto; per avere una statistica attendibile sono necessarie molte strisce di spore.
- Il processo, condotto a mezzo di un indicatore biologico, richiede personale capace di operare secondo tecniche di asepsi.
- I prodotti devono rimanere in quarantena fino al termine del periodo di incubazione con l'implicazione di problemi logistici e di costi aggiuntivi.



**Figura 17 - Capsule per test di sterilizzazione**

Esistono altri prodotti simili a quelli su accennati che vengono utilizzati per temperature e processi di sterilizzazione diversi.

Ad essi vanno aggiunte le verifiche biologiche che vengono effettuate con spore racchiuse in contenitori certificati, che poi vengono portate in incubazione attraverso apparecchiature specifiche.

Il processo è simile a quello che si effettua per i prodotti sottoposti a sterilizzazione

con uso di vapore saturo, di cui ne diamo un accenno:

Uno dei più straordinari successi della moderna tecnologia è lo sviluppo del processo di sterilizzazione che assicura l'assenza di batteri viventi e spore nel materiale usato in interventi medici e chirurgici.

Il fallito esito di un processo di sterilizzazione espone il paziente a rischi di complicazioni settiche con conseguenza tragiche sia per la salute del paziente stesso che per la reputazione dell'ospedale.

Il metodo di sterilizzazione più largamente adottato negli ospedali è quello del vapore sotto pressione.

La semplice esposizione al vapore di strumenti, guanti, camici, ecc. non garantisce la loro sterilizzazione essendo necessario osservare attentamente i differenti parametri di tempo e temperatura.

Esiste una relazione tra tempo e temperatura di sterilizzazione che si esprime con la formula:

$$F_{0(121)} = F_{0(T)} 10^{\frac{T-121}{Z}}$$

Dove

- $F_{0(121)}$  tempo di letalità: è il tempo, rapportato a 121°C, necessario a garantire una perfetta sterilizzazione;
- $F_{0(T)}$  tempo di permanenza ad una data temperatura;
- $Z$  intervallo di temperatura necessario per aumentare di 10 volte la velocità di distruzione delle spore che, nel caso della sterilizzazione a vapore, assume il valore di 10.

La Tabella 5 mostra, qui sotto, le varie combinazioni tempo-temperatura che si richiedono per l'ottenimento dello stesso  $F_{0(121)}$ .

**Tabella 5 - Combinazioni tempo – temperatura.**

<b>Tempo minuti</b>	<b>Temperatura °C</b>	$F_{0(121)}$
200	111	20
20	121	
2	131	
0,2	141	
120	111	12
12	121	
1,2	131	
0,12	141	

La selezione dei parametri tempo e temperatura è stata fatta in modo da ottenere la distruzione totale delle spore più termoresistenti quali gangrene gassose e vari tipi di tetano e fornire, di conseguenza, un margine di sicurezza che garantisca statisticamente la inattivazione delle spore.

Tale principio statistico è di fondamentale importanza per capire i processi di sterilizzazione con vapore ed il loro controllo.

Indipendentemente dal metodo di sterilizzazione, la distruzione microbica è una funzione esponenziale. Usando valore saturo pressurizzato, una quantità fissa di un determinato microrganismo viene distrutta, ad un temperatura specifica, in un intervallo stabilito di tempo: ad esempio il 90 per cento delle spore di *Cl. Sporogenes*, viene distrutto, a 121°C, in 1 minuto.

Così, se la carica iniziale è di 1 milione di *Cl. Sporogenes*, 100.000 sopravvivranno a 1 minuto di esposizione al vapore a 121°C, 10.000 sopravvivranno a 2 minuti, 1.000 a 3 minuti, ecc.

Sebbene questa analisi statistica dimostri che dopo 7 minuti sopravvivrà soltanto una frazione di spora, calcolare le probabilità di sopravvivenza può rivestire tuttavia un interesse molto significativo.

In assoluto, la sopravvivenza di una frazione di spora, non ha alcuna importanza fisica, ma se il quantitativo iniziale microbico è di 1 milione di spore, la probabilità di avere una spora di *Cl. Sporogenes* che sopravviva dopo 12 minuti di esposizione al vapore di 121°C, è una su 1 milione.

Se tutti i miliardi o più di confezioni che vengono sterilizzate a vapore negli ospedali contenessero questo tipo e grado di contaminazione, circa 1.000 confezioni chirurgiche, dopo il ciclo a vapore di 12 minuti a 121°C, conterebbero spore vitali. Fortunatamente pochissime confezioni chirurgiche hanno così alti livelli di spore patogene; di conseguenza uno standard minimo di 12 minuti a 121°C, può ritenersi un ciclo accettabile.

Per la natura statistica del processo di sterilizzazione, aumentando il tempo del 50 per cento fino a 18 minuti, migliora il fattore di distruzione di 1 milione di volte. Molti autori ritengono che l'incremento di sicurezza che si ottiene con questo aumento, ampiamente compensi i costi addizionali dovuti al maggior tempo impiegato, alla maggior energia usata e ai possibili effetti negativi sul materiale da trattare.

Consigliamo quindi in ogni caso un ciclo di 18 minuti a 121°C.

Di uguale importanza del parametro "durata del ciclo" è il parametro "temperatura del vapore", dato che la temperatura ha un effetto significativo sul tasso di distruzione delle spore.

A 111°C ad esempio ci vogliono 10 minuti, anziché uno, per ridurre del 90 per cento il livello di *Cl. Sporogenes*.

Una diminuzione di 10°C riduce pertanto l'efficacia del processo di 10 volte.

Questo aumento così elevato nella distruzione cinetica non è un aspetto peculiare di

questa specie di spore, ma è una caratteristica comune delle spore termofile, sia patogene che non patogene.

Il coefficiente di temperatura per la distruzione delle spore è caratterizzato da un parametro, denominato "z", che è di circa 10°C per tutte le spore.

Al contrario, un aumento di 10°C della temperatura, accelera la maggior parte delle reazioni chimiche solo di 2 volte.

E' per questo alto coefficiente della temperatura di distruzione microbica che è possibile, nella sterilizzazione a vapore, ottenere, mediante aumento nominale delle temperature, una drastica riduzione dei tempi del processo.

Se invece la temperatura del processo è inferiore a quella stabilita anche solo di qualche grado, un numero sostanziale di microrganismi può sopravvivere.

Prendiamo in esame le conseguenze del mancato raggiungimento della temperatura prefissata durante un processo di sterilizzazione.

Se ad es. la temperatura viene stabilita sui 121°C, ma all'interno di una grossa confezione chirurgica si raggiungono solo i 111°C, sia per un errore dell'operatore che per un guasto dell'apparecchio, tenendo un ciclo di 18 minuti, la qualità di spore verrebbe ridotta intorno al 98 per cento.

Ciò potrebbe ingenerare una situazione potenzialmente pericolosa per il fatto che non si verrebbe a disporre di alcun margine di sicurezza.

La stessa osservazione vale per un procedimento a tempi più brevi a 132°C.

Ogni minuto a 132°C è pari a non meno di 10 minuti a 121°C e anche per un solo grado in meno della temperatura stabilita, l'efficacia del processo di sterilizzazione viene ridotta del 25 per cento.

È noto che la distruzione termica dei microrganismi, mediante il calore secco, richiede delle temperature più alte che con il vapore. Se dell'aria rimane intrappolata all'interno delle confezioni chirurgiche, il processo di sterilizzazione riesce meno efficace ed i tempi standard del ciclo appaiono troppo brevi per una

distruzione totale dei microrganismi.

La sterilizzazione con vapore è manifestamente sensibile alle variazioni di temperatura, tempo e natura del vapore.

Un adeguato controllo dei processi di sterilizzazione comporta la messa a punto di ognuno di questi parametri.

Fino ad ora questo controllo si basava esclusivamente sulla fiducia degli sterilizzatori ospedalieri i quali si servivano di spore non patogene tipo quelle del *Bac. stearothermophilus*.

Poiché le spore di *Bac. stearothermophilus* hanno un fattore "z" uguale a 10, esse possono simulare quelle patogene, nella misura in cui integrano l'esposizione tempo-temperatura.

Inoltre le spore del *Bac. stearothermophilus* sono tecnicamente più resistenti delle spore patogene: da ciò si può assumere che se nessuna spora di prova sopravvive al processo, altrettanto sarà sicuramente di quelle patogene.

Gli standard U.S.P. per il controllo delle sterilizzazioni a vapore mediante spore, dispongono che la sopravvivenza all'esposizione a 121°C sia di 5 minuti.

I prodotti possono raggiungere questo limite misurando la resistenza di ogni gruppo di spore a mezzo di un altro standard fisico e adeguando il numero su ogni striscia di prova.

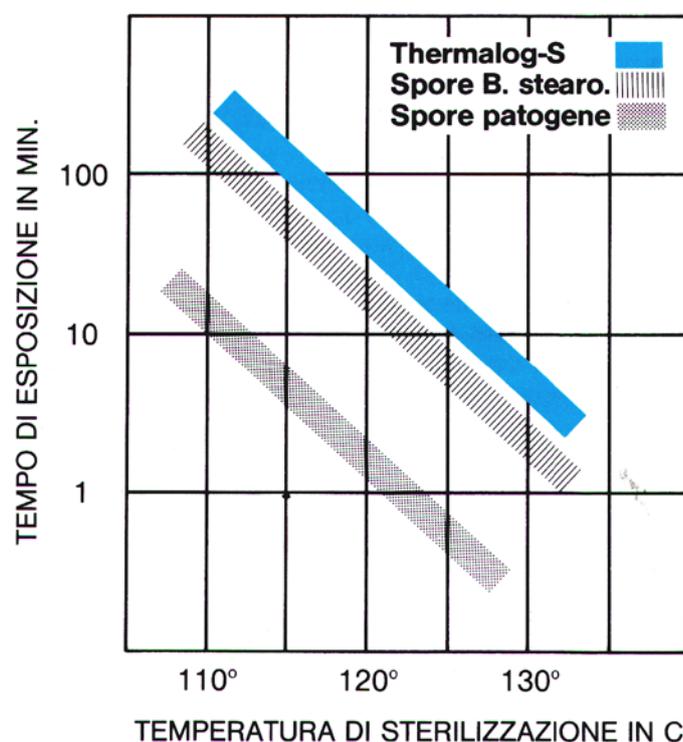
L'uso sistematico delle spore, che faccia capo ad un laboratorio centrale, non è pratico, dato il costo e le cure necessarie per le manualità asettiche nella coltivazione delle spore e in considerazione al periodo di quarantena che si richiede per la liberazione dei prodotti sterilizzati.

Anche questi indicatori biologici che offrono la convenienza di avere nello stesso contenitore sia le spore che il mezzo di cultura, hanno il difetto di fornire il risultato di una sterilizzazione dopo 2 o anche 3 giorni e sono troppo costosi per essere usati uno per confezione.

E' noto che ogni confezione chirurgica rappresenta un entità termica a sé stante che, quando viene collocata all'interno di un'autoclave, mostra, tra l'esterno e l'interno, condizioni di temperatura differenti.

Il miglior controllo di qualità deve verificare le condizioni termiche raggiunte nel punto più freddo di ogni confezione.

### TEST DI LETALITÀ



**Si evidenzia che il diagramma del Thermalog-S è costantemente al di sopra di quelli delle spore considerate.**

**Figura 18 - Diagramma di letalità in funzione della temperatura - Tempo di esposizione**

Esistono altri prodotti che possono essere utilizzati e che possono dare indicazioni precise, tipo Thermalog-S (di cui abbiamo dato un diagramma in precedenza) o altro di cui ne diamo un'acceso:

Le risposte fornite dal Thermalog-S sono istantanee e di facile lettura; inoltre possono essere conservate per le registrazioni dei cicli.

A differenza delle spore, è possibile apprezzare e misurare una sovrasterilizzazione e quindi un super riscaldamento: ciò potrebbe tradursi in notevole risparmio di energia e potrebbe consentire maggior durata di quei materiali che attualmente subiscono sovratrattamenti.

Quando il Thermalog-S viene usato all'interno di una confezione chirurgica, le risposte sono relative alle dimensioni del pacco, allo spessore, orientamento e locazione nello sterilizzatore e, la raccolta continua di questi dati, consente l'adozione di quelle tecniche ottimali che si richiedono per un adeguato margine di sicurezza con un minimo di energia.

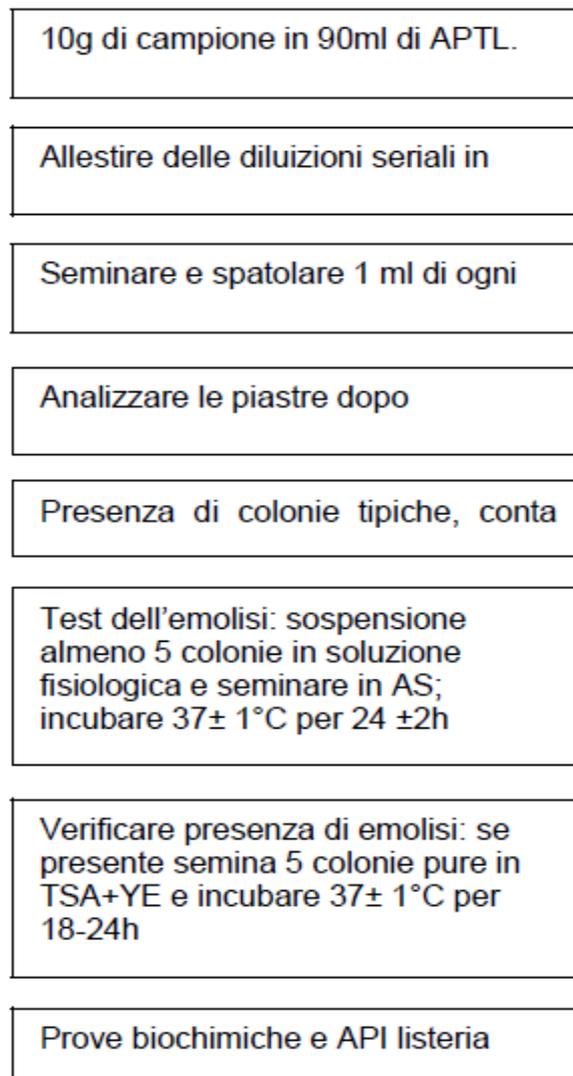
Nota: Gli stessi diagrammi possono essere sviluppati con processi di sterilizzazione non a vapore saturo ma con un altro processo (tipo plasma, raggi gamma, ecc.).

È importante che le spore, all'interno di questi indicatori, seguano nella loro letalità, funzioni logaritmiche, in modo da poter legare tempo e temperatura con algoritmi matematici di semplice interpretazione.

### 5.3.1. *Listeria monocytogenes*

Il metodo di analisi dei risultati ottenuti è stato quello definito "in sospensione" utilizzando la *Listeria monocytogenes*. Le analisi microbiologiche sono state condotte in un laboratorio esterno certificato utilizzando i metodi di prova previsti dal regolamento CE n. 2073/2005. La numerazione di *Listeria monocytogenes* è stata eseguita secondo procedura trascritta dall'elaborazione della seguente norma: ISO 11290-2 (2007).

Il seguente diagramma, Figura 19 sintetizza la procedura applicata derivata dalla norma sopra citata:



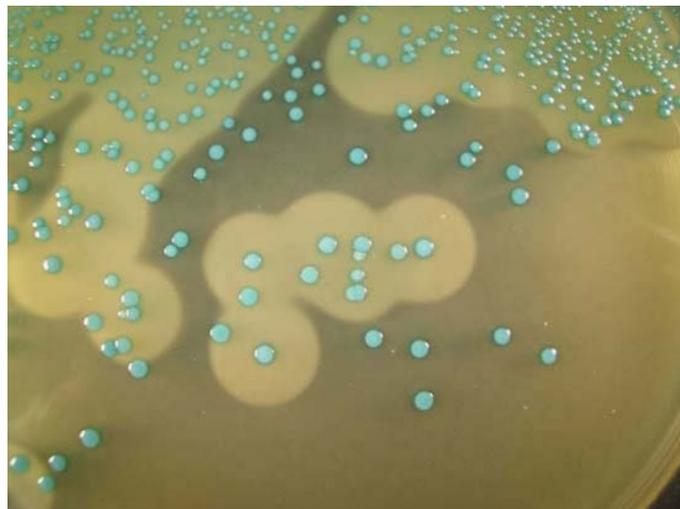
**Figura 19 - Procedura applicata per la determinazione numerazione di *Listeria monocytogenes***

L'analisi è basata sul rilevamento di colonie caratteristiche in piastra a 37 ° C.

- Preparare la sospensione iniziale omogeneizzando 10 g di alimento in 90 ml di Acqua Peptonata Tamponata per *Listeria* (APTL, MERCK). Lasciare la sospensione iniziale per 1 h ± 5' a 20 ± 2°C per rivitalizzare i microrganismi stressati. Dal campione omogenato con APTL, allestire le successive diluizioni (al massimo arrivare alla diluizione 10<sup>-3</sup>), mediante l'uso di Soluzione Triptone (ST, LABM).
- Predisporre sul banco di lavoro due piastre di AGAR LISTERIA ACC. TO OTTAVIANI & AGOSTI (ALOA, BIOLIFE,) per ciascuna delle diluizioni da seminare. Utilizzando una pipetta sterile, versare nel centro di ciascuna piastra di terreno 0,1 ml della

sospensione iniziale. Distribuire uniformemente per spatolamento senza toccare i bordi della piastra, utilizzando una spatola sterile per ciascuna diluizione. Come previsto dal regolamento (CE) 2073/2005, quando è necessario stimare bassi valori di *Listeria monocytogenes*, il limite di numerazione può essere abbassato di un fattore 10 esaminando 1 ml della sospensione iniziale. In tal caso, distribuire con la spatola 1 ml di inoculo suddiviso (0,3 + 0,3 + 0,4 ml) sulla superficie di tre piastre di ALOA da 90 mm di diametro. Incubare le piastre di ALOA in posizione capovolta, in pile di massimo sei piastre, distanti tra loro almeno 25 mm, a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $24 \pm 3$  h o ulteriori  $24 \pm 3$  h.

Le colonie sospette appaiono di colore verde-azzurro, circondate da un alone opaco. Contare tutte le colonie caratteristiche di inoculo suddiviso (0,3 + 0,3 + 0,4ml) sulla superficie di tre piastre di ALOA da 90 mm di diametro. Incubare le piastre di ALOA in posizione capovolta, in pile di massimo sei piastre, distanti tra loro almeno 25 mm, a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $24 \pm 3$  h o ulteriori  $24 \pm 3$  h. Le colonie sospette appaiono di colore verde-azzurro, circondate da un alone opaco (Figura 20). Contare tutte le colonie caratteristiche.



**Figura 20 - Colonie di *L.monocytogenes* (verde-blu con alone opaco) e *L.innocua* (colonie verde-blu) senza alone su ALOA.**

## 5.4. Spettroscopia di Impedenza Elettrochimica

### 5.4.1. Teoria delle misure

L'uso della spettroscopia di impedenza (IS) si è sviluppato rapidamente in numerosi campi di ricerca, in virtù della disponibilità di una vasta gamma di strumentazione ad elevate performance e bassi prezzi di acquisto. Inizialmente questa tecnica è stata impiegata per l'analisi di reti elettriche, ma in seguito si è sviluppata come metodo di indagine per lo studio delle proprietà elettriche dei materiali. Applicazioni tipiche sono lo studio delle batterie e sorgenti di energia elettrica, elettrodeposizione di metalli, proprietà elettriche di polimeri, passività di metalli, studi di corrosione. Di seguito sono illustrati i principi di base su cui è fondata la IS.

Un sistema in stato stazionario sottoposto ad una perturbazione esterna  $x(t)$  reagisce con una risposta caratteristica  $y(t)$ , e nel caso più generale la relazione tra perturbazione e risposta può essere scritta:

$$f(x(t), x'(t), x''(t), \dots) = g(y(t), y'(t), y''(t), \dots) \quad (\text{A.1})$$

$x(t)$  può essere un campo magnetico, un campo di deformazione, un campo elettrico, mentre la risposta caratteristica  $y(t)$  può essere rispettivamente il campo di induzione che viene a crearsi nel sistema, gli stati tensionali che ivi si generano, o l'intensità di corrente che lo percorre. Nei metodi di indagine basati sull'analisi di risposte in frequenza lo stimolo  $x(t)$  è di tipo sinusoidale.

Nella spettroscopia di impedenza la perturbazione sinusoidale è di natura elettrica e le analisi sono effettuate sulla relazione tra tensione e corrente. Esistono due distinte tecniche di spettroscopia di impedenza. La tecnica galvanostatica, in cui viene imposta una corrente sinusoidale (perturbazione) e misurata la tensione indotta

(risposta), e la tecnica potenziostatica, in cui è una tensione sinusoidale ad essere utilizzata come perturbazione mentre la corrente indotta viene rilevata come risposta. Salvo casi specifici, la tecnica potenziostatica è quella maggiormente impiegata per le indagini di corrosione. Tale tecnica è stata utilizzata in questo lavoro e ad essa si farà riferimento nel seguito della tesi.

Se la relazione tra tensione imposta,  $v(t)$ , e la corrente indotta,  $i(t)$ , può essere descritta mediante un'equazione differenziale lineare, del tipo

$$a_0 x(t) + a_1 \frac{dx(t)}{dt} + a_2 \frac{d^2 x(t)}{dt^2} + \dots = b_0 y(t) + b_1 \frac{dy(t)}{dt} + b_2 \frac{d^2 y(t)}{dt^2} + \dots \quad (\text{A.2})$$

allora il sistema in esame si dice lineare. In questo caso alla sinusoide di potenziale,  $v(t) = v^{\circ} \sin(\omega t)$ , corrisponde una corrente,  $i(t) = i^{\circ} \sin(\omega t + \phi)$ , di eguale pulsazione  $\omega$ , e sfasata di un angolo  $\phi$ . Pertanto, si possono impiegare le trasformate di Laplace per risolvere la (A.2). In particolare se la relazione corrente tensione contempla solo derivate del primo ordine il sistema può essere descritto mediante la seguente legge di ohm generalizzata:

$$\underline{V}(\omega) = \underline{Z}(\omega) * \underline{I}(\omega) \quad (\text{A.3})$$

dove le grandezze sono riportate sotto forma di numeri complessi. La funzione di trasferimento  $Z$  si definisce impedenza e rappresenta dunque il rapporto tra la tensione applicata al sistema e l'intensità di corrente generata. Tale funzione varia al variare della frequenza dello stimolo sinusoidale e le sue variazioni forniscono informazioni sui meccanismi di conduzione elettrica (ed elettrochimica) del sistema oggetto di studio. La spettroscopia di impedenza fa dunque un'analisi delle variazioni dell'impedenza al variare della frequenza dello stimolo ed interpreta tali analisi alla

luce di meccanismi chimico-fisici. La rappresentazione della funzione  $\underline{Z}(\omega)$  in un certo *range* di frequenza si definisce spettro di impedenza e risulta l'impronta del sistema in esame.

