

# UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



Dipartimento di Farmacia e Scienze  
della Salute e della Nutrizione

---

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
FARMACIA

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

## **Idrogel magnetici a base di Alginato ed Ossido di Grafene: caratterizzazione ed applicazioni in campo ambientale e farmaceutico**

### **RELATORI**

Prof. Fiore Pasquale NICOLETTA

Dott.ssa Manuela CURCIO

### **CANDIDATO**

Foca CARCHEDI

Matricola 216323

A handwritten signature in black ink, reading 'Foca Carchedi', is positioned below the candidate's name and matriculation number. The signature is written in a cursive style and is placed over a dotted horizontal line.

---

*Anno Accademico 2022/2023*

*“Non è la neve che causa l’inverno, ma l’inverno che causa la neve”.*

# INDICE

<b>Premessa</b>	pag. 1
-----------------	--------

## **CAPITOLO 1**

### **Introduzione**

Premessa	pag. 3
1.1 Il Grafene ossido	pag. 3
1.1.1 Proprietà del grafene	pag. 6
1.1.2 Metodi per la produzione del grafene	pag. 8
1.1.3 Applicazioni del grafene	pag. 12
1.1.4 Caratterizzazione dell'ossido di grafene	pag. 13
1.2 Sodio Alginato	pag. 16
1.2.1 Sodio alginato nel trattamento delle acque	pag. 17
1.2.2 Idrogel di SA per la medicazione delle ferite	pag. 19
1.2.3 Metodi di reticolazione	pag. 20
1.3 Ossido Ferrico	pag. 22
1.4 Blu di Metilene	pag. 25
1.4.1 Proprietà terapeutiche del MB	pag. 27

## **CAPITOLO 2**

### **Materiali e Metodi**

2.1 Sintesi degli idrogel	pag. 30
2.2 Procedura di caratterizzazione degli idrogel	pag. 31
2.2.1 Determinazione del grado di rigonfiamento	pag. 31
2.2.2 Analisi Calorimetrica	pag. 32

2.2.3 Analisi SEM	pag. 32
2.3 Studi di assorbimento all'equilibrio	pag. 33
2.4 Studi di rilascio del MB da parte dell'idrogel	pag. 33
2.5 Analisi statistiche	pag. 34

## **CAPITOLO 3**

### **Risultati e Discussione**

Premessa	pag. 35
3.1 Sintesi degli idrogel	pag. 35
3.2 Analisi calorimetrica	pag. 37
3.3 Caratterizzazione morfologica	pag. 38
3.4 Caratterizzazione degli idrogel	pag. 40
3.5 Isotherme d'assorbimento	pag. 44
3.6 Cinetiche d'assorbimento	pag. 49
3.7 Determinazione dei profili di rilascio	pag. 55

<b>Conclusioni</b>	pag. 59
--------------------	---------

<b>Bibliografia</b>	pag. 60
---------------------	---------

<b>Ringraziamenti</b>	pag. 66
-----------------------	---------

---

## Premessa

L'acqua dolce, in quanto risorsa naturale limitata, è essenziale per la sopravvivenza di tutti gli ecosistemi. Al giorno d'oggi, con il miglioramento degli standard di vita delle persone e lo sviluppo dell'industria moderna l'inquinamento idrico causato da varie attività umane (ad esempio agricoltura, industria, commercio, etc.) è diventato sempre più grave, determinando così una grave carenza di acqua dolce.

*"Today humanity is delivering a serious blow to nature, but it is clear that nature will deliver the final blow".*

*"Oggi l'umanità sta infliggendo un duro colpo alla natura, ma è chiaro che sarà la natura a dare il colpo finale".*

*Paul R. Ehrlich*

Tre strategie vengono comunemente utilizzate per la conservazione delle risorse di acqua dolce:

- 1) protezione delle risorse idriche e riduzione degli sprechi non necessari;
- 2) acquisizione di risorse di acqua dolce da altre fonti, come la desalinizzazione dell'acqua di mare e la raccolta dell'acqua atmosferica;
- 3) **purificazione e riciclaggio** delle acque reflue per migliorare il rapporto di utilizzo dell'acqua.

Polimeri funzionali, come gli idrogel, o matrici porose possono essere sfruttati per il trattamento delle acque [1].

Inoltre, gli idrogel possono essere impiegati come medicazioni multifunzionali, non solo in quanto possono fornire protezione fisica e mantenere il microambiente della ferita umido, ma anche per migliorare il processo di guarigione influenzando le varie fasi della riparazione della ferita. A tale scopo, farmaci, **nanoparticelle di ferro** o peptidi antimicrobici (ad esempio peptidi di difesa dell'ospite) sono spesso utilizzati contemporaneamente per controllare l'infezione e la proliferazione cellulare.

---

Gli idrogel magnetici (ferrogel) hanno un vantaggio rispetto ad altre matrici modificate in quanto hanno il potenziale per trattare volumi maggiori di inquinanti acquosi ad una velocità di filtrazione più rapida. Inoltre, rispondono a un campo magnetico esterno, facilitando così la separazione dell'idrogel dalla soluzione. Diversi ferrogel, come microsfere di chitosano/cellulosa, micro-adsorbenti magnetici carichi di Blu di Prussia per la rimozione di Cs, idrogel caricati con GO a ridotto contenuto magnetico per la rimozione di ioni Cr (VI), etc. hanno mostrato un significativo adsorbimento di diversi ioni di metalli pesanti. Questi gel magnetici hanno i vantaggi di poter regolare la dimensione dei pori, di facilitare la separazione e di presentare un'eccellente riutilizzabilità grazie alle loro proprietà magnetiche e all'applicazione di un campo magnetico esterno. Quindi la combinazione di nanomateriali e particelle magnetiche ha il potenziale di migliorare le caratteristiche delle matrici nel "*wastewater treatment*".

Scopo del presente lavoro di tesi è stato la progettazione, la realizzazione e la caratterizzazione di un sistema composito idrogel-nanoparticelle, responsive ad un duplice stimolo (magnetico-pH), da utilizzare nel trattamento delle acque valutando, inoltre, una possibile applicazione dello stesso sistema ad una gestione avanzata delle ferite. L'idrogel è stato realizzato da una reazione tra il sodio alginato (SA) ed il cloruro di calcio (agente reticolante) reticolato attraverso legami che si instaurano tra i blocchi ricchi di acido glucuronico dell'alginato ed i cationi bivalenti del cloruro di calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), con la conseguente formazione di ponti ionici e la reticolazione del polimero. Inoltre, nanoparticelle di ossido ferrico  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (elemento *magnetic-responsive*) e di ossido di grafene GO (elemento funzionale) sono state incorporate durante il processo di gelificazione al fine di ricavare un dispositivo sensibile al **duplice stimolo** magnetico-pH, e in grado di adsorbire gli inquinanti. Successivamente questi idrogel sono stati impregnati con una soluzione di blu di metilene (elemento antibatterico) al fine di ottenere un dispositivo modulabile in grado di rilasciare un agente terapeutico grazie all'azione di un campo magnetico esterno ed alla variazione del pH.

---

# CAPITOLO 1

## Introduzione

### Premessa

Gli idrogel sono stati recentemente studiati per il trattamento delle acque reflue. Queste reti polimeriche possono alterare i loro gruppi funzionali conferendo un'elevata affinità di legame per diversi contaminanti presenti nelle acque. La loro innata capacità di assorbire enormi volumi d'acqua li qualifica come materiali intelligenti per la bonifica delle acque [2]. In questa tesi vengono presentati diversi tipi di idrogel, con particolare enfasi sulla capacità di adsorbimento e di rilascio ed una prospettiva approfondita sui vantaggi ed i limiti dell'applicazione degli stessi nel trattamento delle acque reflue e nel campo biomedico.

L'idrogel realizzato nello studio ha come componenti principali il GO (elemento funzionale), il SA (polimero), l'ossido ferrico (elemento magnetic responsive) ed il Blu di Metilene (elemento antibatterico). Il sistema trae un sinergico beneficio dalle proprietà dei singoli componenti.

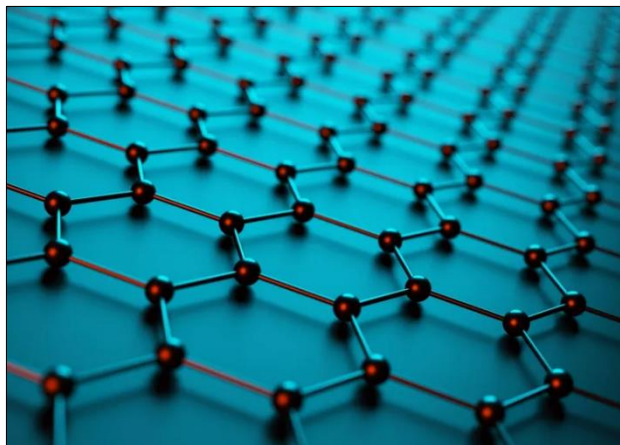
### 1.1 Il Grafene ossido

L'ossido di grafene (GO) ha applicazioni promettenti in molti campi come l'imaging cellulare, la somministrazione di farmaci, l'elettronica organica, i sensori molecolari, etc. [3]. Caratterizzato da una elevata resistenza chimica e fisica, eccellente trasparenza ed un ottimo trasporto termico ed elettrico, il grafene è al centro dell'interesse dei ricercatori di tutto il mondo proprio grazie alle sue molteplici caratteristiche ed applicazioni. La struttura di base ha conformazione planare e pertanto lo strato monoatomico si presenta come un materiale bidimensionale.

Composto da un reticolo di atomi di carbonio disposti a nido d'ape, il grafene è stato isolato per la prima volta da due fisici dell'Università di Manchester nel 2004. Questo materiale è costituito da uno strato di atomi di carbonio organizzati secondo una struttura cristallina a celle esagonali in cui ogni atomo di carbonio è caratterizzato da un

---

orbitale  $p_z$ , perpendicolare al piano degli orbitali  $sp^2$ , che contribuisce alla formazione di una nuvola elettronica delocalizzata (**Figura 1.1**).

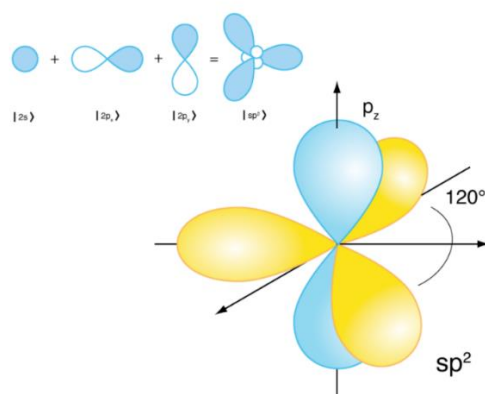


**Figura 1.1:** *Rappresentazione grafica della struttura atomica "2D" del Grafene [4].*

Il carbonio può organizzarsi in diverse forme, sorprendentemente diverse tra loro, nano-strutture puntiformi, bidimensionali o tridimensionali quali: i fullereni, sfere cave di carbonio, che sono strutture 0-dimensionali; i nanotubi di carbonio, vere e proprie strutture tubolari approssimabili a dei segmenti 1-dimensionali; il grafene quale piano bidimensionale; nonché la grafite, il carbone o il diamante come solidi tridimensionali.

Il carbonio ha sei protoni e sei elettroni: di questi i quattro elettroni di valenza occupano parzialmente gli orbitali  $2s$  e  $2p$  che hanno energie molto simili. Questi elettroni possono ibridizzarsi in modo diverso e dar luogo a strutture diverse. Nell'ibridizzazione  $sp^1$ , cioè quando un solo orbitale  $2s$  si ibridizza con uno  $2p$ , l'orbitale ibrido può instaurare un forte legame covalente con un altro atomo identico, creando la base per una catena di legami tutti uguali. Quando due orbitali  $2p$ , (che possiamo chiamare  $2p_x$  e  $2p_y$ ), si uniscono ad un orbitale  $2s$ , si parla di ibridazione  $sp^2$ , in cui ogni atomo ha a disposizione tre legami  $\sigma$  sul piano  $x-y$  (con cui può formare un reticolo a nido d'ape) ed in cui, solitamente, gli orbitali  $p_z$  si uniscono in un legame  $\pi$  delocalizzato sopra e sotto il piano  $x-y$  [5] (**Figura 1.2**).

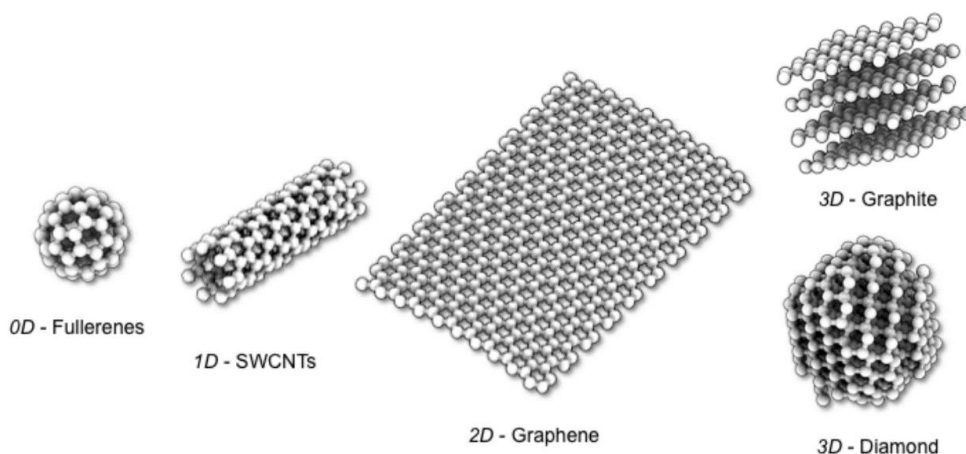




**Figura 1.2:** Rappresentazione grafica degli orbitali ibridizzati  $sp^2$  [6].

Questo è il caso della grafite, nella quale tanti reticoli bidimensionali a nido d'ape sono tenuti insieme uno sull'altro tramite una debole interazione di van der Waals [7]. Nell'ibridizzazione  $sp^3$ , gli orbitali si dispongono a tetraedro e l'atomo di carbonio così ibridizzato può legarsi fortemente ad altri quattro atomi, formando un cristallo cubico che costituisce il diamante.