In un sistema elettrochimico la relazione tra tensione ed intensità di corrente è generalmente fortemente non lineare. Tale non linearità appare già nelle misure in corrente continua. Infatti, per un elettrodo la relazione tra tensione statica imposta e corrente indotta segue, nei casi più semplici, la legge di Butler-Volmer e mostra una curva caratteristica fortemente non lineare, come si può osservare in Figura 21. Nella pratica sperimentale è comunque consueto incontrare curve tensione/corrente più complesse. Ad esempio la curva caratteristica dell'alluminio presenta zone di attività, passività e transpassività e dunque zone di forte non linearità.

Per riportare l'analisi dei sistemi elettrochimici al semplice caso lineare, si impiegano perturbazioni di ampiezza sufficientemente piccola da poter linearizzare la relazione stimolo corrente nell'intorno dello stimolo. Infatti si può dimostrare che per sinusoidi di potenziali di ampiezza minore del voltaggio termico,  $V_t = kT/e$  (circa 25 mV a 25°C), le equazioni di base che governano la risposta di un sistema elettrochimico sono lineari con un eccellente approssimazione.

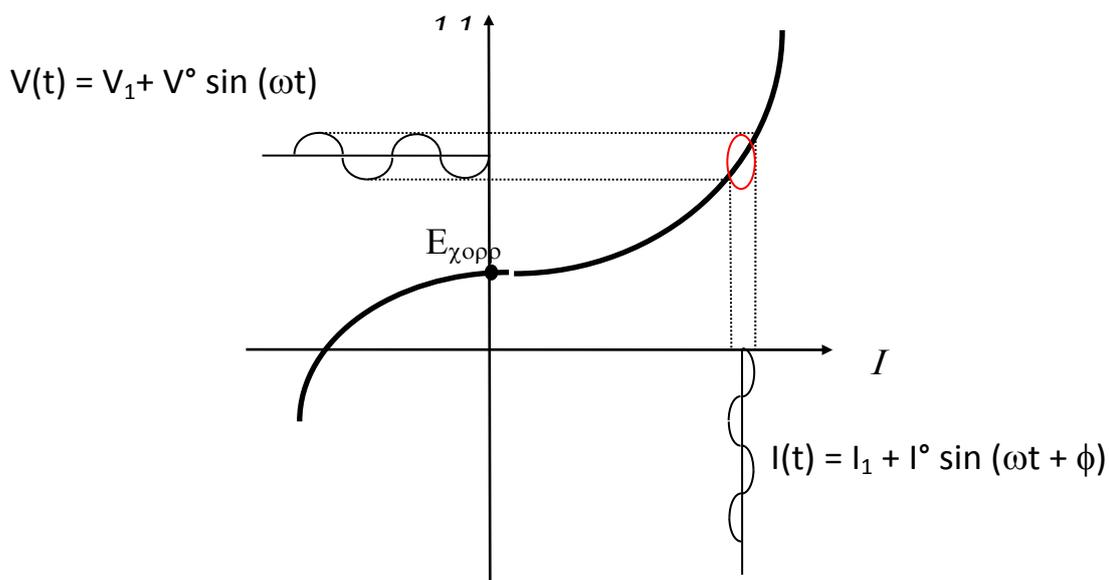


Figura 21 - Approssimazione lineare per piccole perturbazioni

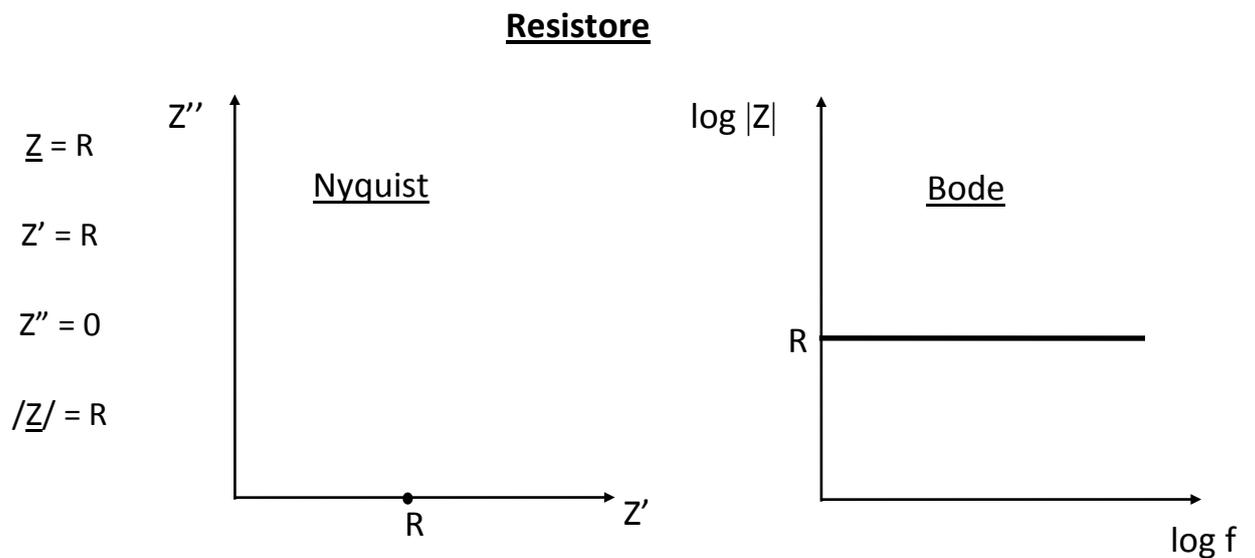
Recentemente, Milocco ha sviluppato un metodo per l'analisi di dati di impedenza elettrochimica anche in condizioni non lineari, basato sulla discretizzazione del dominio temporale ed un algoritmo ai minimi quadrati ricorsivo. Con tale tecnica, ancora in fase di sviluppo, si possono utilizzare anche perturbazioni di ampiezza più elevata rispetto alla tecnica EIS convenzionale, con un notevole miglioramento dei dati sperimentali.

L'impedenza può essere rappresentata graficamente come vettore su un piano di Argand, in base alle sue componenti reali ed immaginarie, come riportato nell'equazione (A.4). Nella convenzione elettrochimica il vettore viene rappresentato mediante la parte reale (o resistiva),  $Z' = \text{Re}(\underline{Z})$ , e l'opposto della parte immaginaria,  $Z'' = -\text{Im}(\underline{Z})$ , come riportato di seguito:

$$\underline{Z}(\omega) = Z' - jZ'' \quad (\text{A.4})$$

il cambiamento di segno viene adottato per semplificare la rappresentazione nel piano complesso, in quanto nei sistemi elettrochimici sono frequenti elementi di tipo capacitivo (parte immaginaria negativa). La rappresentazione nel piano di Argand del vettore impedenza al variare della frequenza dello stimolo è denominato diagramma di Nyquist. Una seconda rappresentazione prevede l'impiego di due diagrammi uno riporta il logaritmo del modulo dell'impedenza in funzione del logaritmo della frequenza e l'altro che riporta l'angolo di sfasamento in funzione del logaritmo della frequenza.

Nelle Figura 22 e Figura 23 vengono riportati i diagrammi di Nyquist e Bode per una resistenza, un condensatore ed un RC parallelo, al fine di aiutare l'interpretazione dei dati sperimentali.



**Figura 22 - Diagrammi di Nyquist e Bode per un resistore**

### Capacitore

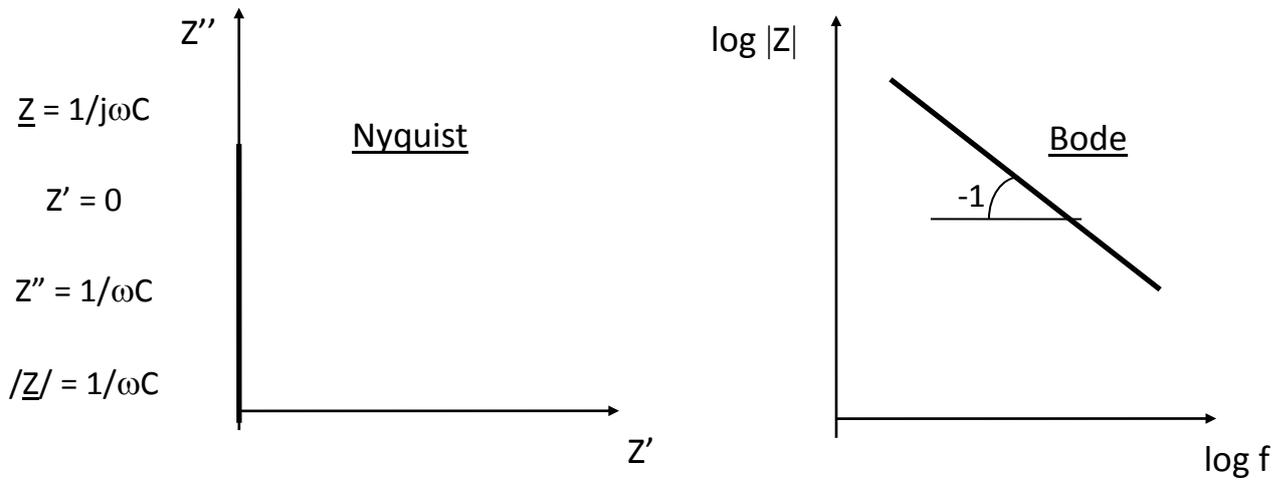


Figura 23 - Diagrammi di Nyquist e Bode per un condensatore

### RC parallelo

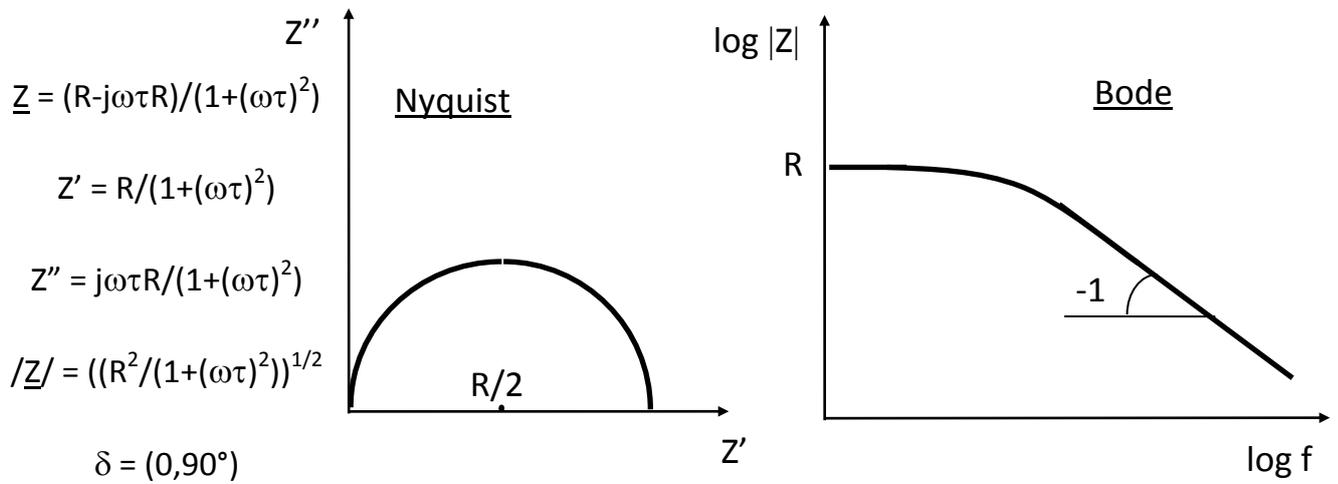


Figura 24 - Diagrammi di Nyquist e Bode per un RC parallelo

La versatilità della spettroscopia di impedenza nell'interpretazione dei fenomeni di natura elettrica è in larga parte dovuta all'utilizzo di circuiti ideali equivalenti al sistema in esame. Due sistemi A e B si dicono avere impedenze equivalenti in un certo *range* di frequenze quando in tale *range* di frequenze presentano spettri di impedenza uguali, ossia:

$$A \text{ equivalente } B \text{ in } [f_1, f_2] \Leftrightarrow Z_A(f) = Z_B(f) \quad \forall f \in [f_1, f_2] \quad (\text{A.5})$$

In analogia una rete di dipoli ideali è equivalente ad un dato sistema fisico quando presenta uno spettro di impedenza uguale al sistema reale considerato nel *range* di frequenze indagato. Tale rete di dipoli si dice **circuito equivalente** (CE). I sistemi elettrochimici possono essere descritti mediante dipoli più o meno semplici. I più comuni dipoli impiegati per questo scopo sono riportati in Tabella 6. Per un approfondimento sul loro significato fisico si rimanda alla letteratura specifica.

**Tabella 6 - Elementi circuitali comunemente impiegati nella spettroscopia di impedenza elettrochimica**

Elemento	Simbolo	Impedenza
Resistenza	R	R
Capacità	C	$-j/\omega C$
Induttanza	L	$j\omega L$
Warburg	W	$1/\sigma\sqrt{j2\omega}$
CPE	Q	$A(j\omega)^n$

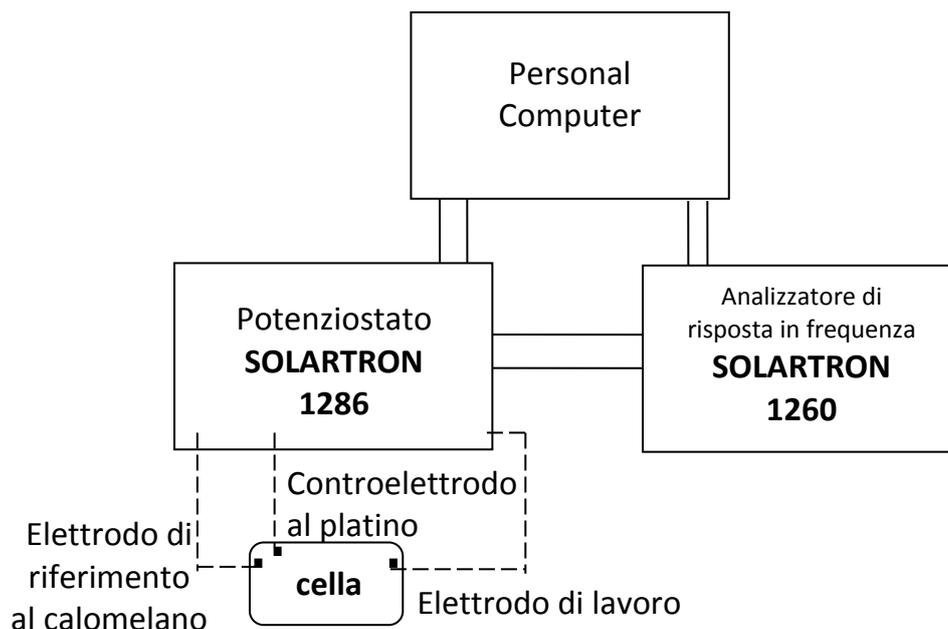
$\sigma$  = Coeff. di Warburg

Il fitting dei dati sperimentali all'impedenza del circuito equivalente scelto si può effettuare mediante un software appositamente sviluppato da Boukamp, che applica un algoritmo ai minimi quadrati non lineari. L'uso di tale software ha prodotto due differenti approcci all'interpretazione dei dati di impedenza. Un approccio fondamentale, in cui il circuito equivalente è scelto mediante considerazioni di carattere fisico, sulla base di meccanismi elettrochimici noti. Ed un approccio fenomenologico, in cui il circuito è scelto in base alla sua capacità di fittare

adeguatamente i dati sperimentali. Il primo approccio è sicuramente più potente in quanto permette di individuare le variazioni di ben precisi parametri elettrochimici durante il processo di degradazione. La scelta del circuito è però estremamente complessa e risulta impossibile in quei casi in cui i meccanismi elettrochimici non sono noti. Il secondo approccio non riesce a dare informazioni sugli aspetti intrinseci dei fenomeni elettrochimici, però è in grado di fornire un circuito equivalente anche in quei casi in cui il meccanismo elettrochimico non è noto. Tale circuito equivalente risulta comunque un utile strumento di previsione dell'andamento fenomenologico del processo di degradazione. Obiezioni sull'utilità dell'approccio fenomenologico nascono dalla possibilità di assegnare più di un circuito equivalente per un set di dati sperimentali. Bisogna osservare però che la condizione di equivalenza non è sufficiente ad identificare univocamente il sistema elettrico da accoppiare al sistema reale, perché circuiti diversi possono dare origine a spettri uguali. Pertanto per una corretta modellazione mediante circuiti equivalenti sembra essere necessaria una preliminare corretta interpretazione dei fenomeni fisici che caratterizzano il sistema fisico ed a posteriori individuare il corrispondente fisico di ognuno dei singoli dipoli impiegati. L'uso improprio dell'approccio fenomenologico è attualmente al centro di un fervente dibattito nella comunità scientifica dell'EIS.

#### 5.4.2. Apparecchiature e celle di misura

Le misure EIS sono state realizzate utilizzando un *Frequency Response Analyser* (F.R.A.) della solartron modello 1260 in combinazione con un potenziostato Solartron 1260. Le due macchine sono interfacciate ad un Personal Computer per mezzo di una scheda di acquisizione dati GPIB (General Purpose Interface Bus) e pilotate mediante opportuni software di acquisizione (Z-Polt) ed elaborazione dati (Kaleidagraph), come riportato nello schema di figura A.5.



**Figura 25 - Schema di funzionamento delle apparecchiature per le misure di EIS; il collegamento tra il potenziostato e la cella raffigurato è quello previsto per una misura EIS a tre elettrodi**

#### 5.4.3. Misure EIS a tre elettrodi

Per le misure EIS a tre elettrodi è stata utilizzata una cella elettrochimica costituita da un cilindro cavo di vetro fissato alla superficie del campione mediante una pinza; il raggio del cilindro è pari ad 1,5 cm e la superficie del sistema duplex esposta alla soluzione vale dunque  $7,07 \text{ cm}^2$ ; le perdite di soluzione dalla base della cella si evitano con l'uso di una guarnizione in gomma dura.

Le misure EIS nella configurazione a tre elettrodi prevedono

- i) un primo elettrodo, costituito dall'acciaio zincato verniciato, che rappresenta il cosiddetto elettrodo di lavoro;
- ii) il controelettrodo, costituito dall'elettrodo di platino, che non partecipa alle reazioni che avvengono nel sistema in quanto inerte (esso rappresenta l'interfaccia attraverso la quale viene inviato il segnale in tensione al sistema da analizzare);

- iii) ed infine l'elettrodo di riferimento, costituito da un elettrodo a calomelano, che è l'elettrodo rispetto a cui viene misurato il potenziale del sistema duplex in esame.

Le prove di *sweep* di impedenza sono state condotte imponendo una tensione tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento pari al potenziale di equilibrio del sistema (cella elettrochimica)-sistema duplex a circuito aperto (*Open Circuit Potential, ocp*). Il campo di frequenze indagato va da 0.02 a 100000 Hz. Le misure di impedenza sono state condotte a temperatura ambiente utilizzando una soluzione acquosa al 3,5% in peso di NaCl.



Figura 26 - Strumentazione utilizzata per test elettrochimici

## 5.5. Analisi dell'energia superficiale

Per il calcolo dell'energia superficiale si è usato il metodo di OWRK.

In questo metodo, la tensione superficiale di ciascuna fase può essere suddivisa in una frazione polare ed una frazione dispersiva:

$$\sigma_l = \sigma_l^P + \sigma_l^D$$

$$\sigma_s = \sigma_s^P + \sigma_s^D$$

In tal modo l'energia superficiale del liquido è facilmente ricavabile in quanto data dalla somma dell'aliquota dispersiva e polare propria del liquido stesso e dunque tabellata in letteratura al variare della temperatura di utilizzo; l'energia superficiale totale del solido si calcola invece in un unico step.

Infatti trovando per l'energia superficiale solido-liquido l'espressione:

$$\gamma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l - 2 \left( \sqrt{\sigma_s^D * \sigma_l^D} + \sqrt{\sigma_s^P * \sigma_l^P} \right)$$

e ricordando l'equazione di Young:

$$\sigma_s = \gamma_{sl} + \sigma_l \cos \theta$$

Combinandole e mettendole sotto la forma dell'equazione della retta in forma esplicita ( $y = mx + q$ ) si ha:

$$\frac{(1 + \cos \theta)\sigma_l}{2\sqrt{\sigma_l^D}} = \sqrt{\sigma_s^P} \sqrt{\frac{\sigma_l^P}{\sigma_l^D}} + \sqrt{\sigma_s^D}$$

Effettuando una regressione lineare del grafico di X contro Y,  $\sigma_s^P$  si ottiene dalla radice della pendenza della curva m e  $\sigma_s^D$  dalla radice dell'intercetta b.

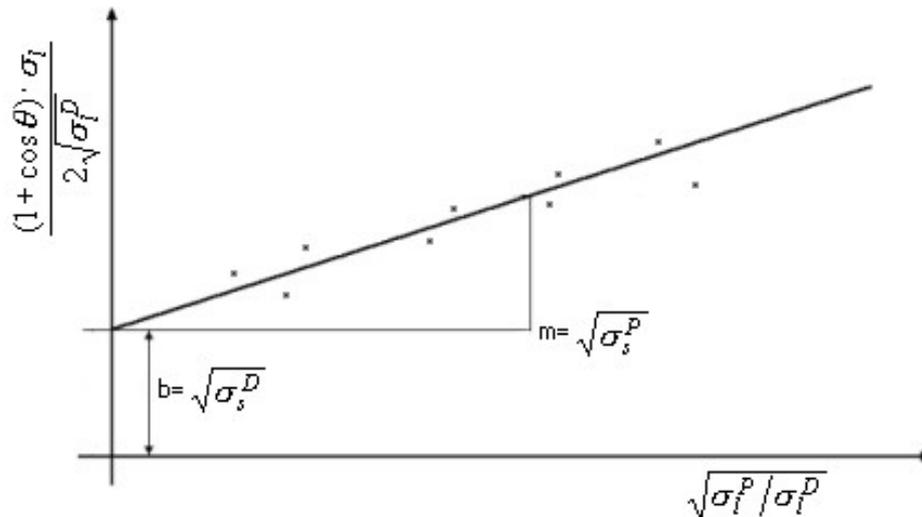


Figura 27 - Calcolo della frazione polare e dispersa delle tensione superficiale di un solido.