Il legame formato dagli orbitali  $sp^2$  è alla base delle nanostrutture di carbonio [8,9] (**Figura 1.3**).



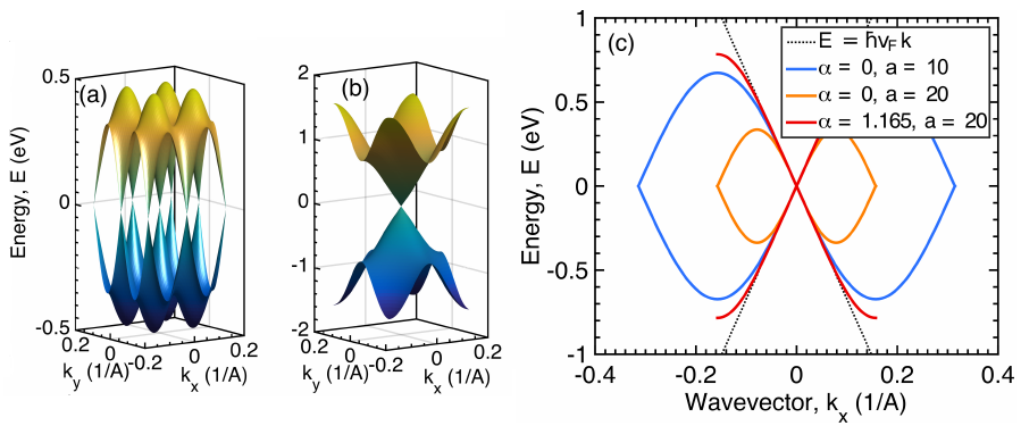
**Figura 1.3:** Rappresentazione della struttura atomica delle diverse nanostrutture del carbonio [10].

Il **GO** ha la struttura esagonale del grafene, ma contiene anche gruppi ossidrilici (OH), alcossi (CO--), carbonili (C=O), carbossilici (--COOH) ed altri gruppi funzionali a base di ossigeno. A parte la facilità di sintesi, questi gruppi ossigenati sono responsabili di

molti vantaggi rispetto al grafene, tra cui una maggiore solubilità e la possibilità di funzionalizzazione superficiale, tutte caratteristiche che hanno offerto numerose opportunità ed applicazioni in materiali nanocompositi [11].

### 1.1.1 Proprietà del Grafene

Le proprietà del grafene sono correlate alla sua struttura atomica. Sebbene teoricamente sia uno dei materiali con la mobilità elettronica più alta esistente in natura, grazie alla particolare struttura delle sue bande di energia (**Figura 1.4**), in pratica il materiale presenta spesso difetti reticolari che causano notevoli differenze sperimentali nelle sue proprietà elettriche.



**Figura 1.4:** Bande energetiche del grafene [12].

### Proprietà elettriche

La mobilità elettronica del grafene può arrivare fino a  $40.000 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ , a fronte dei  $1000 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  del silicio elemento che viene utilizzato nei comuni dispositivi elettronici [13], [14]. Alcuni esperimenti hanno dimostrato che l'assenza di un substrato come nel caso dei cristalli di grafene sospesi tra due elettrodi, permette di ottenere, a temperatura ambiente, valori di mobilità vicini al limite teorico di  $200.000 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  e superiore a quello di  $100.000 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  previsto per i nanotubi di carbonio [15].

Il processo di sintesi del grafene ossido provoca l'interruzione della continuità degli orbitali di legame  $sp^2$  e l'aggiunta di abbondanti gruppi superficiali che ne riducono la conduttività elettrica [16].

---

## Proprietà termiche

Il grafene è un perfetto conduttore termico. La conducibilità termica, a temperatura ambiente, del grafene risulta essere tra  $(4,84 \pm 0,44)$  e  $(5,30 \pm 0,48) 10^3 \text{ W/m K}$  ed è molto più alta di tutti i valori osservati per le strutture carboniose come nanotubi, grafite, diamante [17].

Il GO ottenuto a partire dalla grafite ha una bassa conduttività termica  $0,5\text{-}1 \text{ W/m K}$  il che lo rende un'opzione ideale per altre applicazioni ove è utile fornire elevate proprietà di isolamento termico, come nell'isolamento domestico e nei ritardanti di fiamma[18]. Il GO ha recentemente dimostrato di essere un riempitivo efficace per migliorare le proprietà ignifughe di vari nanocompositi polimerici [19].

## Proprietà Meccaniche

Il grafene è un materiale dotato di un elevato *modulo di Young*, che è una misura di quanto sia difficile allungare o comprimere un materiale [20]. In uno studio recente, sono stati determinati per un campione di grafene un valore del modulo di Young di  $(2,4 \pm 0,4) \text{ TPa}$  per uno strato singolo [21] e di  $(2,0 \pm 0,5) \text{ TPa}$  per uno strato doppio [22].

Il numero di gruppi superficiali e di difetti residui dall'ossidazione o da altri processi di trattamento influenzano notevolmente i valori del modulo di Young. *Suk et al.* hanno riportato GO monostrato (prodotto da un metodo di Hummer modificato) con un modulo di Young di  $207,6 \pm 23,4 \text{ GPa}$ , un calo notevole dell'ordine di grandezza, ma ancora notevolmente elevato [23]. I nanocompositi polimerici traggono grande beneficio dall'uso del GO e dei suoi derivati come riempitivi. Ad esempio, *Cheng-an et al.* [24] hanno studiato gli effetti del GO nei film di alcol polivinilico (PVA) e trovato che un 20% di GO è in grado di aumentare la resistenza alla trazione del nanocomposito a  $59,6 \text{ MPa}$ , più di cinque volte la resistenza del film di PVA puro.