Questo metodo è sufficientemente semplice e preciso da essere usato per le misure in laboratorio.

#### 5.5.1. Procedura sperimentale

Le prove sono state effettuate utilizzando per la misura degli angoli di contatto un *Contact Angle Analyzer* modello CAA3 realizzato da *electric time co.inc.* per *Imass*.

Su ogni provino si sono valutate 3 gocce il cui angolo di contatto è stato misurato col metodo della tangente dopo un tempo di osservazione di 30 secondi, ogni misurazione è stata ripetuta su tre provini differenti al fine di minimizzare le influenze dovute a sporco o variabilità della misurazione.

I liquidi utilizzati nei test sono stati: acqua (H<sub>2</sub>O) demineralizzata (liquido polare) e di iodometano (CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub>) (liquido non polare).

Dalla somma dell'energia della fase dispersa e della fase polare si ottiene l'energia superficiale totale dei campioni.

## 6. Risultati Sperimentali

### 6.1. Energia superficiale

In questo paragrafo sono riportati i risultati relativi alla valutazione della bagnabilità all'acqua dei lamierini in lega di titanio commercialmente puro (CP) grado 1, 2 e 4, lega di titanio alluminio e vanadio ( $Ti_6Al_4V$ ), acciaio inox 316, trattati al plasma freddo.

Le prove sperimentali sono state effettuate utilizzando il metodo della goccia in condizioni statiche.

Le condizioni sperimentale utilizzate sono state finalizzate a:

- ossidare la superficie e rimuovere i contaminanti per via chimica,
- innestare nuovi gruppi funzionali,
- rimuovere i contaminanti per via fisica ed attivare la superficie,
- ottenere un effetto combinato dei precedenti fenomeni.

Per raggiungere tali scopi sono stati effettuati trattamenti in atmosfere di  $O_2$ ,  $NH_3$ , Ar ed una miscela di  $NH_3$  ed Ar. I parametri esterni del plasma, utilizzati nei trattamenti, sono riportati nella Tabella 7.

Tabella 7 - Codici per la descrizione dei parametri diprocesso

Codice	Gas	Press. (mTorr)	Potenza (watt)	Tempo (s)
NHAr	$NH_3$ -Ar	100	200	30
NH3	$NH_3$	20	100	3
NH180	$NH_3$	20	200	180
O3	$O_2$	20	100	3
O30	$O_2$	20	150	30
O180	$O_2$	20	100	180
Ar30	Ar	20	200	30

I trattamenti al plasma effettuati sulle leghe indicate sono riportati nella Tabella 8.

**Tabella 8 - Trattamenti effettuati sulle leghe**

<b>Lega</b>	<b>NHAr</b>	<b>O30</b>	<b>NH180</b>	<b>NH3</b>	<b>O3</b>	<b>O180</b>	<b>Ar30</b>
Ti CP gr 1							
Ti CP gr 2							
Ti CP gr 4							
Ti6Al4V							
AISI 316							

I valori dell'angolo di contatto, relativi ai campioni non trattati, variano nel range 70-90°. In particolare il valore relativo alla lega acciaio è di 71°. Questo effetto è da ascrivere alla presenza di composti idrocarburici sulla superficie e può essere legato a differenti condizioni di laminazione o di conservazione del materiale. Tuttavia, indipendentemente dalle condizioni iniziali, i trattamenti al plasma freddo effettuati hanno diminuito in maniera drastica il valore dell'angolo di contatto. Nel caso dei trattamenti effettuati in plasmi di O<sub>2</sub>, il valore dell'angolo di contatto varia nel range 20-30°, ciò è giustificato dall'energica azione ossidante delle specie chimiche presenti nella fase plasma che rimuove i composti organici presenti in superficie e quindi ossida parzialmente la superficie stessa.

In seguito all'invecchiamento del trattamento e, quindi, all'interazione del provino con l'ambiente si ha una riorganizzazione delle specie chimiche in superficie ed una interazione con l'ambiente esterno, con conseguente diminuzione dell'angolo di contatto, il quale, tipicamente, dopo 7 giorni, raggiunge un valore posto nel range 40-50°, i valori relativi al trattamento O30 sono da considerarsi anomali e dovuti a cattiva conservazione dei provini.

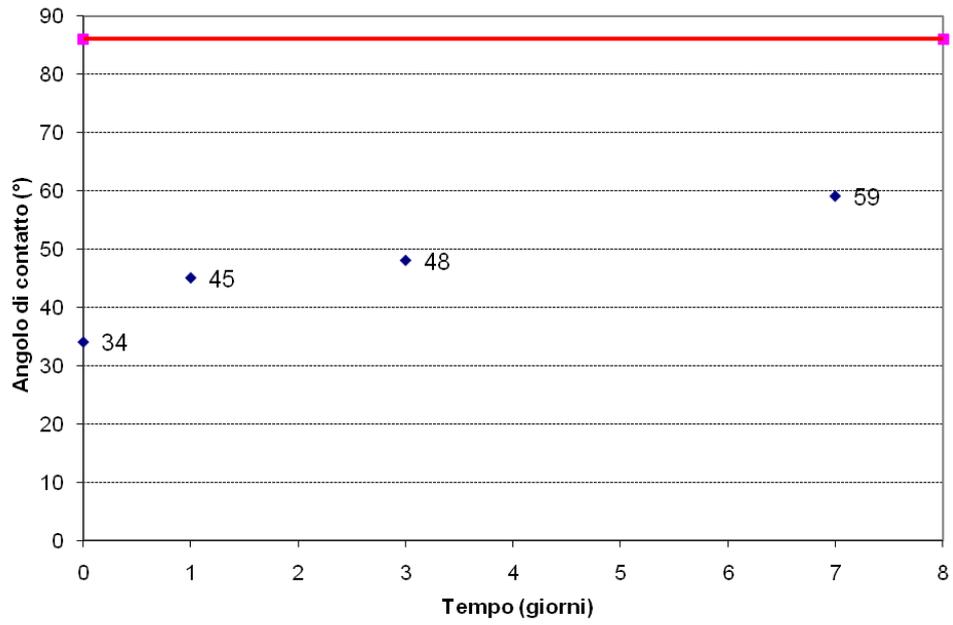


Figura 28 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti CP gr 1, trattamento NHAr

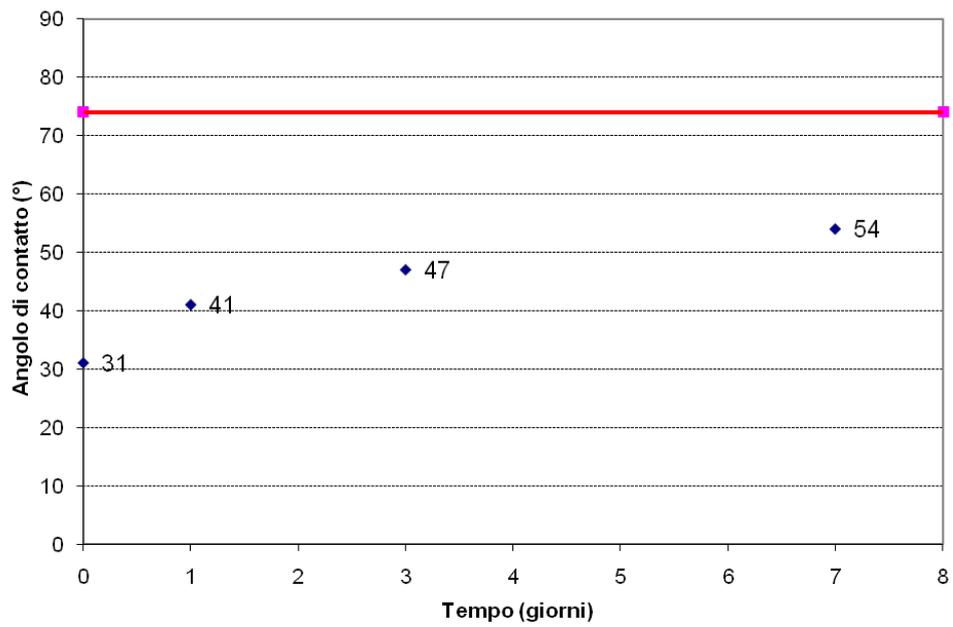


Figura 29 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti CP gr 2, trattamento NHAr

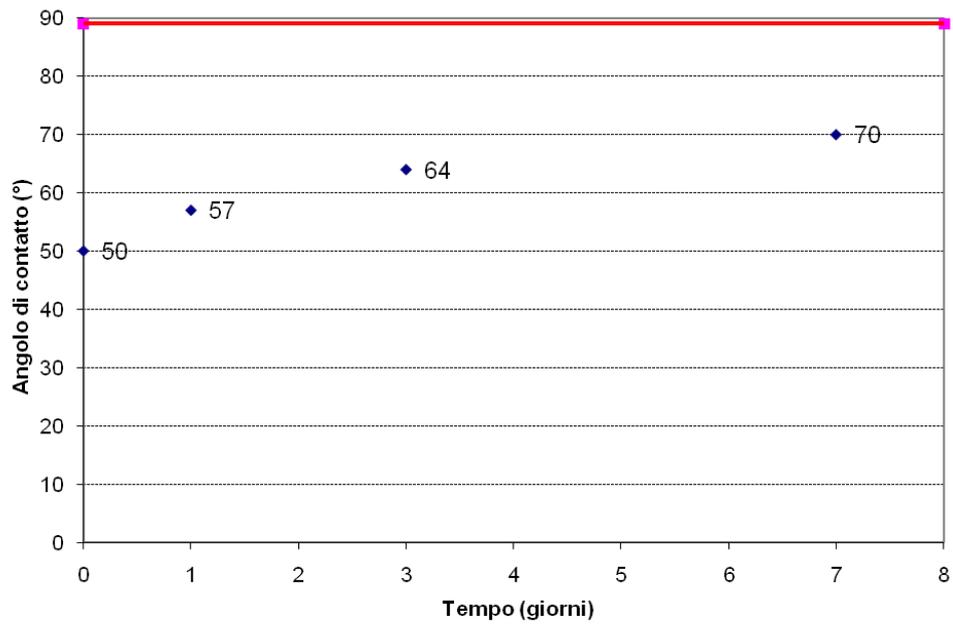


Figura 30 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti CP gr4, trattamento NHAr

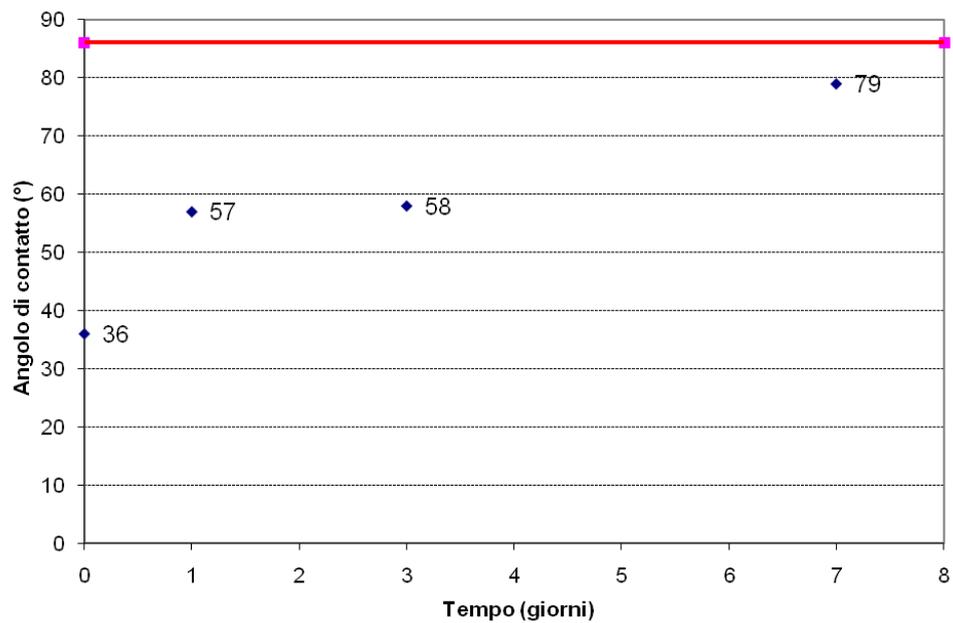
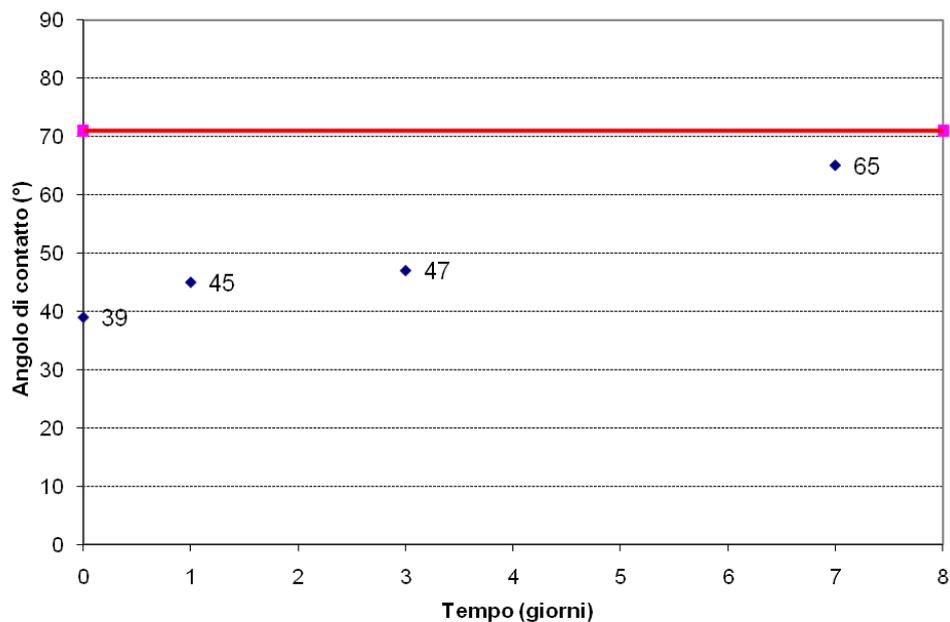
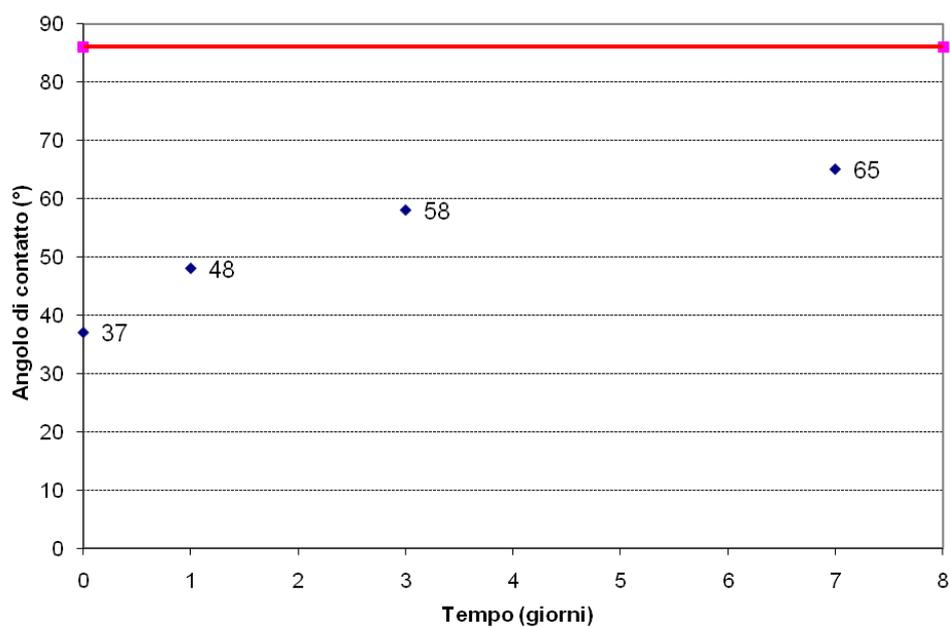


Figura 31 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti6Al4V, trattamento NHAr



**Figura 32 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento acciaio AISI 316, trattamento NHAr**



**Figura 33 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti CP gr 1, trattamento O30**

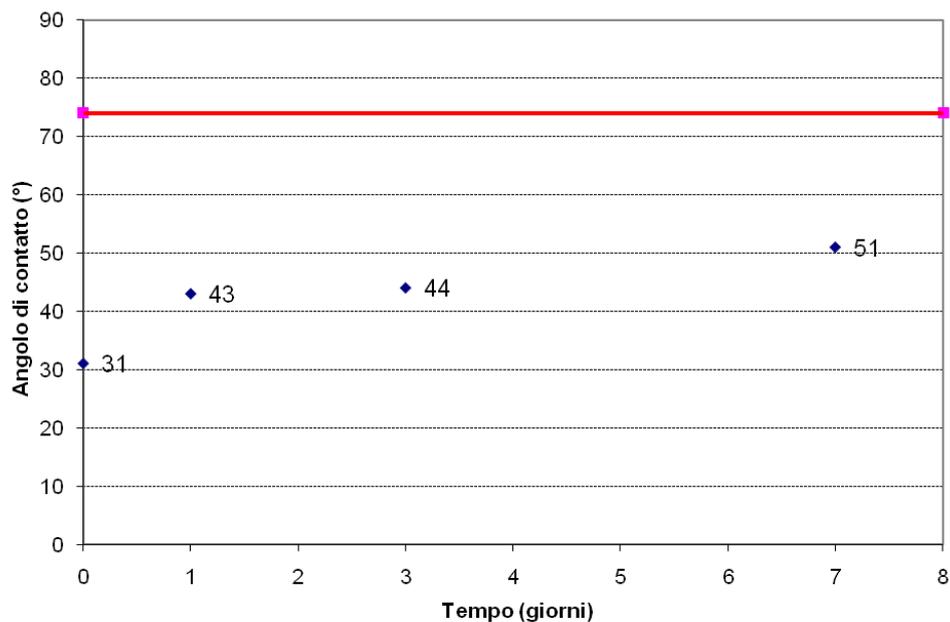


Figura 34 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti CP gr 2, trattamento O30

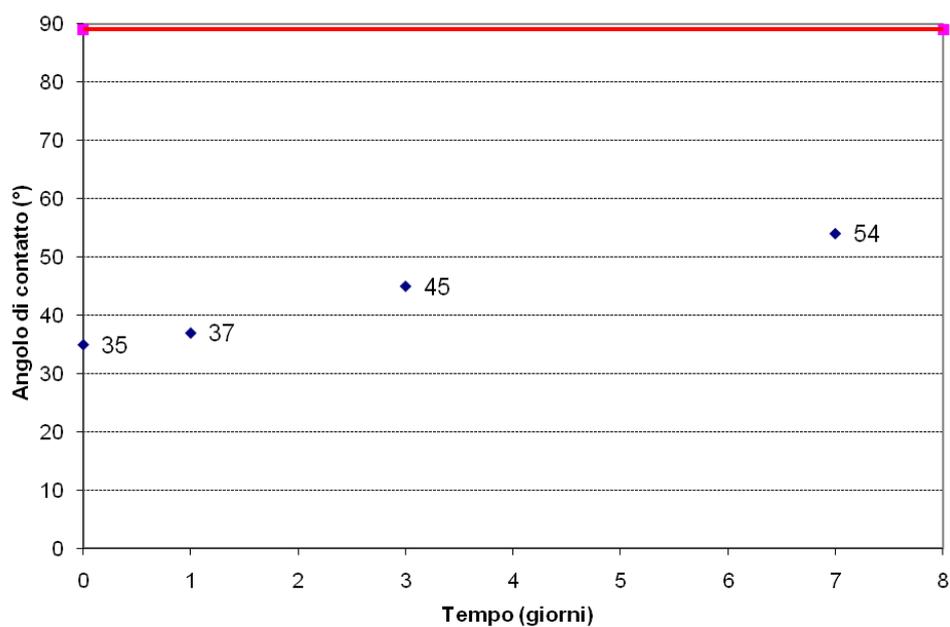


Figura 35 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti CP gr 4, trattamento O30

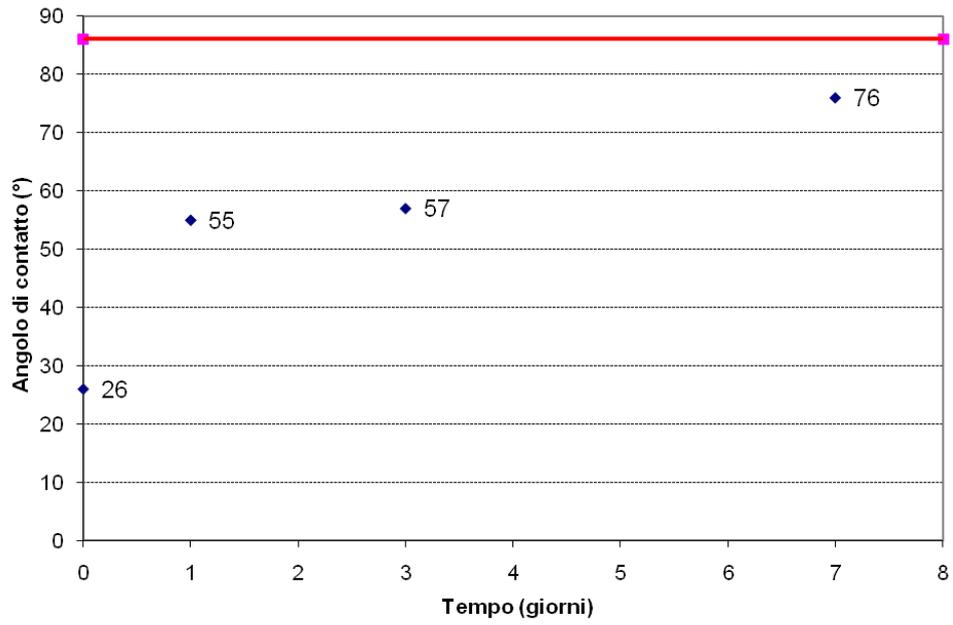


Figura 36 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti6Al4V, trattamento O30