## Proprietà magnetiche e paramagnetiche

Le proprietà magnetiche dei materiali a base di grafene hanno attirato molta attenzione perché hanno applicazioni promettenti come magneti con peso leggero senza il coinvolgimento di metalli  $3d$  o  $4f$  [25]. In particolare, la mobilità regolabile e il lungo tempo di rilassamento della rotazione rendono questi materiali piuttosto attraenti per i di-

---

spositivi spintronici di prossima generazione [26]. All'interno del grafene sono presenti domini ferromagnetici prevalenti che coesistono con domini antiferromagnetici [27]. Il grafene è intrinsecamente non magnetico in quanto tutti gli elettroni esterni negli anelli esatomici di carbonio sono perfettamente accoppiati per prendere forma in legami  $\sigma$  e  $\pi$ . Quando gli spin periodici sul piano del grafene sono abbastanza vicini da interagire tra loro, si crea un ammasso magnetico o un ordinamento magnetico. Nell'ultimo decennio, tali previsioni teoriche sono state verificate da due risultati sperimentali:

- 1) l'introduzione di difetti puntiformi può indubbiamente ed efficacemente indurre i momenti magnetici nel grafene;
- 2) gli spin distribuiti nei diversi siti sul piano basale del grafene possono accoppiarsi (anti)ferromagneticamente per formare cluster di spin.

Sebbene il controllo preciso della distribuzione di spin abbondanti nel grafene sia ancora impegnativo, l'applicazione spintronica di materiali a base di grafene è promettente [28].

L'**ossido di grafene** è solo paramagnetico [29]. Il paramagnetismo deriva da atomi, molecole o ioni che possiedono un momento magnetico permanente associato a spin di elettroni spaiati (atomi o ioni della maggior parte dei metalli di transizione e radicali). La polarizzazione paramagnetica consiste quindi nell'allineamento di tali dipoli magnetici che hanno orientamenti casuali in condizioni normali [30]. Il paramagnetismo viene sfruttato in molteplici campi, dalla chimica alla fisica, dalla medicina alla tecnologia. Ad esempio, viene usato per **separare i metalli nella lavorazione dei rifiuti**, in quanto i materiali paramagnetici possono essere separati da quelli diamagnetici (che non sono influenzati dal campo magnetico).

### 1.1.2 Metodi per la produzione del grafene

Il grafene può essere funzionalizzato da diversi gruppi chimici, come ad esempio -OH, formando **grafene ossido**. La grafite cristallina è utilizzata per la sintesi dell'ossido di grafene, viene ricavata da miniere e dopo un processo di purificazione presenta un contenuto di carbonio compreso tra il 94 ed il 99%. La grafite tipicamente usata nelle applicazioni industriali viene chiamata grafite HOPG (Highly Oriented Pyrolytic Graphite).

---

La sua principale caratteristica è di avere una sequenza ordinata dei piani di grafene che si sormontano distanziati di circa 0,335 nm, mentre la distanza interatomica tra atomi dello stesso piano è di 0,142 nm.

In questa sequenza strutturata, chiamata AB Stacking Order, i piani si ripetono in una sequenza ABAB in cui i piani di grafene si alternano in posizioni sfalsate [31]. Gli strati sovrapposti della grafite sono tenuti insieme da legami di tipo van der Waals con energie di circa 2 eV/nm<sup>2</sup> che la rendono facilmente sfaldabile in direzione parallela al piano cristallino applicando forze contenute nell'ordine dei 300 nN/mm<sup>2</sup>.

Tra i metodi che vengono più spesso applicati per la produzione del grafene, si annoverano:

- L'esfoliazione meccanica di tipo fisico;
- La crescita supportata da substrati;
- L'esfoliazione in un solvente;
- La sintesi chimica.

### **Esfoliazione Meccanica di tipo Fisico**

La tecnica più utilizzata, definita dello "scotch-tape", consiste nel porre un cristallo di grafite sul nastro adesivo, staccarlo ed esfoliare così alcuni strati di materiale. Il nastro con la grafite residua viene quindi ripiegato e srotolato per diverse volte. Ad ogni ripetizione i fiocchi si dividono in strati sempre più sottili che, infine, possono essere trasferiti su un substrato. I campioni preparati con questa tecnica presentano caratteristiche elettriche e meccaniche elevate che risultano utili per la ricerca di base sulle sue proprietà, ma non possono essere applicati ad una produzione industriale [32],[33].

### **Crescita Supportata da Substrati**

La tecnica che consente la crescita del materiale su substrati metallici viene definita CVD (Chemical Vapour Deposition), e generalmente impiega nichel (Ni) o rame (Cu), utilizzando una miscela di idrocarburi precursori, come il metano o l'etilene in presenza di H<sub>2</sub> ad una temperatura compresa tra 700 e 1000 °C. Nella prima fase del processo il carbonio, che viene condotto da un flusso gassoso controllato di idrocarburi ed idrogeno, diffonde nel substrato metallico. Nella fase successiva il sistema viene raf-

---

freddato causando la segregazione del carbonio sulla superficie. Infine è possibile staccare il piano di grafene e trasferirlo su un'altra superficie utilizzando la tecnica dell'etching chimico.

### **Esfoliazione da Solvente**

Le tecniche di esfoliazione chimica e meccanica, a differenza di quelle di sintesi su substrati chiamate anche bottom-up, consistono nella separazione dei singoli piani di grafite per ottenere il singolo strato di grafene su larga scala. Per queste ragioni queste tecniche sono chiamate top-down [34].

L'esfoliazione chimica in fase liquida sfrutta processi chimici allo scopo di separare singoli strati di grafene a partire da una sospensione di grafite in polvere all'interno di un solvente. La procedura è differente in funzione dell'utilizzo del sonificatore ed alla tipologia di solvente impiegato. Sebbene possa essere impiegata a livello industriale il prodotto ottenuto attraverso questa tecnica si presenta di bassa qualità e contaminato.

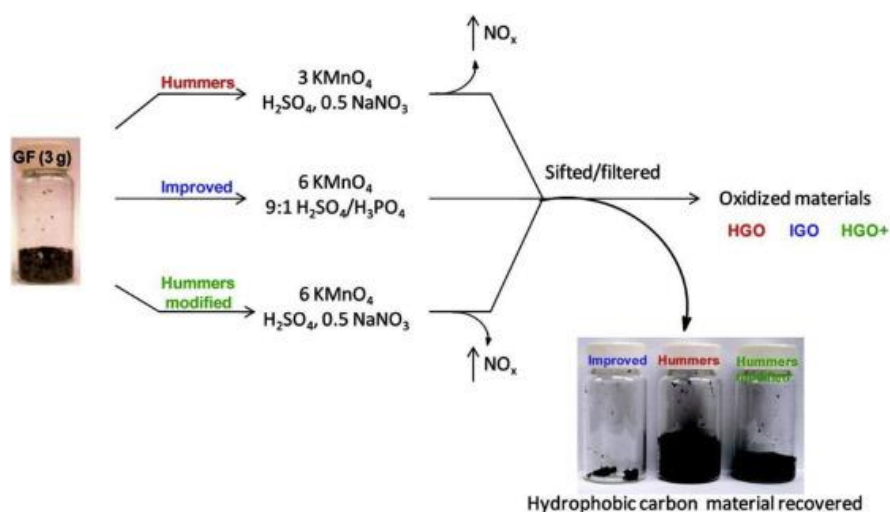
La tecnica più utilizzata impiega polvere di grafite dispersa in un solvente appropriato: quest'ultimo penetra tra i piani della grafite allontanandoli. A questo punto si sottopone il composto ad ultrasonicazione in modo da separare i piani della grafite, e la presenza del solvente impedisce che si uniscano nuovamente. L'ultimo passaggio è quello di separare i vari componenti della soluzione attraverso centrifugazione in gradiente di densità o di altro tipo.