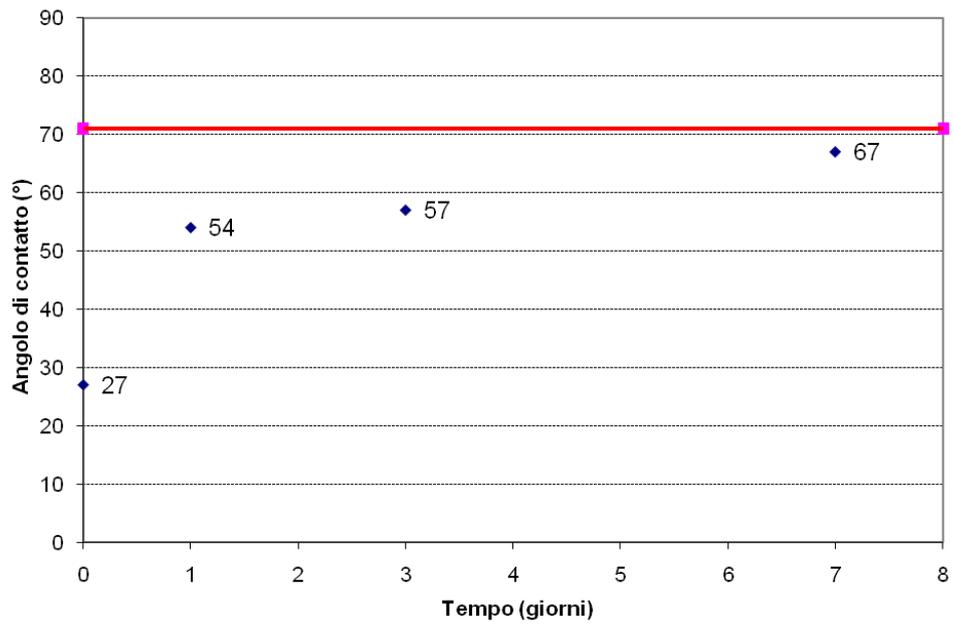
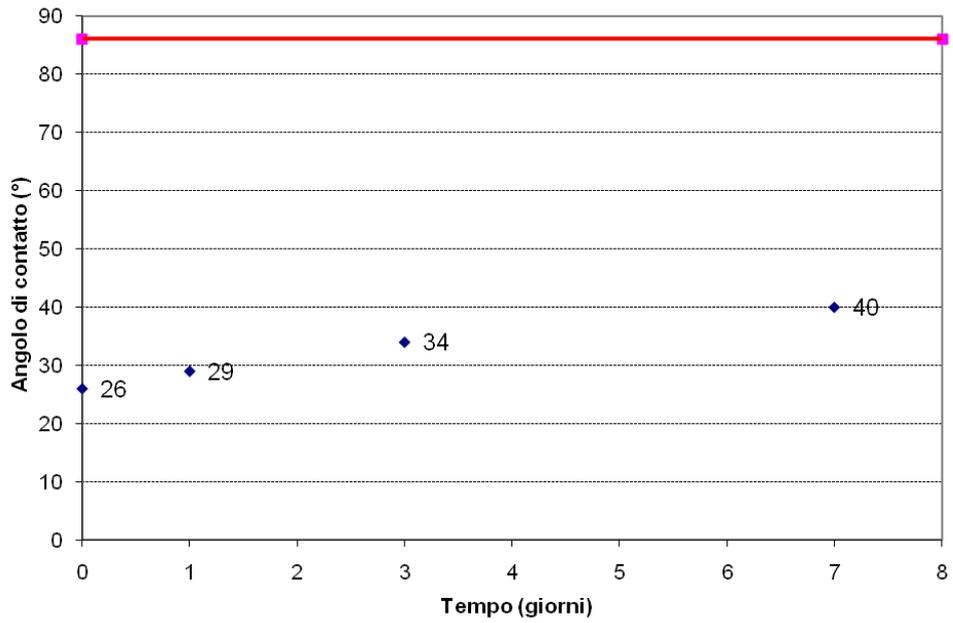
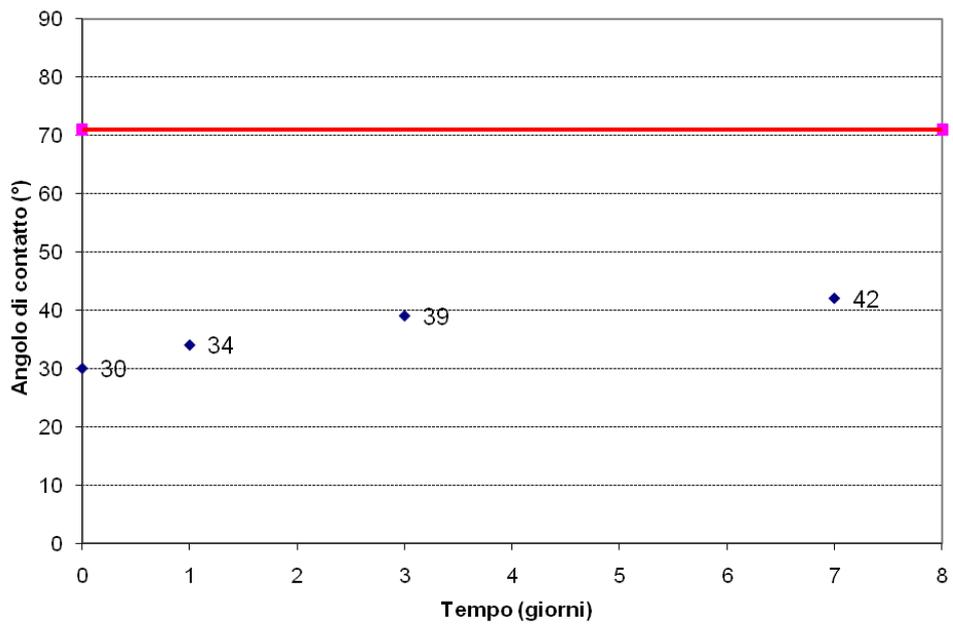


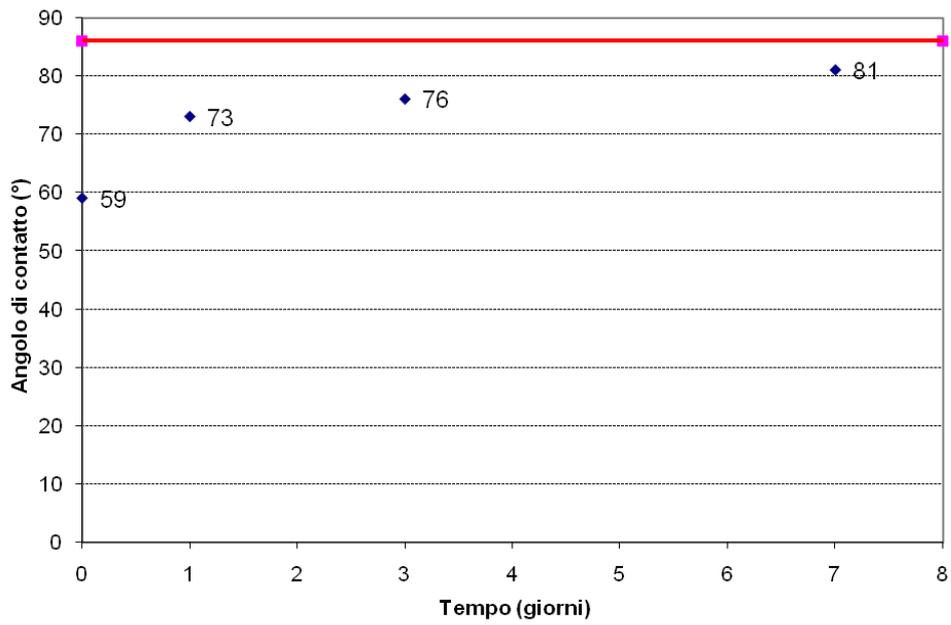
Figura 37 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega AISI 316, trattamento O30



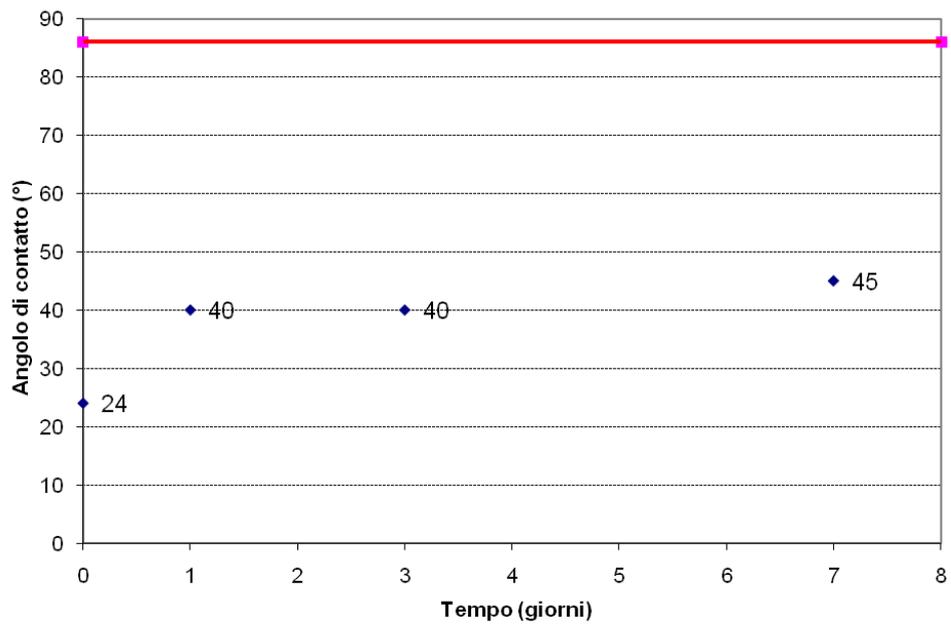
**Figura 38 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti6Al4V, trattamento NH180**



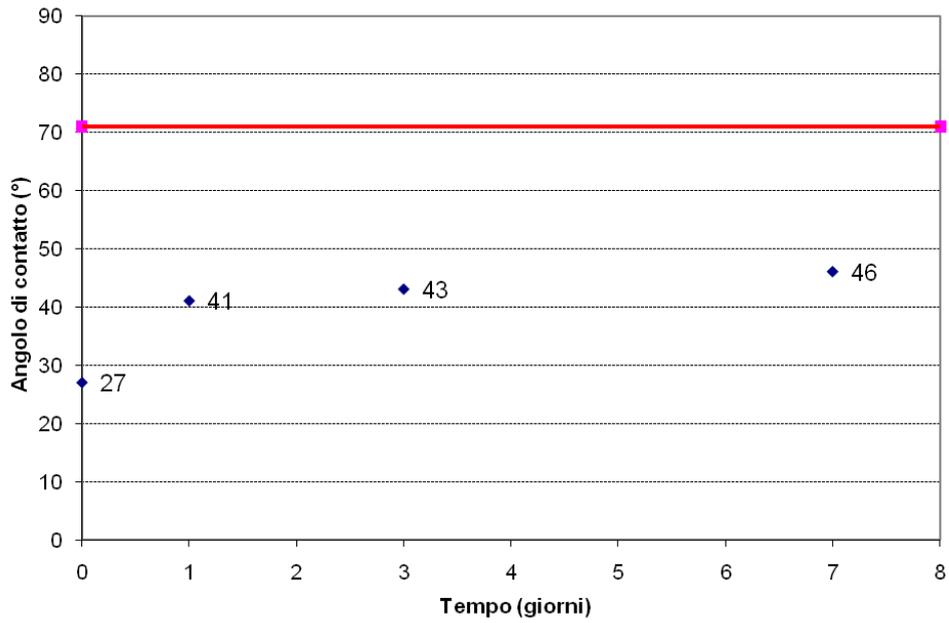
**Figura 39 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega acciaio AISI 316, trattamento NH180**



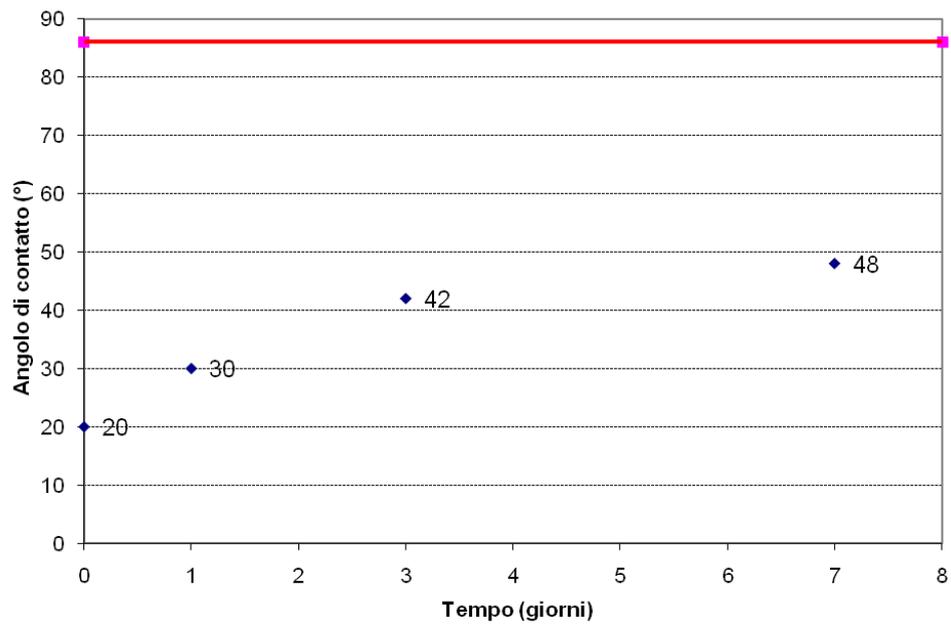
**Figura 40 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti6Al4V, trattamento NH180**



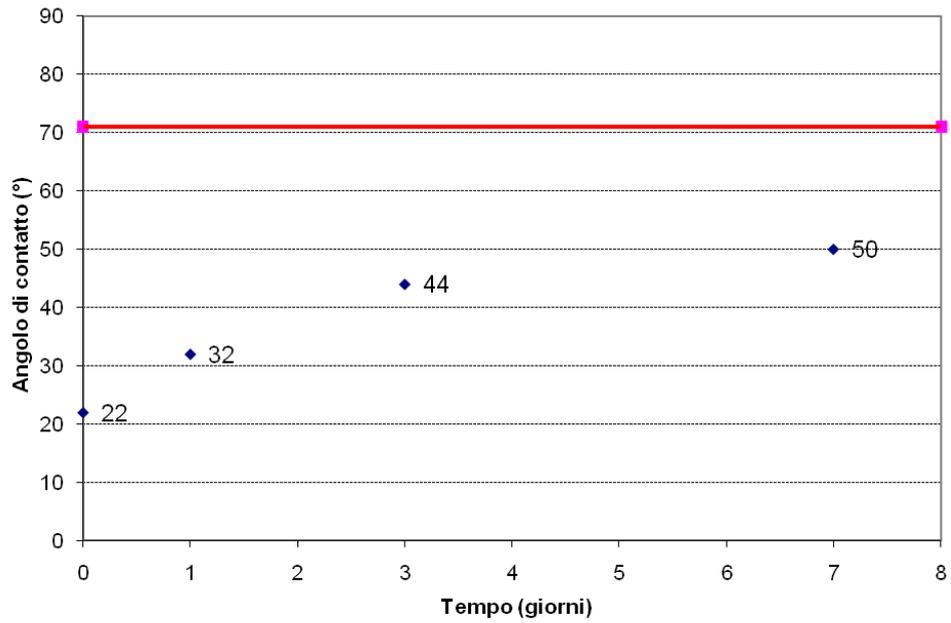
**Figura 41 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega Ti6Al4V, trattamento O3**



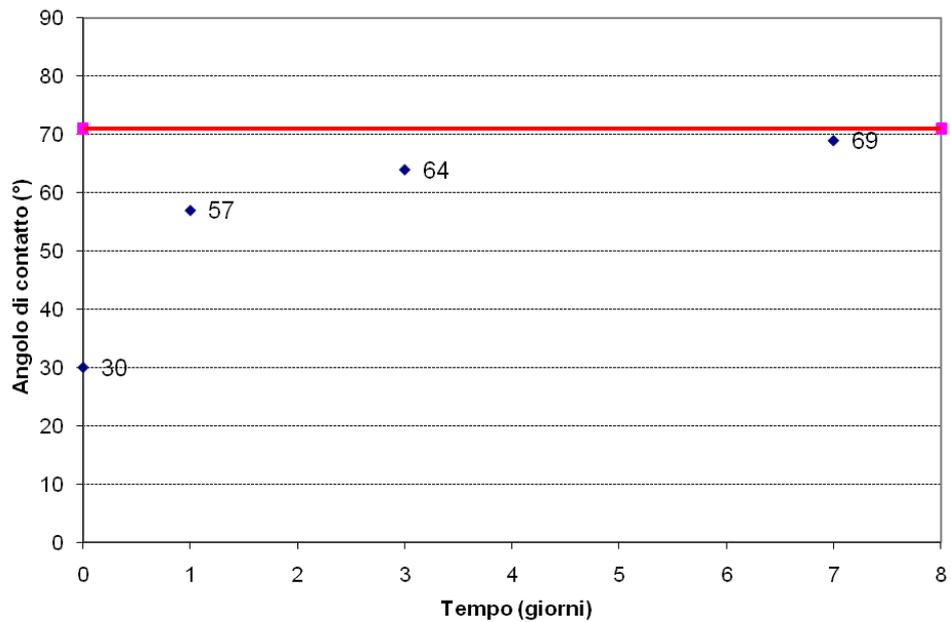
**Figura 42 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega acciaio AISI 316, trattamento O3.**



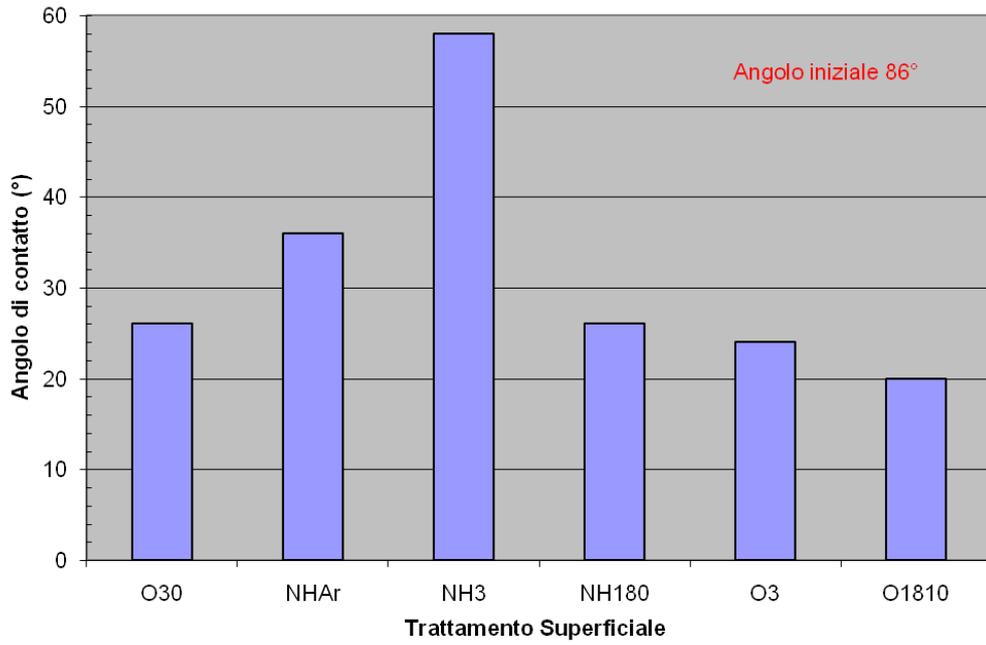
**Figura 43 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, Ti6Al4V, trattamento O180**



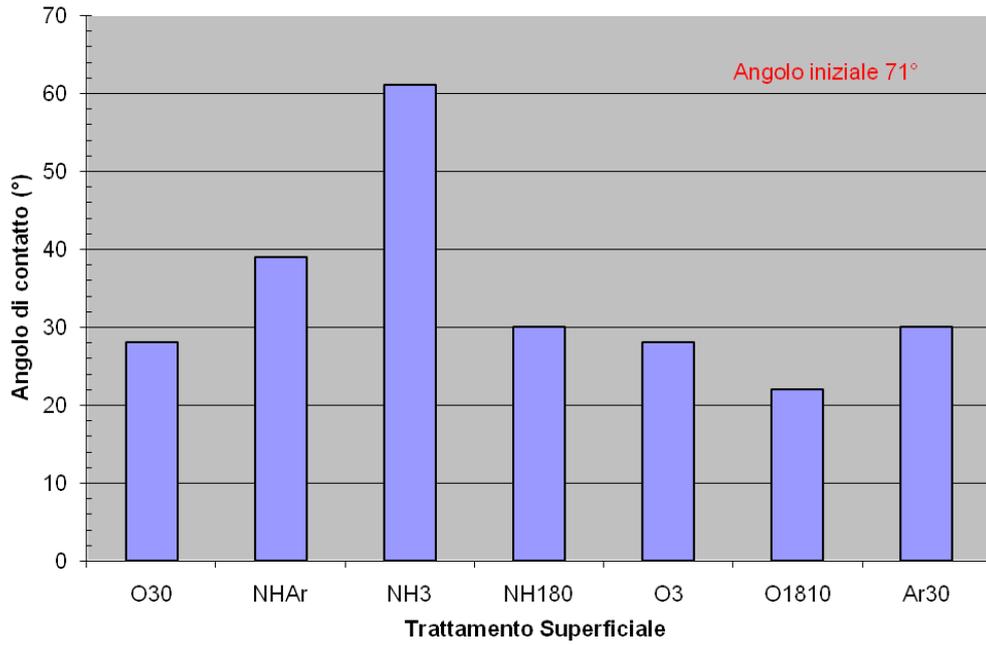
**Figura 44 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega acciaio AISI 316, trattamento O180**



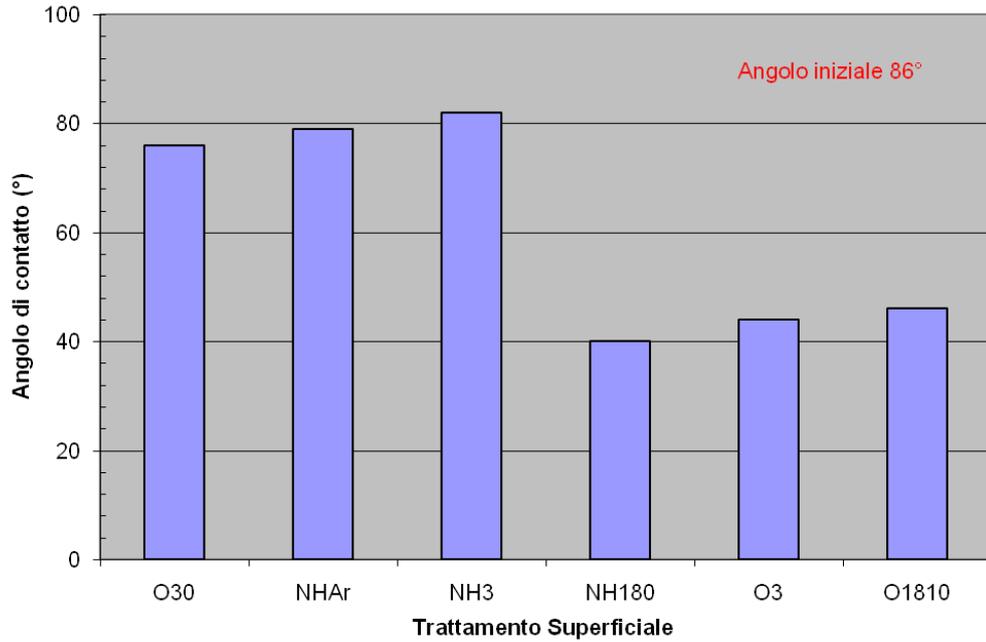
**Figura 45 - Angolo di contatto in funzione del tempo d'invecchiamento, lega acciaio, AISI 316, trattamento Ar30.**



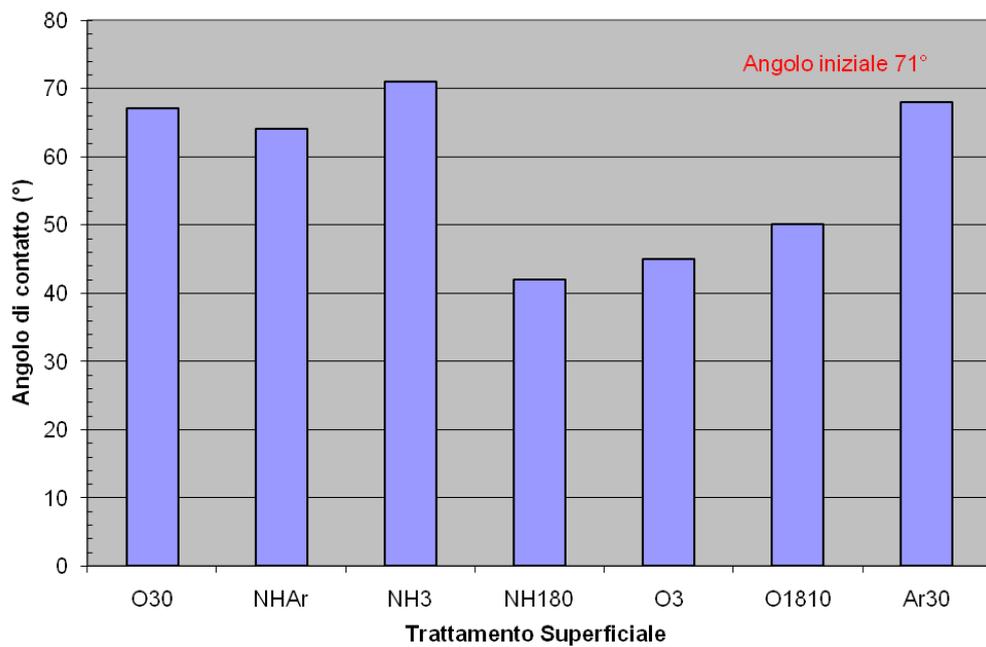
**Figura 46 - Confronto tra i valori dell'angolo di contatto tra i vari trattamenti al plasma effettuati sulla lega Ti6Al4V, misurati subito dopo il trattamento**



**Figura 47 - Confronto tra i valori dell'angolo di contatto tra i vari trattamenti al plasma effettuati sulla lega AISI 316, misurati subito dopo il trattamento**



**Figura 48 - Confronto tra i valori dell'angolo di contatto tra i vari trattamenti al plasma effettuati sulla lega Ti6Al4V, misurati 7 giorni dopo il trattamento**



**Figura 49 - Confronto tra i valori dell'angolo di contatto tra i vari trattamenti al plasma effettuati sulla lega AISI 316, misurati 7 giorni dopo il trattamento**

## **6.2. Valutazione della resistenza a corrosione**

In questo paragrafo sono riportati i risultati relativi alla valutazione della resistenza a corrosione dei lamierini in lega di titanio commercialmente puro (CP) grado 1, 2 e 4, lega di titanio alluminio e vanadio (Ti6Al4V), acciaio inox 316, trattati al plasma freddo.

Le prove di caratterizzazione sperimentale dei materiali trattati sono state effettuate utilizzando la tecnica EIS (electrochemical Impedance Spectroscopy), la soluzione di test utilizzata è costituita da NaCl al 3.5% in peso in acqua.

Le sperimentazione effettuata ha lo scopo di valutare la resistenza a corrosione, e quindi la durabilità, dei campioni delle leghe citate, trattati in plasma e poi verniciati con materiali a diversa base organica e di diverso colore.

I trattamenti al plasma utilizzati sono quelli riportati nella sezione precedente (ad acronimo uguale corrisponde lo stesso tipo di trattamento), le vernici usate, invece, sono state una poliammidica bianca, una epossidica verde ed una poliesteri blu.

Le prove effettuate hanno dimostrato che diversi trattamenti al plasma mostrano comportamento interessante. In particolare alcuni campioni di materiale trattato e poi verniciato hanno mostrato una resistenza a corrosione, nell'ambiente di test, di particolare rilievo. Si ricorda tal proposito che la soluzione utilizzata (acqua distillata contenente il 3,5% in peso di NaCl) simula l'acqua di mare, l'ambiente di test adottato, quindi, è particolarmente aggressivo. In tali condizioni, ad esempio, il campione costituito da una lega di titanio CP gr 1, trattato nelle condizioni indicate con O30, rivestito con la vernice bianca, ha mostrato un buon comportamento in quanto il valore del modulo dell'impedenza raggiunge un minimo dopo 9 giorni di immersione ma poi esso ritorna al valore iniziale fino che resta inalterato dopo 53 giorni di immersione. Ciò dimostra che il sistema è capace di autoprotettersi. Il campione in lega di titanio CP gr 2, trattato nella miscela ammoniac-argon, rivestito con la vernice verde, mostra sin dall'immersione due costanti di tempo, evidenza

della presenza di un ricoprimento poroso, ma le prestazioni della vernice rimangono inalterate fino alla fine del test (53 giorni). Anche il campione costituito da acciaio AISI 316, trattato nelle stesse condizioni di plasma ma rivestito della vernice blu, mostra per tutta la durata del test due o più costanti di tempo ma il valore del modulo dell'impedenza resta pressoché inalterato.

Il campione di Titanio CP Gr1 trattato in NHAr presenta uno scattering dei dati nelle zone di bassa frequenza, sintomo di difettologia superficiale diffusa. L'andamento del diagramma dell'angolo di fase rivela, tuttavia, la variazione del comportamento che migliora, rispetto alla rilevazione a  $t = 0$ ; facendo presumere la formazione di strati superficiali che proteggono il campione.

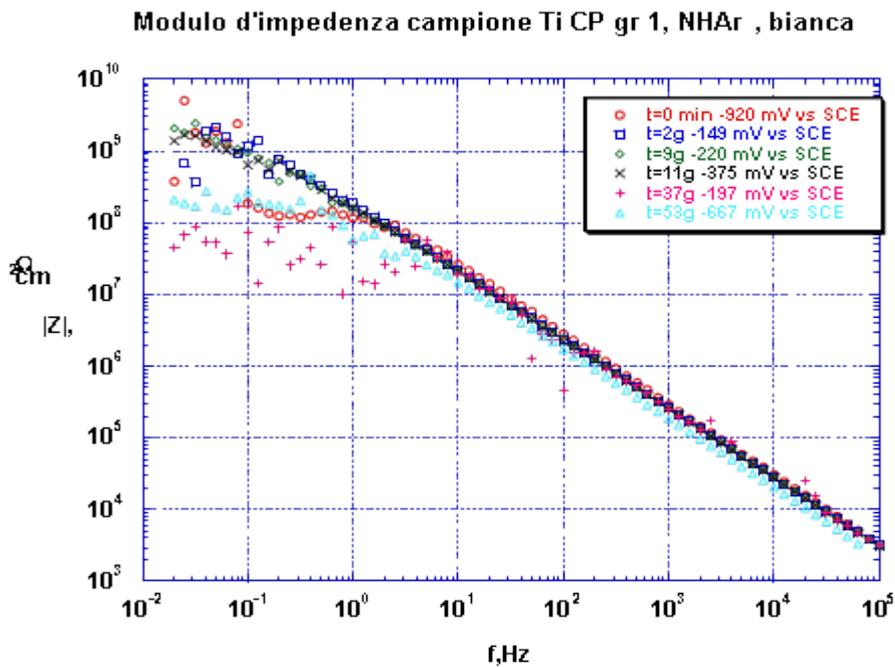


Figura 50 - Modulo d'impedenza campione Ti CP gr 1, NHAr , bianca

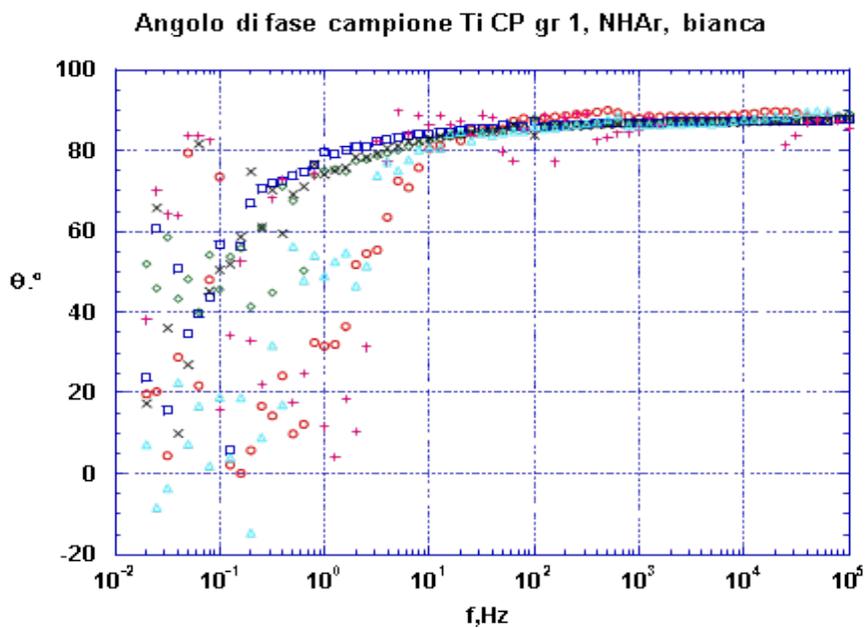


Figura 51 – Angolo di fase campione Ti CP gr 1, NHAr , bianca

Il campione Ti CP Grado1, rivestito con vernice bianca, sottoposto al trattamento O30, mostra un minimo dei valori di resistività al tempo  $t=11\text{gg}$ , con un successivo miglioramento delle prestazioni a bassa frequenza e quindi della capacità resistiva del ricoprimento.

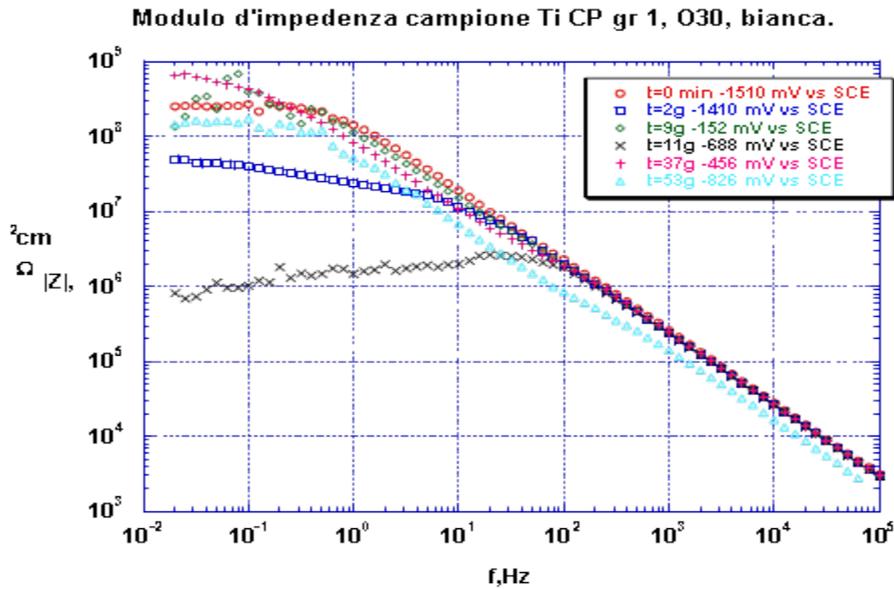


Figura 52 – Modulo d'impedenza campione Ti CP gr 1, O30, bianca

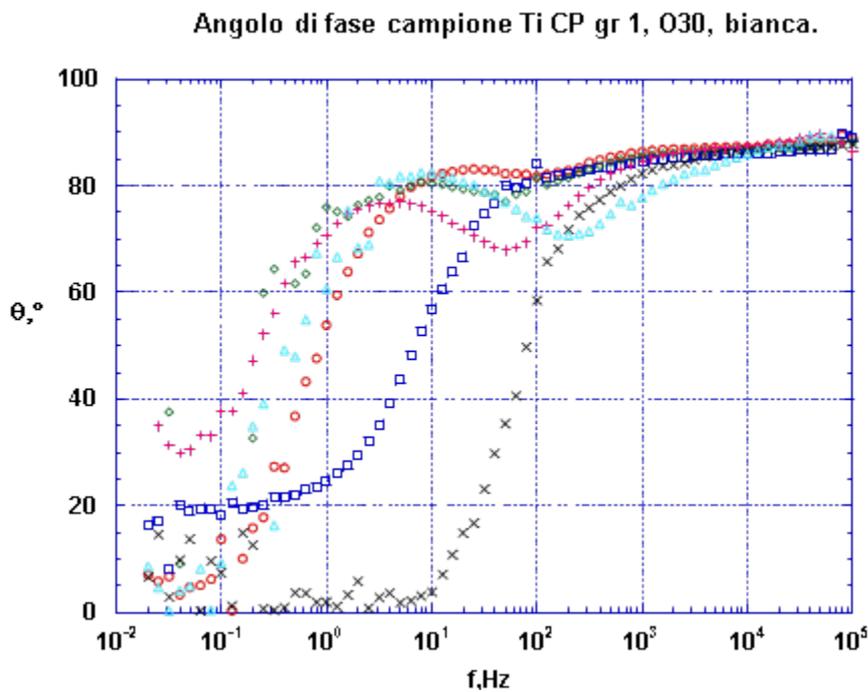


Figura 53 – Angolo di fase campione Ti CP gr 1, O30, bianca.

Il campione preparato con Titanio Grado2, trattato con NHAr e ricoperto da vernice verde, mostra valori dell'impedenza stabili per tutta la durata della prova, La presenza della doppia costante di tempo e l'evoluzione nel tempo dell'andamento dell'angolo di fase, tuttavia, mostrano la presenza di porosità che non incidono sulle prestazioni complessive del ricoprimento.

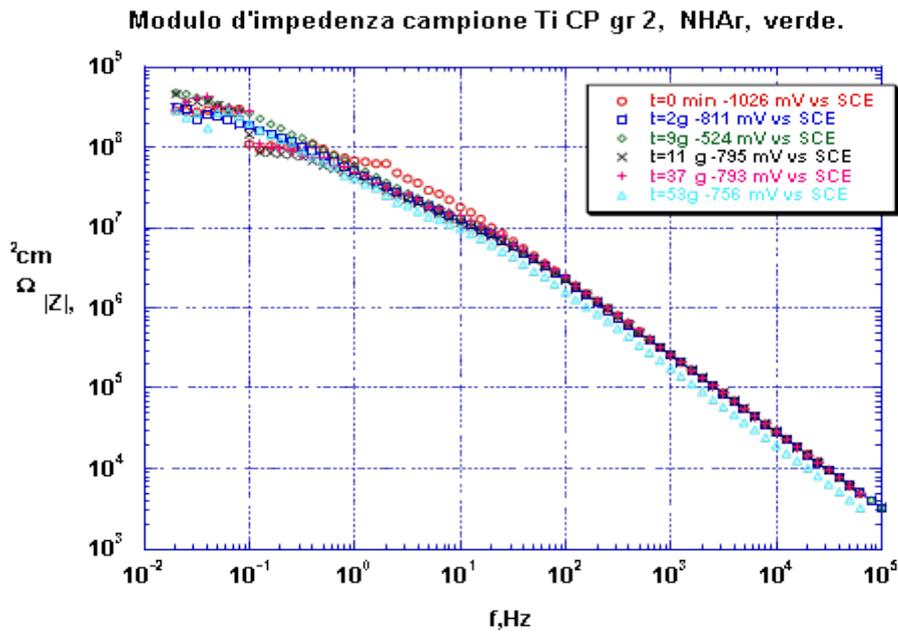


Figura 54 - Modulo d'impedenza campione Ti CP gr 2, NHAr, verde.

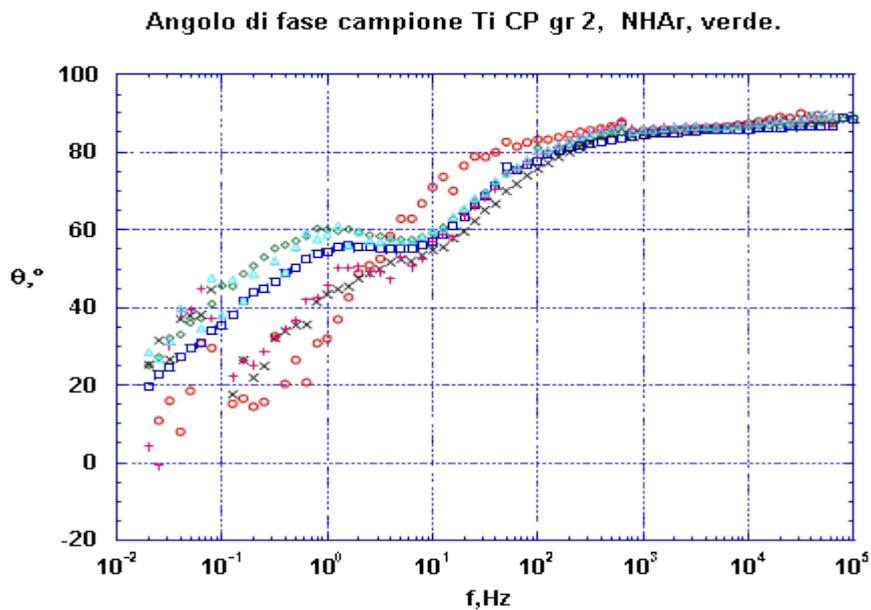


Figura 55 - Angolo di fase campione Ti CP gr 2, NHAr, verde.

A parità di materiale base e verniciatura, tuttavia, il trattamento O32 si rileva di qualità peggiore rispetto al precedente: si nota un peggioramento della capacità protettiva tra le prove effettuate dopo 9 e dopo 11 giorni di immersione, seguito da un effetto protettivo dovuto ai prodotti di corrosione che, come denota l'andamento dell'angolo di fase, vanno ad occludere le porosità create.

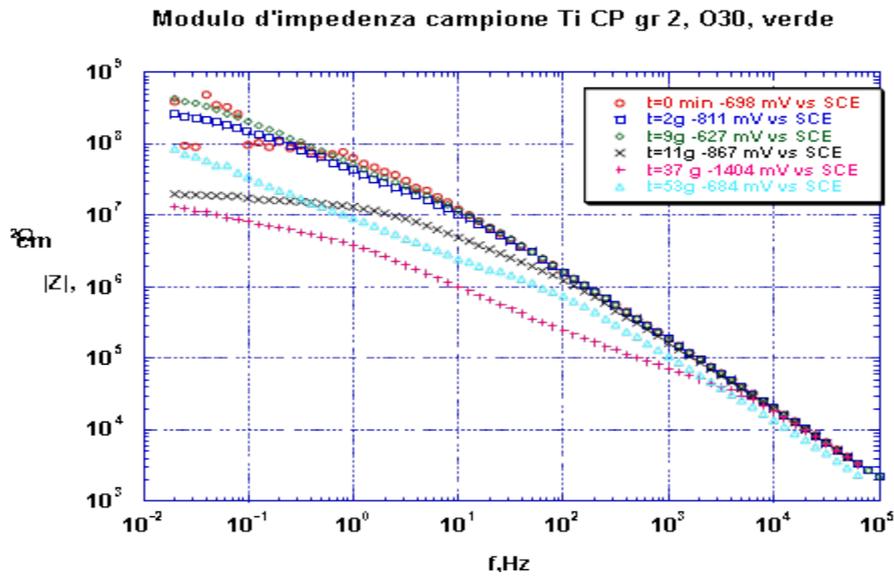


Figura 56 - Modulo d'impedenza campione Ti CP gr 2, O30, verde

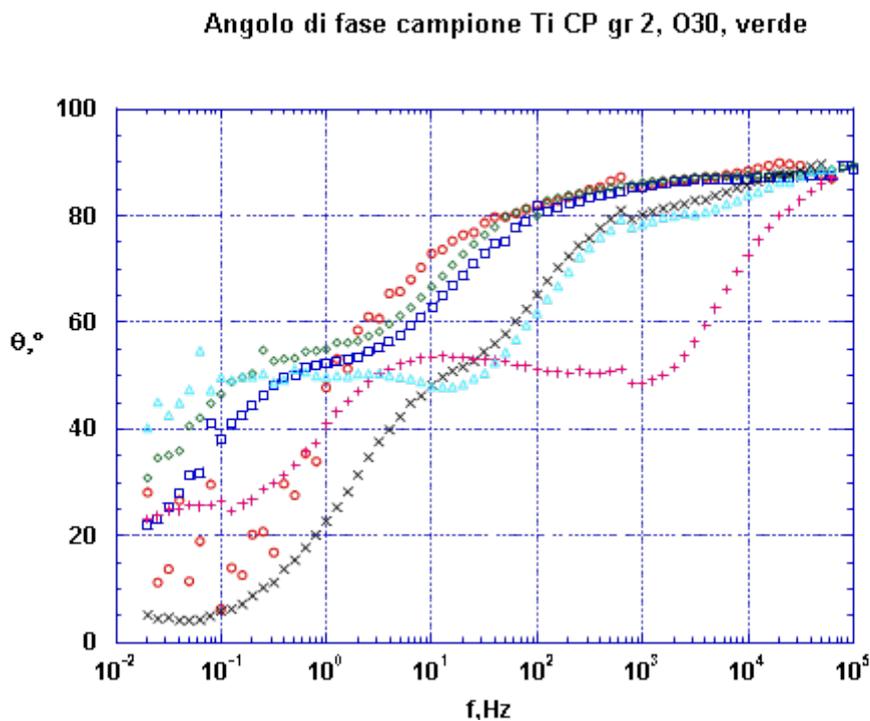


Figura 57 - Angolo di fase campione Ti CP gr 2, O30, verde

La variazione del substrato (Ti gr.4), nel caso di trattamento NHAr e di vernice bianca, conferma uno scattering dei dati in bassa frequenza negli stadi iniziali di immersione. Il processo, tuttavia, tende a stabilizzarsi con una minor presenza di porosità ed un miglioramento delle caratteristiche protettive, prima di un brusco decadimento verso il termine del periodo di osservazione.