L'intercalazione di metalli alcalini, o atomi differenti, tra i piani di polvere di grafite sospesa in soluzione, rappresenta un'evoluzione della tecnica dell'esfoliazione chimica, proposta in una pubblicazione da Kanel et. al. [35]. Il potassio viene intercalato tra i layer di grafite permettendo la sintesi di diversi strati di grafene. Infatti, il vantaggio dei metalli alcalini è che il loro raggio ionico è inferiore alla distanza interplanare tra i layer di grafene, facilitando notevolmente la loro intercalazione.

Quando il potassio viene mescolato in atmosfera d'elio inerte con la polvere di grafite sotto i 200°C, forma composti di  $KC_8$  tra un piano e l'altro. Questo composto subisce una reazione esotermica quando entra in contatto con delle soluzioni acquose di etanolo ( $CH_3CH_2OH$ ), generando così sale di potassio e idrogeno, processo che induce la separazione dei piani. La soluzione ottenuta viene poi lavata e purificata per ottenere il prodotto finale.

## Sintesi Chimica

B. C. Brodie utilizzò clorato di potassio e acido nitrico fumante su *grafite a fiocchi* come composto di partenza. Quello che ottenne fu un materiale a cui diede il nome di *Graphon*, che si disperdeva facilmente in acqua pura e basica, ma non in ambiente acido. Si deve ad Hummers, che perfezionò la tecnica di sintesi, il metodo su cui oggi si basano la maggior parte delle sintesi del GO. La procedura, che viene utilizzata dal 1971, prevede l'utilizzo di grafite HOPG, che viene ossidata con acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrato, acido nitrico ( $\text{HNO}_3$ ) e permanganato di potassio ( $\text{KMnO}_4$ ). Grazie a questi trattamenti si ha la formazione di legami con gruppi ossidrilici e carbossilici sui layer di grafene che lo rendono idrofilo e facilmente esfoliabile in acqua o solventi polari [36]. Successivamente, generalmente mediante l'utilizzo dell'idrazina, si esegue una fase di riduzione ed una di disidratazione per poter ricavare il grafene ridotto. Sebbene, attraverso questo metodo la resa di nanoparticelle è inferiore rispetto alle altre tecniche e la sua esecuzione prevede l'utilizzo di solventi tossici e corrosivi [37,38]. Una panoramica dei metodi più diffusi è riportata in **Figura 1.5** [39].



**Figura 1.5:** Metodi più comuni di sintesi del GO [39].

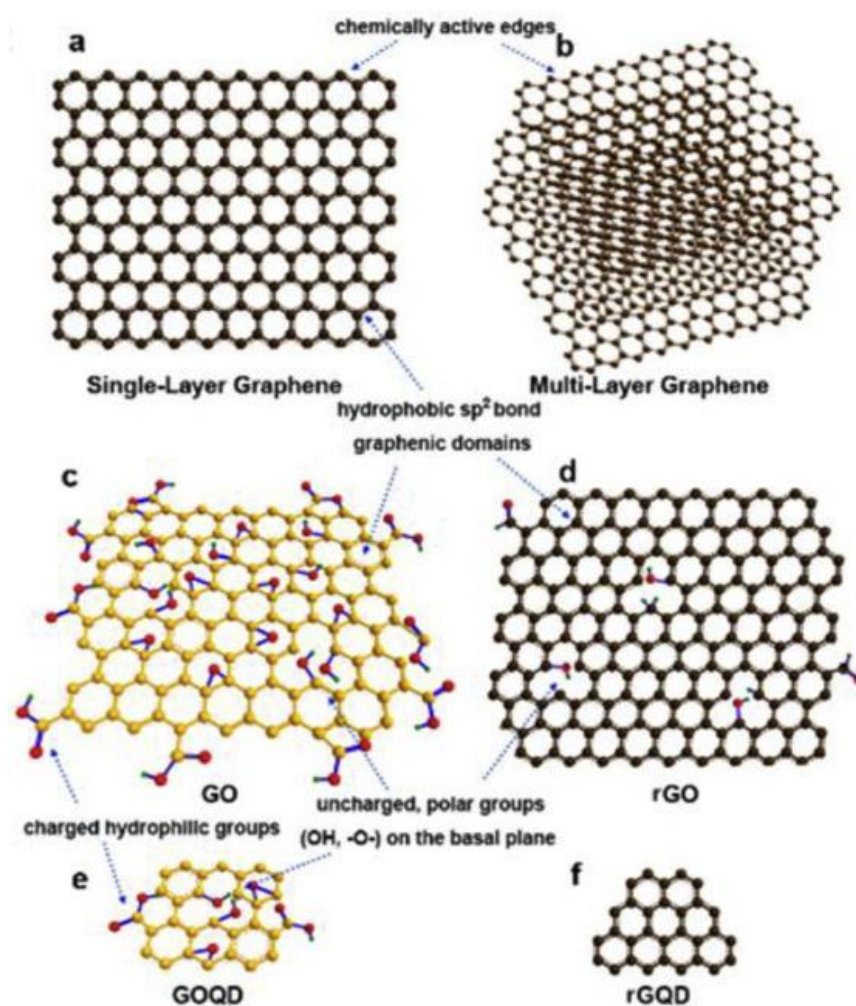
La struttura ideale del GO è il grafene a strato singolo costituito da un singolo atomo sottile completamente ibridato  $\text{sp}^2$  di carbonio con difetti minimi (**Figura 1.6A**). Tuttavia, a causa dell'impilamento altamente favorevole dei fogli di grafene, verrà generata anche una struttura multistrato (**Figura 1.6B**). La sintesi di queste strutture con un approccio bottom-up si è dimostrata difficile per le applicazioni industriali. Pertanto,

con un approccio top-down, è più facile generare la forma altamente ossidata del grafene, GO, con gli atomi di carbonio ibridati  $sp^2$  ed  $sp^3$ , contenente abbondanti gruppi di ossigeno (**Figura 1.6C**) [39].