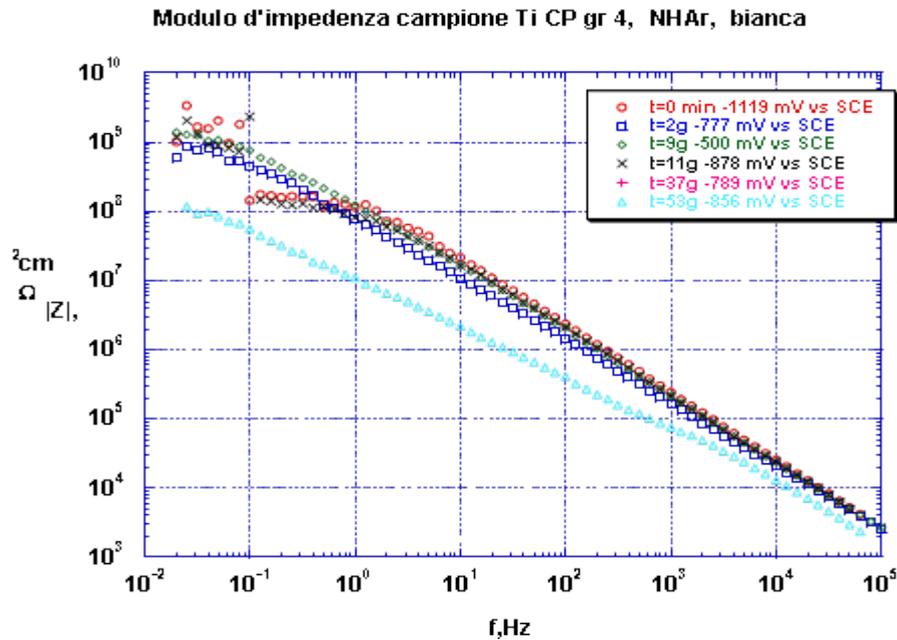


Figura 58 - Modulo d'impedenza campione Ti CP gr 4, NHAr, bianca

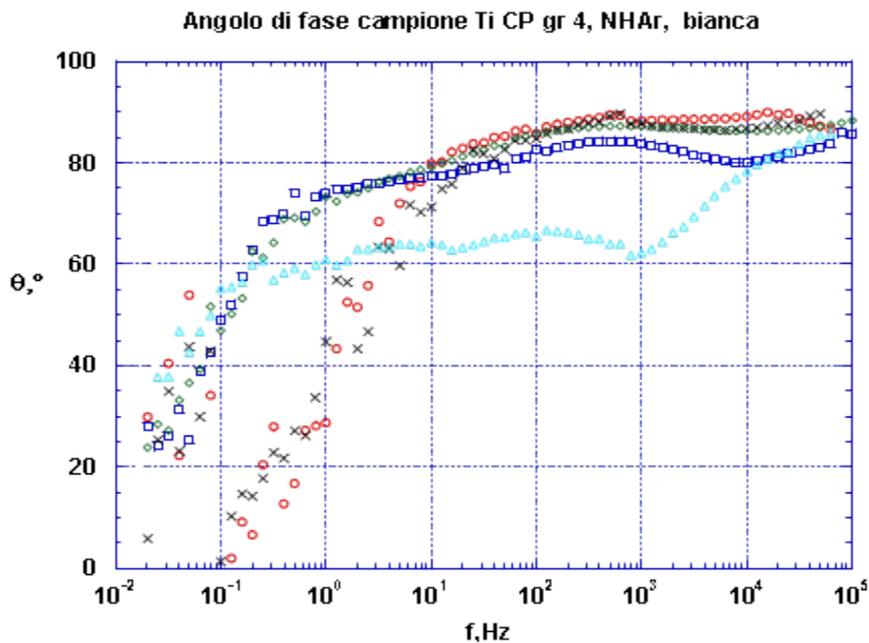


Figura 59 - Angolo di fase campione Ti CP gr 4, NHAr, bianca

L'utilizzo di una lega (Ti6Al4V), mette in evidenza un comportamento stabile per tutto il periodo di osservazione, con un progressivo aumento della protezione dovuto ai prodotti del processo, come evidenzia l'andamento del diagramma dell'angolo di fase.

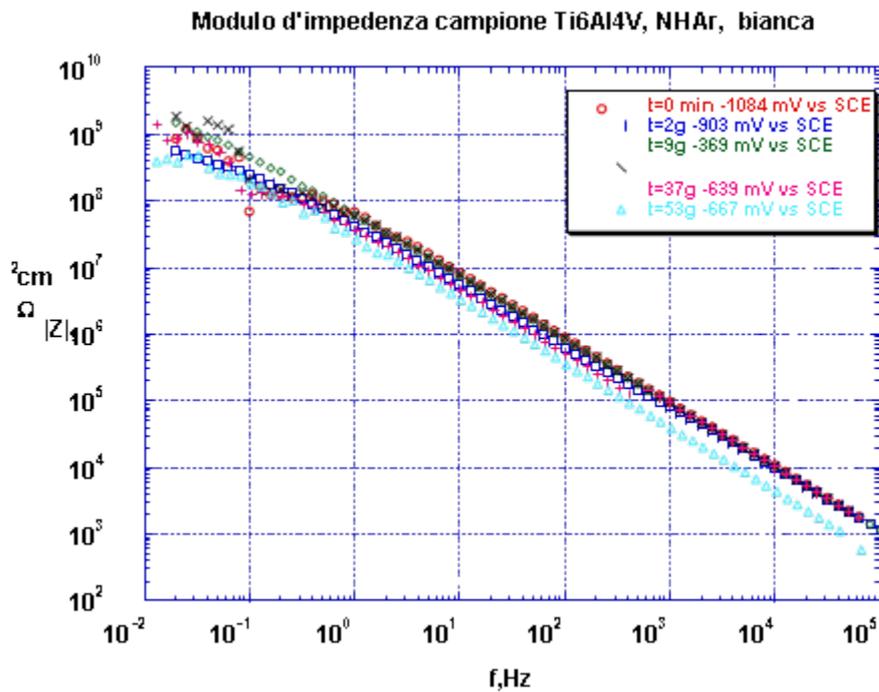


Figura 60 - Modulo d'impedenza campione Ti6Al4V, NHAr, bianca

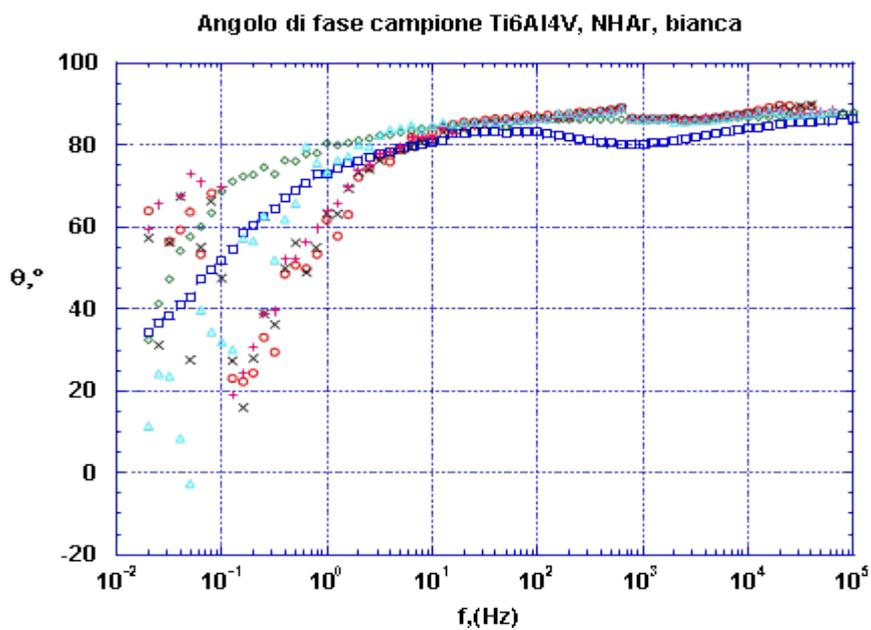


Figura 61 - Angolo di fase campione Ti6Al4V, NHAr, bianca

Anche il campione trattato con O30 ha un comportamento simile, pur mostrando, tuttavia una sensibile diminuzione delle capacità protettive del ricoprimento all'aumentare del periodo di osservazione.

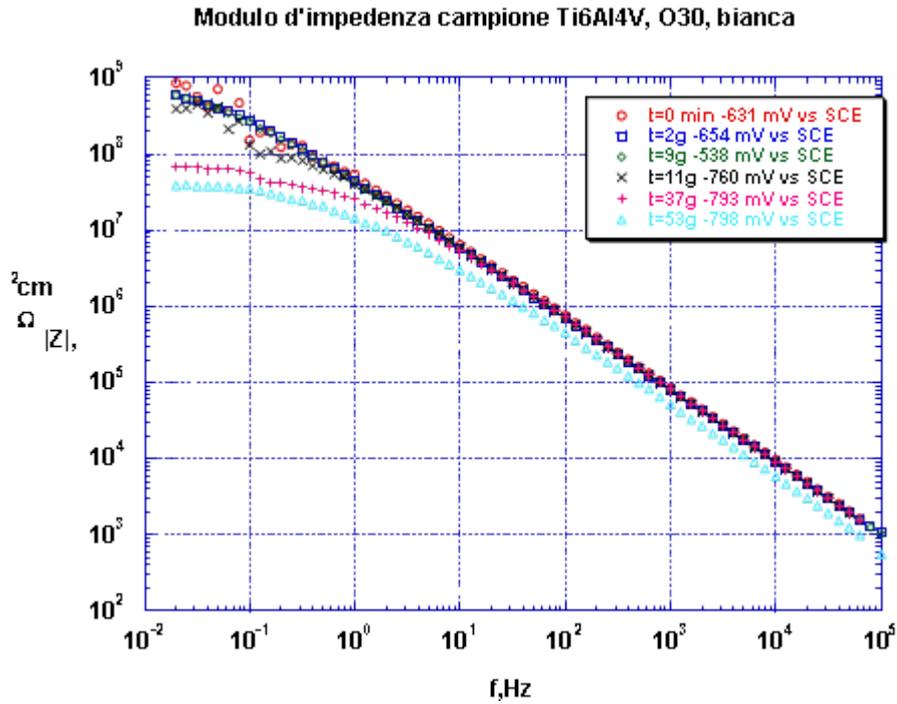


Figura 62 - Modulo d'impedenza campione Ti6Al4V, O30, bianca

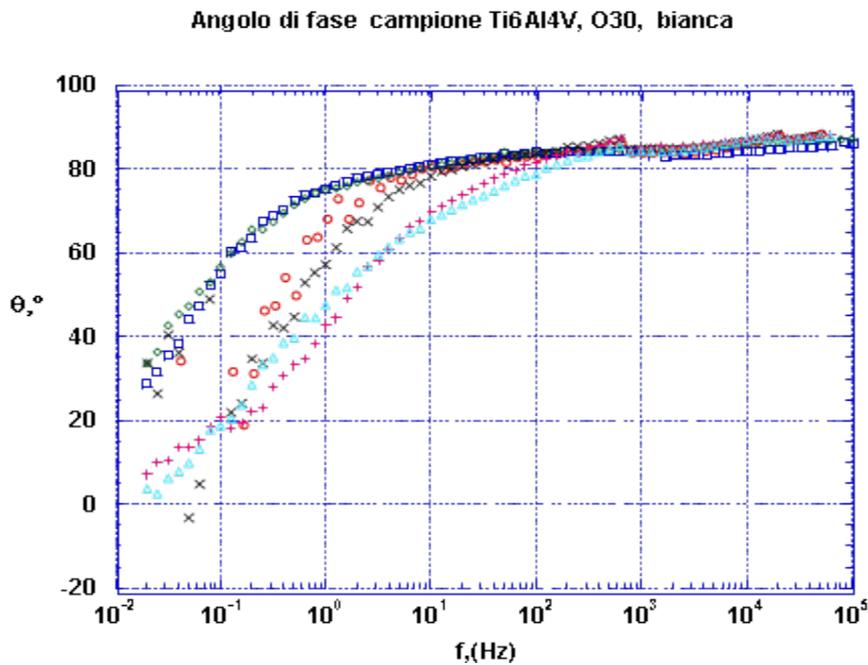


Figura 63 - Angolo di fase campione Ti6Al4V, O30, bianca

L'aumento del tempo di esposizione (O180), di fatto, non modifica il comportamento a corrosione del campione, anche in questo caso dopo un primo decadimento delle proprietà protettive si registra un successivo aumento (pur non recuperando le caratteristiche iniziali) anche in questo caso imputabile alla deposizione dei prodotti di corrosione, seguito da un progressivo ed uniforme decremento.

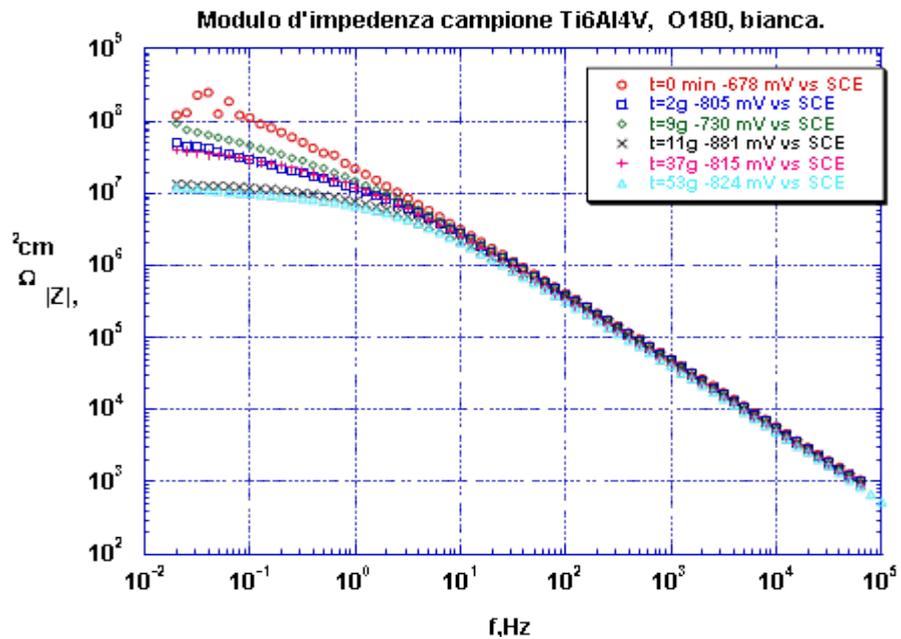


Figura 64 - Modulo d'impedenza campione Ti6Al4V, O180, bianca.

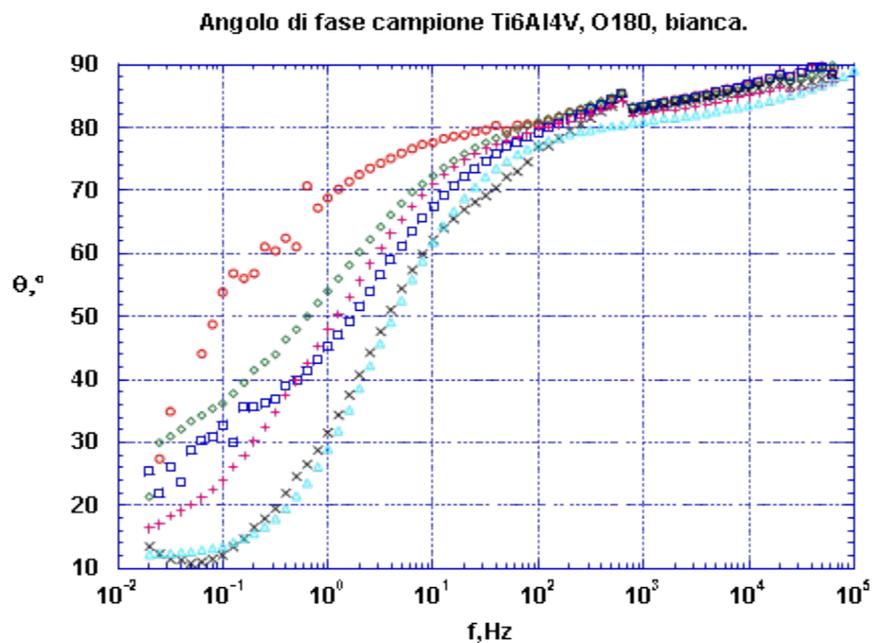


Figura 65 - Angolo di fase campione Ti6Al4V, O180, bianca.

I campioni ottenuti utilizzando acciaio AISI316, presentano fin da subito porosità evidenziate dalla doppia costante di tempo, pur tendendo queste, rapidamente a mitigare il proprio effetto, consentendo il recupero delle caratteristiche protettive.

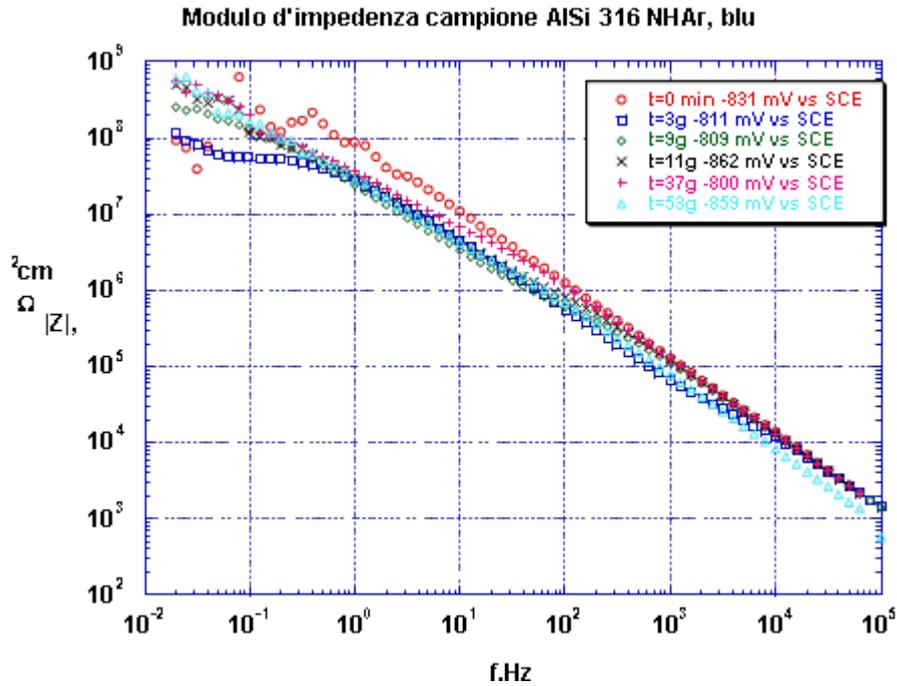


Figura 66 - Modulo d'impedenza campione AISi 316 NHAr, blu

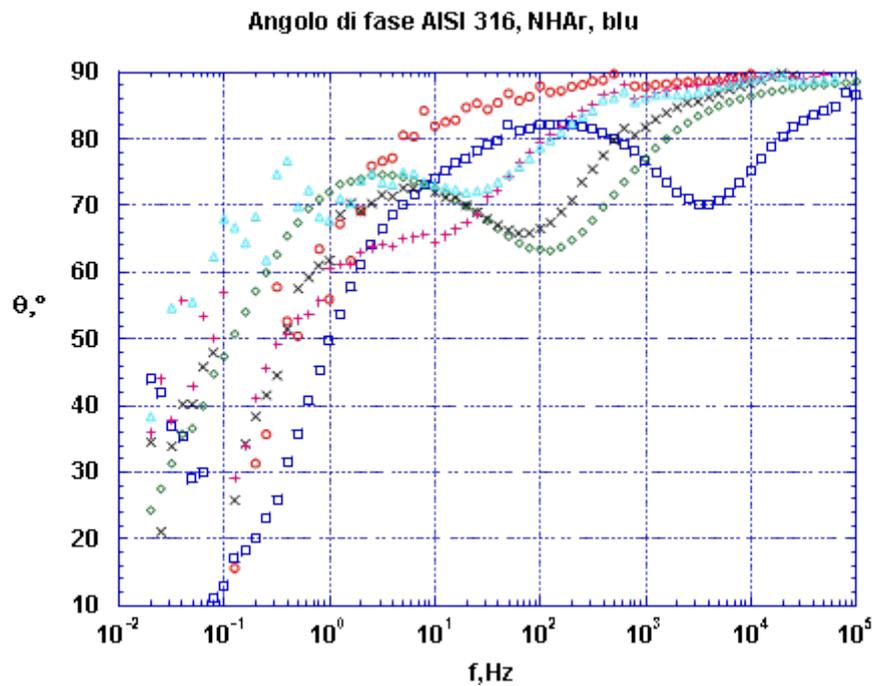


Figura 67 - Angolo di fase AISI 316, NHAr, blu

Risultati del tutto differenti si ottengono per il campione trattato con O30: il decadimento delle proprietà è netto e omogeneo, salvo poi evidenziare una ripresa, ma comunque al limite di quel valore di  $10^7 \Omega/\text{cm}^2$  che costituisce il limite di accettabilità del ricoprimento.