### 1.1.3 Applicazioni del grafene

#### Trasporto di gas

Le membrane a base di GO hanno trovato ampia applicazione nei nanocompositi come barriera impermeabile per i gas [40]. I riempitivi 2D possono essere orientati in una matrice polimerica per creare un percorso "tortuoso" per intrappolare le molecole di gas.



**Figura 1.6:** Forme di grafene e suoi derivati: (A) grafene monostrato, (B) grafene multi-strato, (C) GO, (D) rGO (forma ridotta), (E) GOQD, (F) rGQD [39].

#### Trattamento delle acque



---

Le membrane GO sono ampiamente considerate materiali promettenti per l'applicazione nel trattamento delle acque per la loro elevata permeanza e stabilità [41]. Ad esempio, *Thebo et al.* hanno fabbricato fogli di GO su supporti PES modificati con polidopamina, utilizzando acido tannico e teanina come agenti reticolanti. Queste membrane hanno dimostrato una permeabilità all'acqua superiore a  $10.000 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$  con reiezione di  $\sim 100\%$  per rodamina B e blu di metilene. In genere, le membrane GO non trovano applicazione nel trattamento dell'acqua, come la desalinizzazione. La spaziatura tra gli strati di GO può aumentare da 7,76 a 17,63 Å rispettivamente in condizioni asciutte e idratate [42]. Pertanto, i diametri degli ioni idrati dei sali comuni sono inferiori a questo valore idratato, portando a una scarsa reiezione del sale da parte delle membrane GO [43].

#### 1.1.4 Caratterizzazione dell'ossido di grafene

Tra le tecniche di caratterizzazione del GO troviamo:

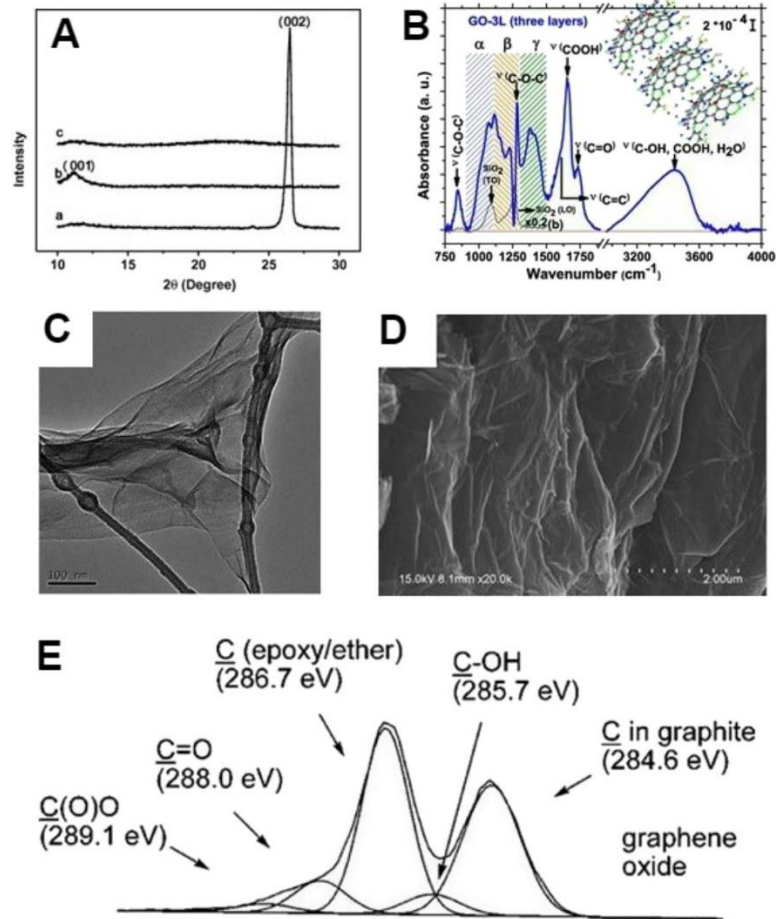
##### **Diffrazione dei raggi X (X-Ray Diffraction, XRD)**

La diffrazione dei raggi X (XRD) è forse la tecnica più comunemente utilizzata per caratterizzare il GO. Questo metodo si basa sull'osservazione dell'intensità dei raggi X diffusi in funzione dell'angolo di diffusione [44]. L'XRD fornisce informazioni sull'impilamento di grafite e GO ed è stato utilizzato per stimare quantitativamente il grado di esfoliazione. Tipici diffrattogrammi di grafite, GO ed ossido di grafite ridotto (rGO) sono mostrati in **Figura 1.7 A**. La grafite ha un forte picco di diffrazione a  $2\theta = 26,52^\circ$ , che rappresenta una distanza tra gli strati (*spaziatura d*) di 0,34 nm come valutato dall'equazione di Bragg. Questo picco scompare in GO e ne appare uno nuovo ad un valore di  $2\theta$  più piccolo (maggiore spaziatura tra i fogli). Il valore di  $2\theta$  di questo picco GO dipende dal metodo di preparazione e dalla presenza o meno di acqua [45].

##### **Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)**

FTIR è particolarmente utile nell'identificare le diverse funzionalità dell'ossigeno nel GO. Ad esempio, gli spettri FTIR di GO a tre strati, a temperatura ambiente, mostrati in **Figura 1.7 B**, rivelano la presenza di modi vibrazionali per gli ossidrili a  $3000\text{-}3700 \text{ cm}^{-1}$ , carbonili a  $1750\text{-}1850 \text{ cm}^{-1}$ , carbossili a  $1650\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$ , C=C ibridizzati  $\text{sp}^2$  (*in-plane stretching*) a  $1500\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$  ed epossidi a  $1280\text{-}1320$  e  $800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ . Per il GO

multistrato, i chetoni e/o i carbossili si trovano all'interno dell'intervallo di frequenza sovrapposto di 700-1900  $\text{cm}^{-1}$ , per C=C ibridizzati  $\text{sp}^2$  (*in-plane stretching*) si trova a  $\sim 1550\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  ed infine gli epossidi si trovano approssimativamente a 1.350 e 800-900  $\text{cm}^{-1}$ [45].



**Figura 1.7:** A) XRD di grafite (a), GO (b) e rGO (c). (B) Spettro di assorbanza infrarossa di GO (tre strati) a temperatura ambiente. (C) Immagine TEM di GO. (D) Immagini SEM di GO. (E) Spettri XPS [45].

### Microscopia elettronica

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è uno strumento utile per caratterizzare i fogli di ossido di grafene a strato singolo-multistrato. La TEM utilizza elettroni che passano attraverso il campione, con contrasto derivante dalla differenza di densità elettronica; come conseguenza, i fogli multipli appaiono più scuri se confrontati ai sin-

---

goli fogli. Le immagini TEM di GO esfoliato ad ultrasuoni mostrano una tipica morfologia rugosa (**Figura 1.7 C**). In altri studi, l'analisi TEM ha mostrato fogli di GO con una morfologia arricciata o con i bordi del foglio arrotolati e piegati leggermente.