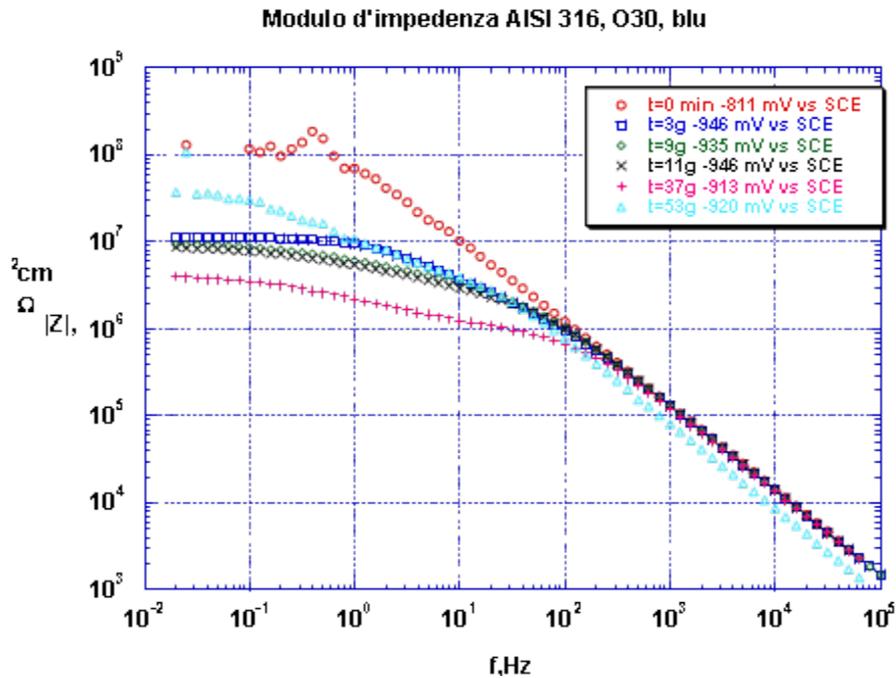


Figura 68 - Modulo d'impedenza AISI 316, O30, blu

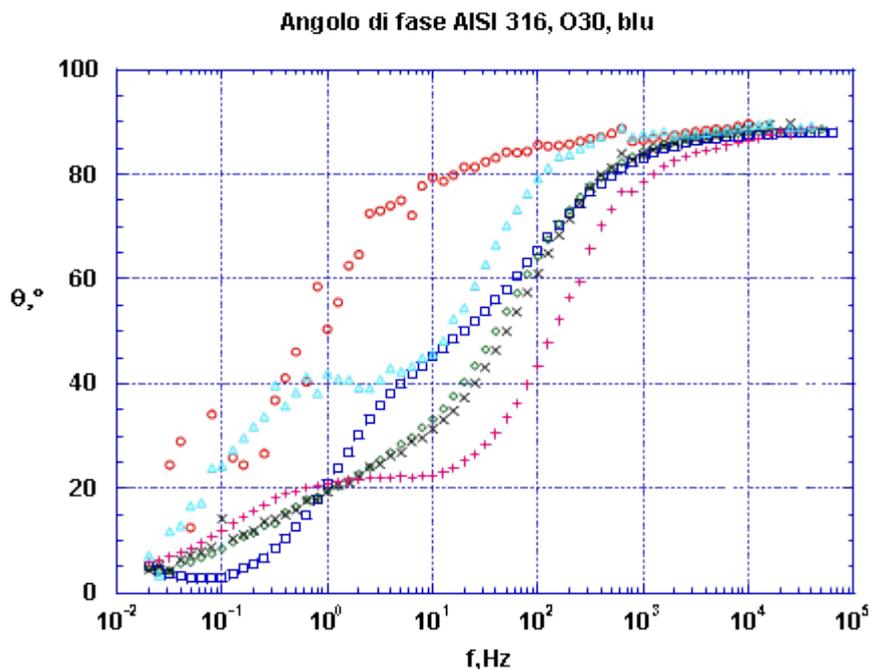


Figura 69 - Angolo di fase AISI 316, O30, blu

Il campione AISI316 con trattamento O3 rivestito di vernice blu presenta inizialmente valori molto bassi del modulo di impedenza, ma dopo solo due giorni di immersione i livelli salgono a valori considerevoli per subire, poi, un progressivo declino ed un assestamento finale, mostrando una complessità dinamica indicativa della formazione di prodotti di corrosione differenti.

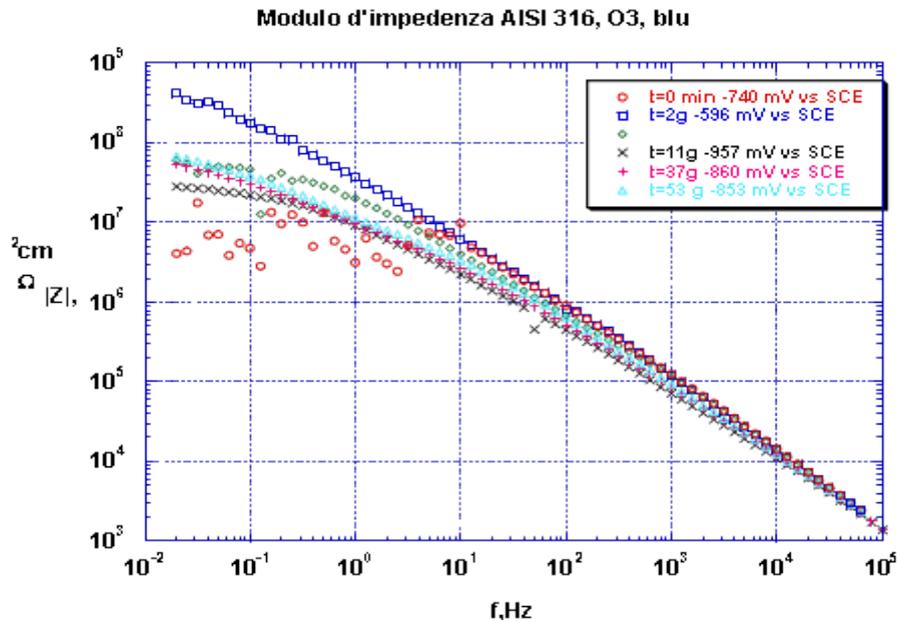


Figura 70 - Modulo d'impedenza AISI 316, O3, blu

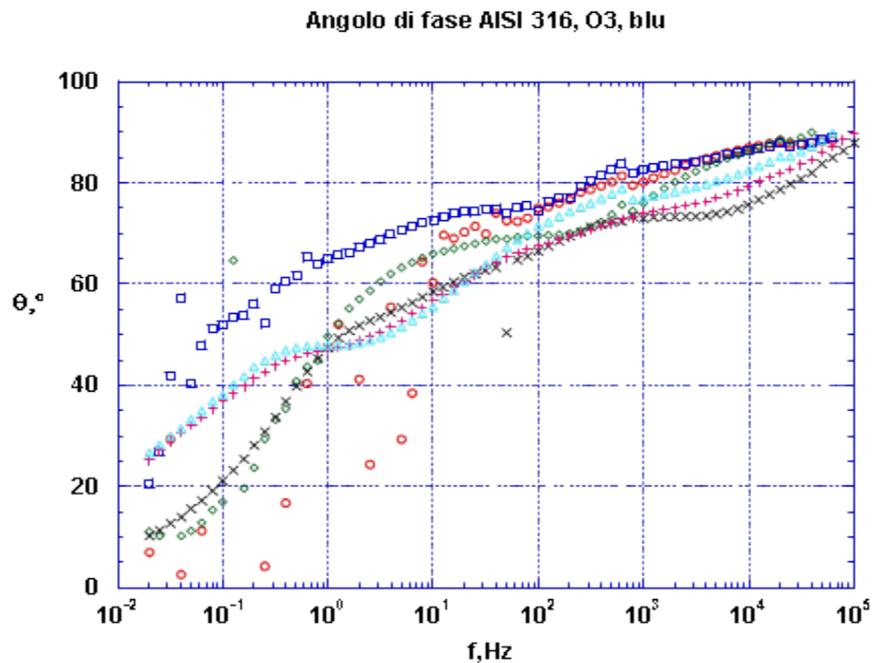


Figura 71 - Angolo di fase AISI 316, O3, blu

### **6.3. Attività antibatterica indotta**

Come affermato precedentemente si è valutato il grado di attività antibatterica ottenuta, al variare dei parametri di funzionamento della apparecchiatura, usando la *Listeria monocytogenes*. I risultati ottenuti con questo metodo consentono di affermare che il trattamento al plasma freddo conferisce un'attività ai materiali studiati verso agenti patogeni di sicuro interesse industriale, i materiali campioni utilizzati sono stati oggetti in acciaio AISI 316L ed in polietilene.

Nei grafici successivi sono riportati i valori delle letture sul campione trattato, omettendo il valore di controllo che si è rivelato sempre costante, con buona ripetibilità. Il termine "Trattamento X" si riferisce al monitoraggio della variazione della concentrazione batterica nella cella in presenza del materiale trattato al plasma nelle condizioni sperimentali X.

In particolare sono stati utilizzati i seguenti gas: ossigeno, argon, ammoniaca e loro miscele. I valori della pressione sono stati variati tra 0.2 e 0.7 mbar, il flusso tra 30 e 100 sccm, la potenza tra 50 e 100 watt nel caso dei trattamenti su PE e tra 200 e 400 watt nel caso dei trattamenti su acciaio, i tempi di trattamento in plasma sono stati variati tra 20 e 40 minuti.

Nel caso dei trattamenti su acciaio uno solo di essi ha dato esito positivo (vedi trattamento 1) mentre altri due è stato attribuito il valore "rivedere" in quanto si è verificata una sostanziale diminuzione della carica batterica ma non il completo annullamento (in termini di quantità misurabili) (vedere ad esempio il trattamento 5).

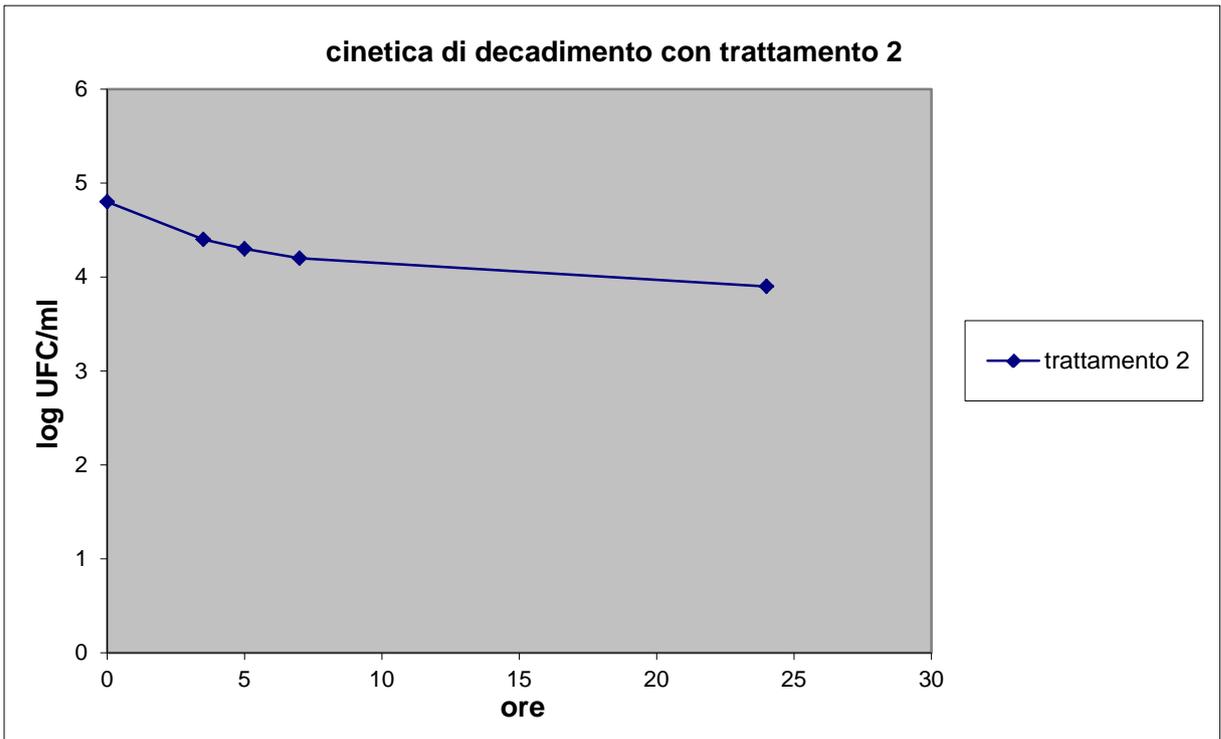
Nel caso dei trattamenti su PE sono state riscontrate numerose condizioni di plasma che donano un attività antibatterica al materiale (vedere trattamenti 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49) (alcuni grafici non sono stati riportati per semplicità espositiva).

È interessante notare che, come ci si aspettava, l'ossigeno offre le migliori prestazioni, ma mentre nel caso dei trattamenti su PE è stato possibile verificare che

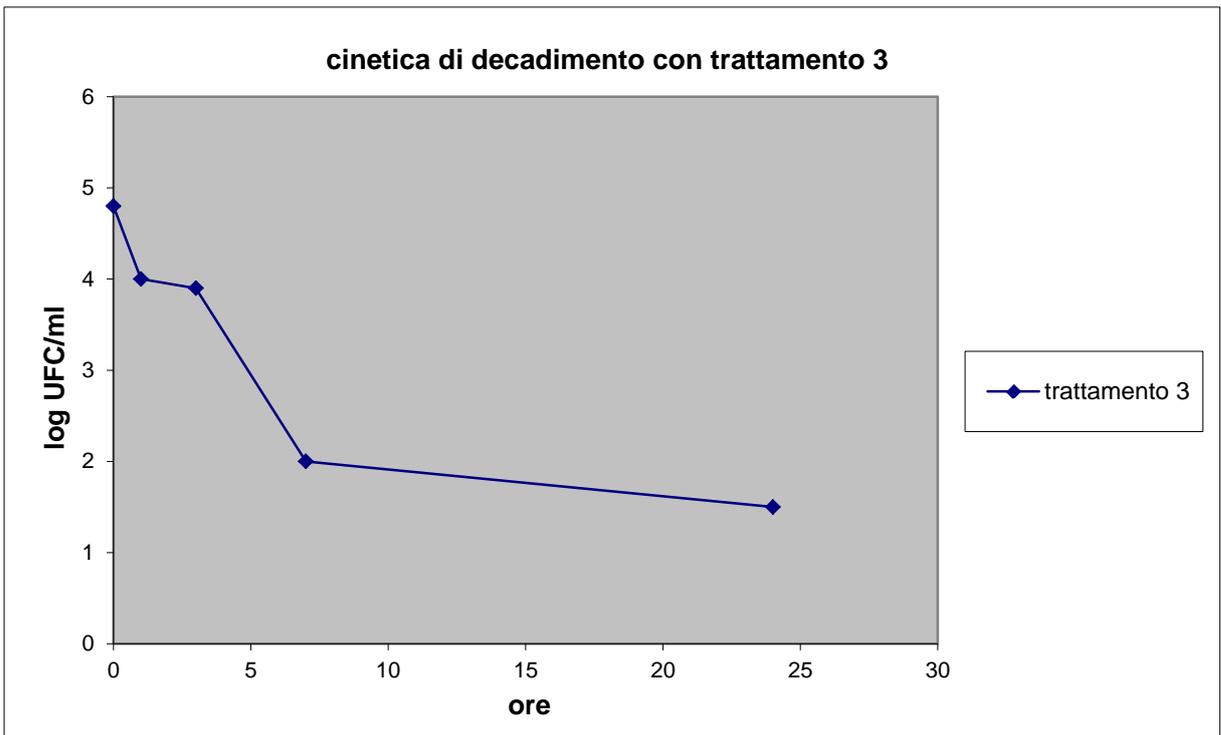
numerose condizioni sperimentali soddisfano i requisiti, nel caso di trattamenti su acciaio uno solo di essi ha dato esito positivo. Le condizioni sperimentali sui metalli, quindi, sono più stringenti rispetto a quelle da utilizzare nel caso di trattamenti su materiali polimerici.

D'altra parte, però, sull'acciaio è stata notata una certa attività da parte di miscele costituite da argon ed ammoniaca che potrebbero rivelarsi interessanti per applicazioni future, mentre nel caso dei materiali polimerici sono efficaci anche miscele di argon ed ossigeno.

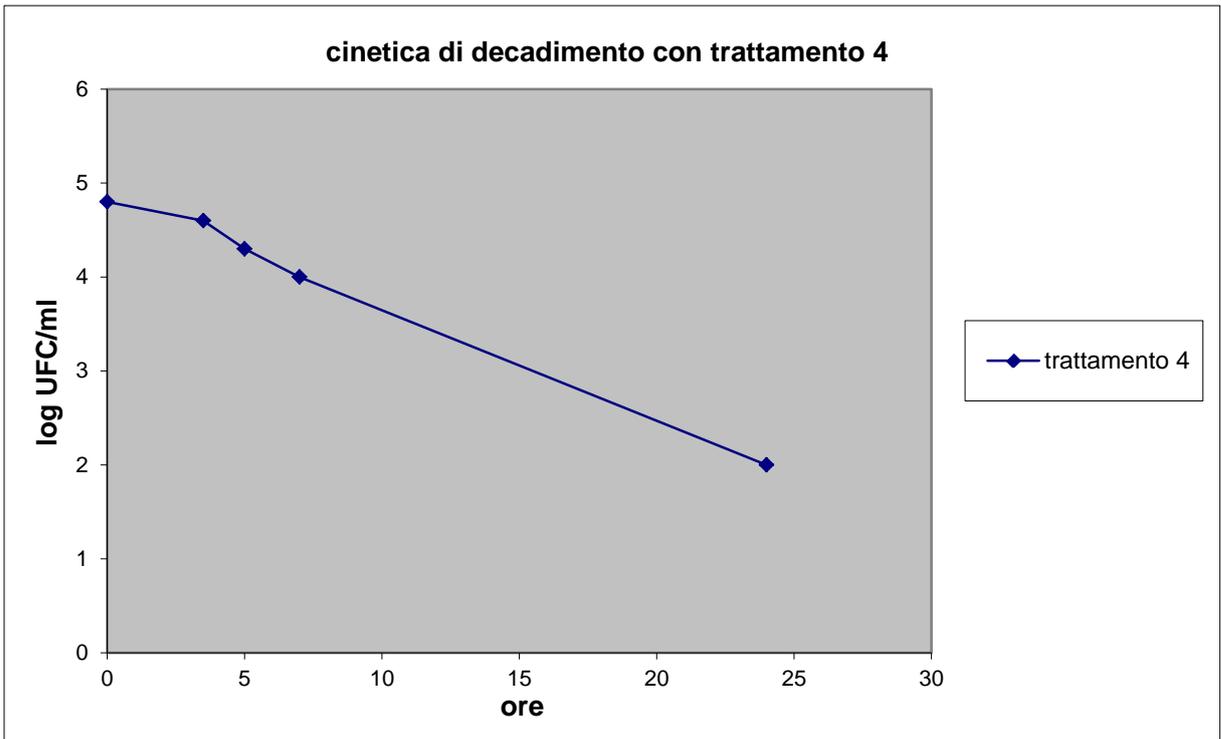
**Figura 72 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 1 su AISI 316L**



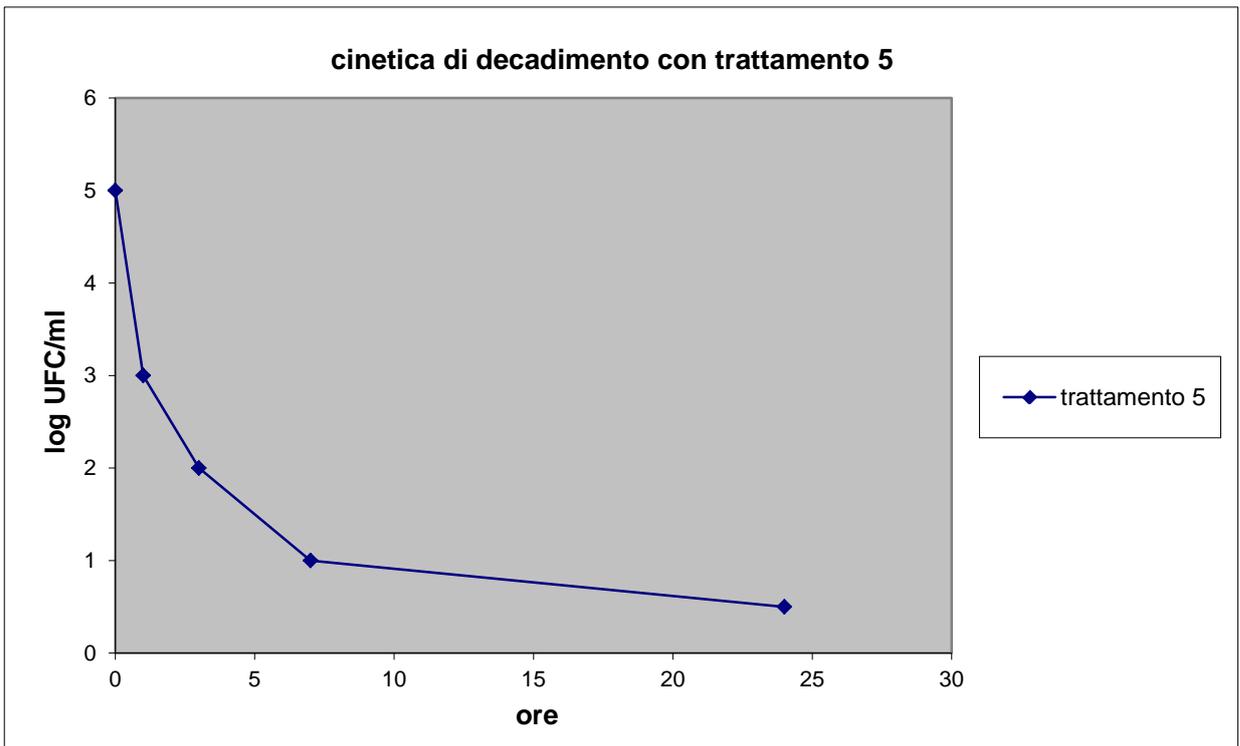
**Figura 73 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 2 su AISI 316L**



**Figura 74 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 2 su AISI 316L**



**Figura 75 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 4 su AISI 316L**



**Figura 76 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 5 su AISI 316L**

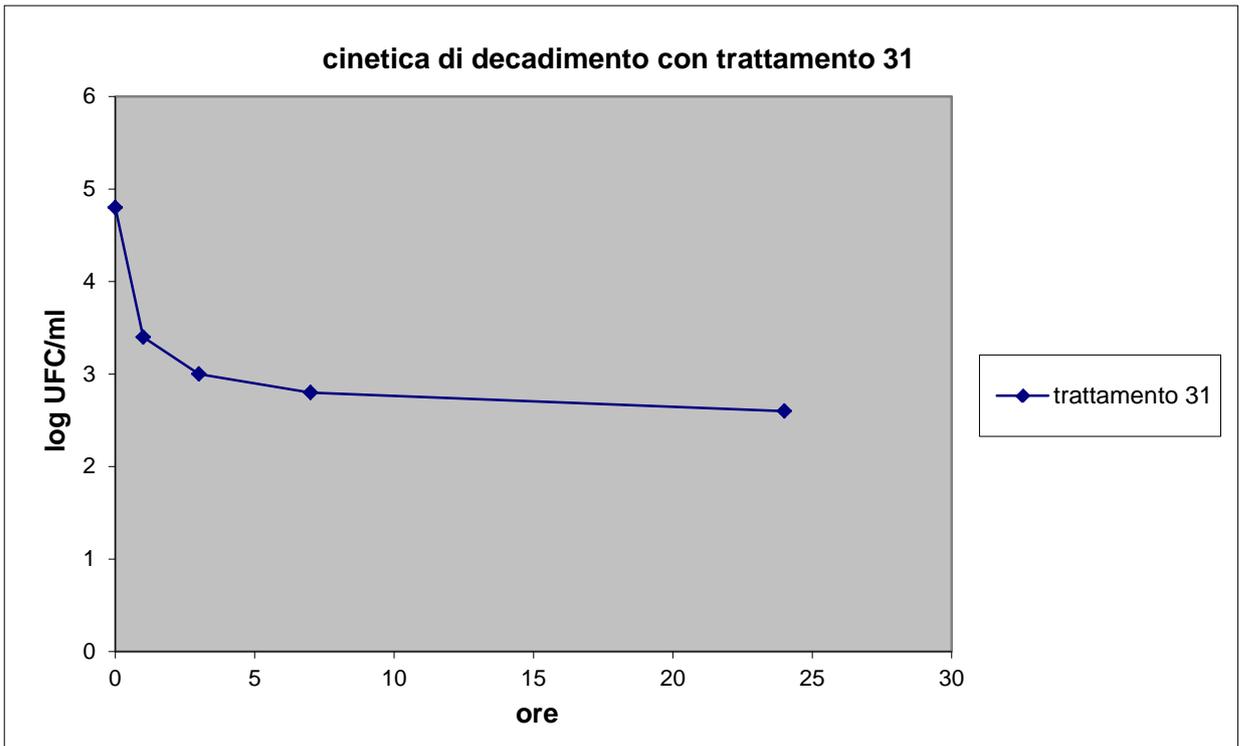


Figura 77 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 31 su PE

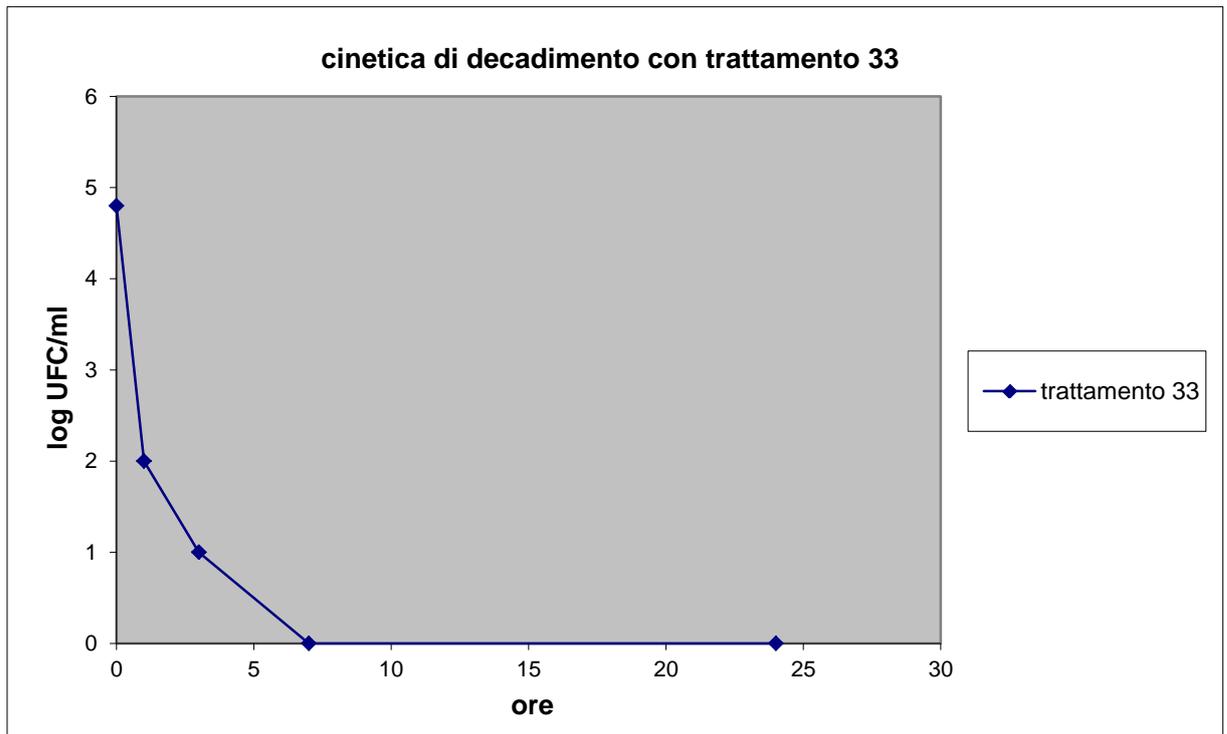


Figura 78 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 33 su PE

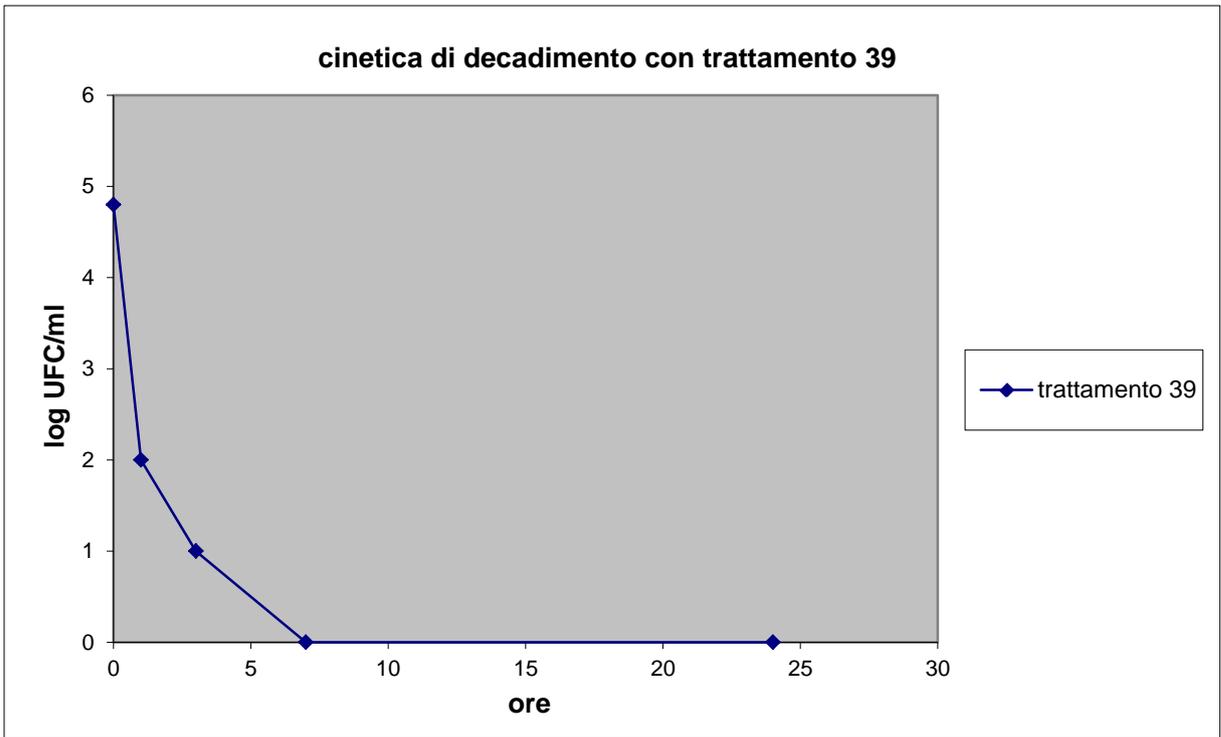


Figura 79 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 39 su PE

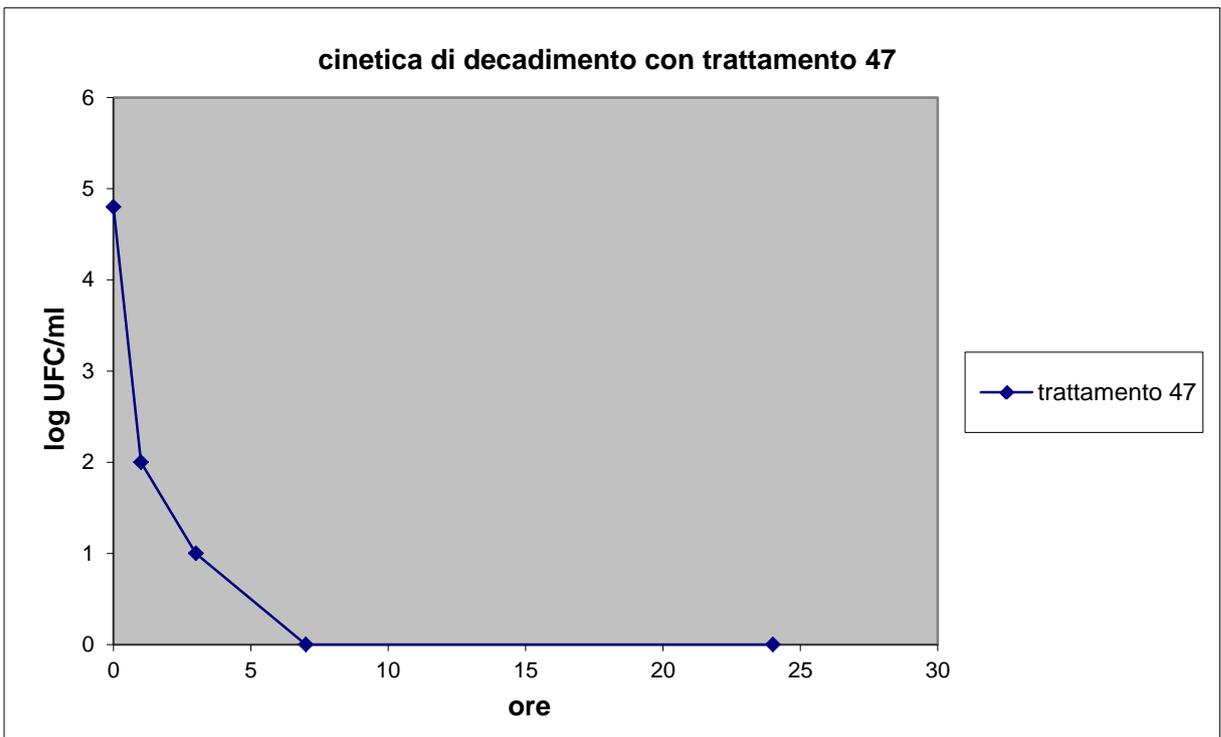
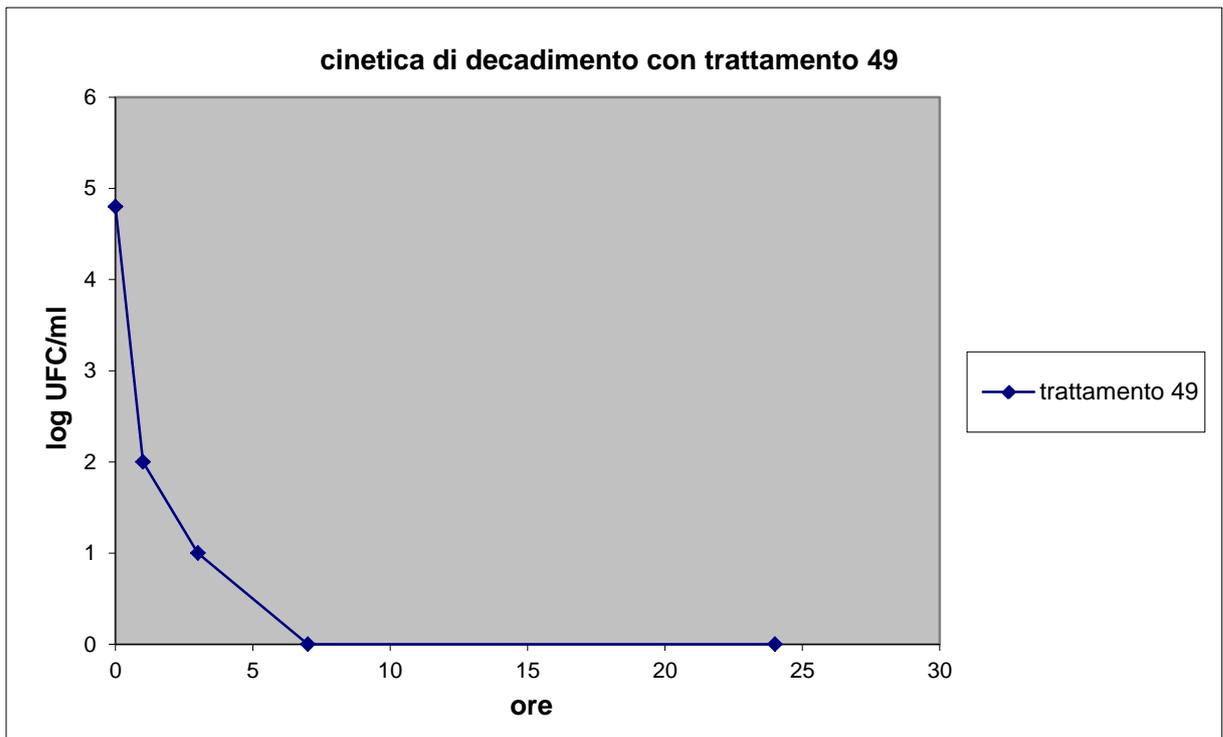


Figura 80 – Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 47 su PE



**Figura 81 - Cinetica di decadimento dell'attività antibatterica con trattamento 49 su PE**

## 7. Conclusioni

L'obiettivo di questa tesi era di valutare la fattibilità di un trattamento plasma specificatamente ottimizzato per la sterilizzazione dal bassissimo impatto ambientale e contemporaneamente la realizzazione di un apparecchiatura dalle caratteristiche di praticità, di affidabilità tale da poter essere immessa sul mercato. Lo scoglio più grande da superare è stato proprio quello di rispettare un insieme di requisiti molto restringenti dettati dalle procedure di sterilizzazioni codificate nelle ISO e rispondenti ai prerequisiti delle sistema sanitario.

Il lavoro è partito dalla validazione delle processo al plasma freddo come sterilizzatore, valutando la sua efficacia in diverse condizioni di potenza, durata, miscela di gas. La conclusione è stata assolutamente positiva. Infatti la tecnica ha mostrato le sue potenzialità di sterilizzare strumenti, non solo di acciaio, ma anche polimerici. Infatti sullo stesso reattore sono state individuate diverse condizioni di lavoro che consentono di sterilizzare manufatti in materiale termolabile, cosa di rilevante interesse per tutti gli oggetti in plastica che vengono utilizzati nella pratica ospedaliera. Ha inoltre mostrato un effetto parallelo di miglioramento della resistenza alla corrosione in soluzione acquosa di NaCl al 3.5% degli strumenti in acciaio e soprattutto permette di donare un attività antibatterica residua ai materiali trattati.

Dal punto di vista della sostenibilità ambientale, tra i gas utilizzati nelle prove sperimentali si è rivelato particolarmente efficace l'ossigeno, che è totalmente innocuo per la salute degli operatori ed ha impatto ambientale praticamente nullo.

È da evidenziare che i costi di produzione del prototipo sono stati assimilabili a quelli delle altre macchine in commercio, ed i costi di gestione della macchina saranno, invece, sensibilmente inferiori, in quanto essa non necessita di apparecchiature particolari come ad esempio cestelli o altri dispositivi per l'introduzione nella camera di reazione dei materiali da sterilizzare o del gas di scarica.

## Ringraziamenti

Un sincero grazie ai Prof. Bellucci e Monetta che mi hanno guidato in questi anni.

Ringrazio la fortuna che mi ha fatto trovare prima degli ottimi colleghi che si sono scoperti, poi, buoni amici Antonino, Cinzia, Ciro, Gaspare, Marco, Maria Giovanna.

Alle serate infrasettimanali ed inframatrimoniali, sempre accompagnati da zio Southern Comfort.

Ad Annalisa, Alessia, Michela e Valentina, che resteranno sempre le Tesiste.

Agli amici Antonello e <sup>Maria</sup>Gemi<sup>liana</sup>, alle ore di ascolto ed alle risate sincere.

A Mario, con cui ho condiviso tanto, perfino prima di conoscerlo.

A Valerio e Mimmo che non c'entrano nulla con lo studio.

A mia moglie.

## Riferimenti Bibliografici

1. D.A. Mendis, M. Rosenberg, F. Azam: A note on the possible electrostatic disruption of bacteria, IEEE Trans Plasma Sci 2000: 28: 1304-1306.
2. J. Wiley and son, Encyclopaedia of polymer Science and Engineering, 6 (1985).
3. EN ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method- Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test and inclusion of precision data.
4. EN ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method - Amendment 1: Modification of the enumeration medium.
5. J. Boor, Ziegler-Natta catalysts and polymerization, Academic Press, Inc. NY, (1979).
6. C.P. Klein, P. Patka, JG Wolke, JM De Blicck, K De Groot: Long-term in vivo study of plasma-sprayd coatings on titanium alloys of tetracalcium phosphate, hydroxyapatite, and alpha-tricalcium phosphate. Biomaterials 1994; 15 : 146-150
7. H. Saechtling, Manuale delle materie plastiche, Tecniche nuove ed., (1996).
8. S. Brückner, G. Allegra, M. Pegoraro, F. P. La Mantia, Scienza e tecnologia dei materiali polimerici, EdiSES, (2001).
9. R. Pietrabissa, Biomateriali per protesi e organi artificiali, Patron Editore, Bologna, (1996).
10. A.C. Maghetti, Messa a punto e validazione delle caratteristiche tecnologiche e farmaco-biologiche di materiali polimerici per uso medicale, Trieste, 2005.
11. E. De Santis, E. Romanini, La valutazione del risultato, Cap.18, L'artroprotesi totale dell'anca, edizione in CD-Rom, Vittorio Salvi Editore

12. V.S. Ivanov, Radiation Chemistry of Polymer, VSP Utrech, The Netherlands, (1992).
13. N.A. Halls, Gamma-irradiation processing in Irradiation Effects on Polymer, Eds. Clegg D. and Collyer A. Elsevier, Applied Science, New York, 253 (1991).
14. Artault, S., Bind, J.L., Delaval, Y., Dureuil, N., Gaillard, N. (2000) AFNOR Validation of the ALOA method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. Colloque de la Société Française de Microbiologie, Paris, 19-20 Octobre, 2000.
15. Bauwens L. Vercammen F. Hertsens A. (2003) Detection of *Listeria* spp. In zoo animal faeces: use of immunomagnetic separation and a chromogenic medium Vet. Microbiol. 91, 115-123
16. L. Sansone, Studio degli effetti dei nuovi metodi di trattamento sulle proprietà funzionali e strutturali dei materiali polimerici per il Food Packaging, Napoli, 2008
17. Beumer, L.L. (2001) Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes* ISO 11290-1. Change of Isolation Media. Wageningen University, The Netherlands.
18. Flamini, L., Rossi, I. Pondini, F. (1999) Conteggio rapido di *Listeria monocytogenes* per inclusione in terreno selettivo e differenziale (ALOA). Industrie Alimentari, XXXVIII, febbraio, 127.
19. Gracieux P., Roche S.M., Pardon P., Velge P. Hypovirulent *L.monocytogenes* strains are less frequently recovered than virulent strains on PALCAM and Rapid'L.mono media. Int. J. Food Microbiol. 83, 133-145.
20. Leclerq A. (2004) Atypical colonial morphology and low recovery of *L. monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mon and ALOA solid media. J. of Microbiological Methods, 57, 252-258.
21. Mioni R., Grimaldi M., Bordin, P., Miglioranzi, R., Ferrigno, R. (1998) Ricerca di *L.monocytogenes* negli alimenti. Valutazione di un nuovo terreno selettivo e

differenziale specie-specifico e di un sistema rapido d'identificazione. *Industrie Alimentari*, XXXVII, giugno, 732.

22. Moroder L (2002) Comparison of alternative methods for the enumeration of *Listeria monocytogenes* in food. FEMS-Symposium the Versatility of *Listeria* species. Izmir, October 10-11, 2002