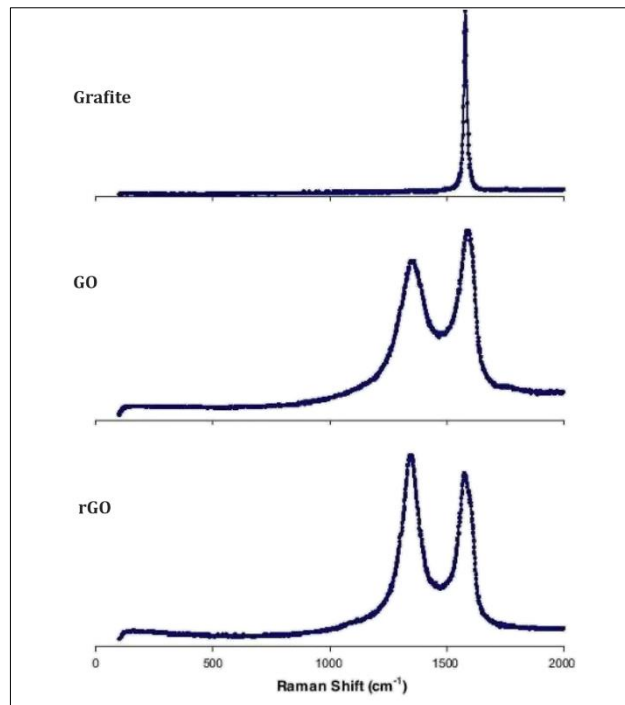
Le immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) sono il risultato degli elettroni secondari emessi dal campione. La topologia e le dimensioni laterali del campione possono essere analizzate, ma può essere difficile quantificare lo spessore del foglio. Le immagini SEM tipiche del GO mostrano morfologie di nanofogli 2D con trame rugose e piegate (**Figura 1.7 D**) con bordi a volte irregolari, superfici ruvide ed accartocciature. L'analisi SEM ha mostrato fogli di GO con dimensioni laterali sia grandi, fino 200  $\mu\text{m}$ , quanto piccoli, pochi micron, nello stesso campione di GO [45].

### **Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)**

La XPS focalizza i raggi X sulla superficie di un campione e misura il numero e l'energia cinetica degli elettroni foto-emessi, per determinare la composizione elementare della superficie. È una tecnica comune negli studi sul GO e viene impiegata per analizzare la sua composizione elementare. L'analisi XPS è stata utilizzata per determinare la composizione atomica e il rapporto C/O di GO [45].

### **Spettroscopia Raman**

La spettroscopia Raman è uno strumento ampiamente utilizzato per la caratterizzazione dei prodotti del carbonio, in gran parte perché i legami carbonio-carbonio coniugati e doppi portano ad alte intensità Raman. I significativi cambiamenti strutturali che si verificano durante l'ossidazione della grafite incontaminata a GO, spesso seguita dalla riduzione di GO a rGO, si riflettono negli spettri Raman (**Figura 1.8**). Lo spettro Raman della grafite pura mostra un picco G prominente a  $1.581\text{ cm}^{-1}$ , corrispondente allo scattering del primo ordine. In GO, la banda G viene allargata e spostata a  $1.594\text{ cm}^{-1}$  e risulta una banda D a  $1.363\text{ cm}^{-1}$  a causa della riduzione nelle dimensioni del dominio  $\text{sp}^2$  in-plane [45].

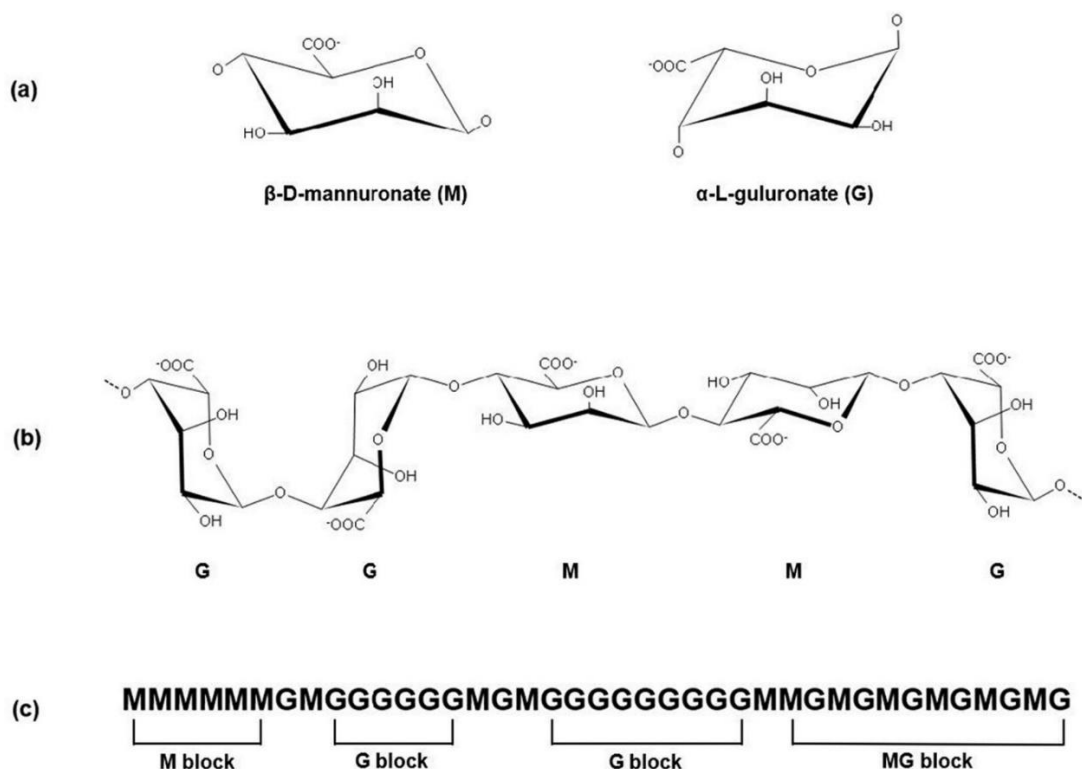


**Figura 1.8:** Spettri Raman della grafite, del GO e dell'rGO [45].

## 1.2 Sodio Alginato

L'alginato è un polisaccaride lineare (non ramificato), anionico, solubile in acqua e naturale in quanto derivato da alghe brune o batteri. È una catena polisaccaridica anionica lineare composta da residui di acido  $\alpha$ -L-guluronico (G) legati con legame 1,4-glicosidico a residui di acido  $\beta$ -D-mannuronico (M) in proporzioni e disposizioni sequenziali diverse (**Figura 1.9**).

Essendo un materiale bioattivo abbondante in natura, l'alginato di sodio (SA) è stato ampiamente utilizzato nella gestione dell'acqua grazie alla sua eccezionale capacità di assorbimento e tenuta dell'acqua, alla proprietà di rigonfiamento reversibile e alle prestazioni di adsorbimento degli inquinanti. Inoltre, è ampiamente utilizzato in campo biomedico ed ingegneristico grazie alla sua buona biocompatibilità e capacità di assorbimento dei liquidi. Gli idrogel a base di alginato sono stati utilizzati per decenni nelle medicazioni delle ferite, nell'ingegneria tissutale e nelle applicazioni per la somministrazione dei farmaci [46,47].



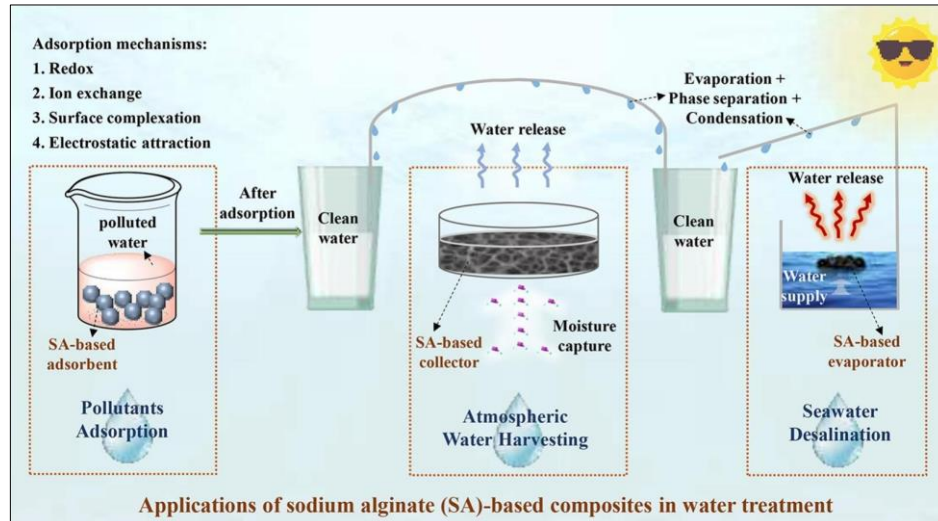
**Figura 1.9:** Caratteristiche strutturali dell'alginato: (a) unità monomeriche costituenti: mannuronato (M) e guluronato (G); (b) conformazione della catena; (c) distribuzione in blocchi. (Blocco G: blocco dell'acido guluronico; Blocco M: blocco dell'acido mannuronico; MG block: alternanza di acido guluronico e blocco dell'acido mannuronico) [48].

### 1.2.1 Sodio alginato nel trattamento delle acque

La crisi globale dell'acqua dolce è un problema urgente, soprattutto nelle aree con scarse precipitazioni e nelle regioni continentali interne. La crescente attenzione alla scarsità d'acqua ha indotto un grande interesse per la ricerca sulle tecnologie avanzate per il trattamento delle acque. Il SA viene largamente utilizzato nell'adsorbimento e nella separazione degli inquinanti nelle acque reflue utilizzando assorbenti basati sullo stesso e nella raccolta di acqua dolce da parte di collettori (**Figura 1.10**).

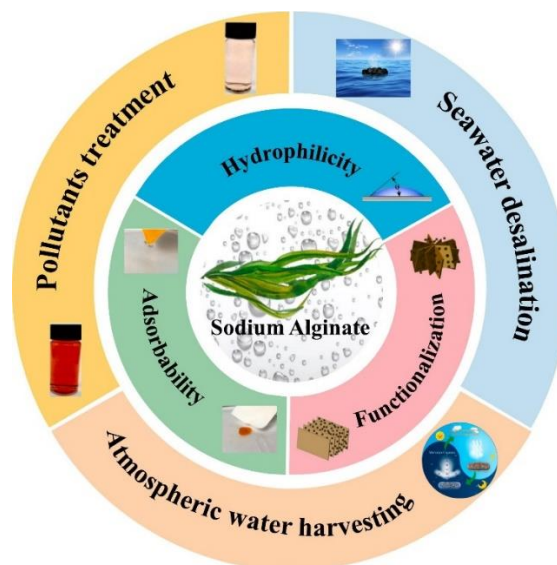
I gruppi contenenti ossigeno (ad esempio,  $-\text{OH}$  e  $-\text{COONa}$ ) presenti sulla struttura del SA ne facilitano la modifica chimica. Beneficiando delle sue proprietà di idrofilia, biocompatibilità, tolleranza al sale, non tossicità, abbondanza ed economicità [49], i composti a base di SA hanno una grande applicazione come adsorbenti per la rimozione di inquinanti, come mezzo di trasmissione per la generazione di vapore solare interfacciale e come serbatoio per la raccolta dell'acqua atmosferica. Inoltre, la ricerca basata

sulla progettazione funzionale di SA è stata ampiamente condotta per risolvere alcuni inconvenienti intrinseci tra cui basse aree superficiali, scarsa stabilità, strutture rigide non porose e debole resistenza meccanica.



**Figura 1.10:** Applicazioni del SA e dei suoi composti nel trattamento delle acque [46].

L'applicazione di composti avanzati a base di SA trova spazio in vari campi come la separazione olio-acqua, la raccolta di acqua dolce, l'adsorbimento di inquinanti dovuti alla produzione industriale ed agricola, di metalli pesanti e metalloidi, di coloranti, di pesticidi, di fertilizzanti, di antibiotici etc. (Figura 1.11).



**Figura 1.11:** Applicazioni dei composti a base di alginato di sodio nella produzione di acqua pulita [46].

---

### 1.2.2 Idrogel di SA per la medicazione delle ferite

La guarigione delle ferite è un processo complicato e continuo, influenzato da diversi fattori ed ha bisogno di un ambiente appropriato perché avvenga in tempi brevi. Attualmente, per la gestione delle ferite vengono utilizzate varie medicazioni come fibre, spugne, idrogel, schiume, idrocolloidi e così via. Gli idrogel possono fornire supporto meccanico e ambiente umido alle lesioni e sono ampiamente utilizzati in campo biomedico.

In passato le nozioni tradizionali suggerivano che le ferite dovessero essere conservate in un ambiente asciutto, ma *George Winter* propose il concetto di guarigione umida. Quando una ferita è esposta all'umidità, l'attività delle cellule e degli enzimi aumenta, accelerando la proliferazione del tessuto di granulazione e promuovendo rapidamente la guarigione della ferita. Questa teoria ha rivoluzionato il campo della gestione delle ferite e l'obiettivo della ricerca sulle medicazioni è cambiato passando dai tradizionali prodotti ad asciugatura passiva ai materiali idratanti attivi.

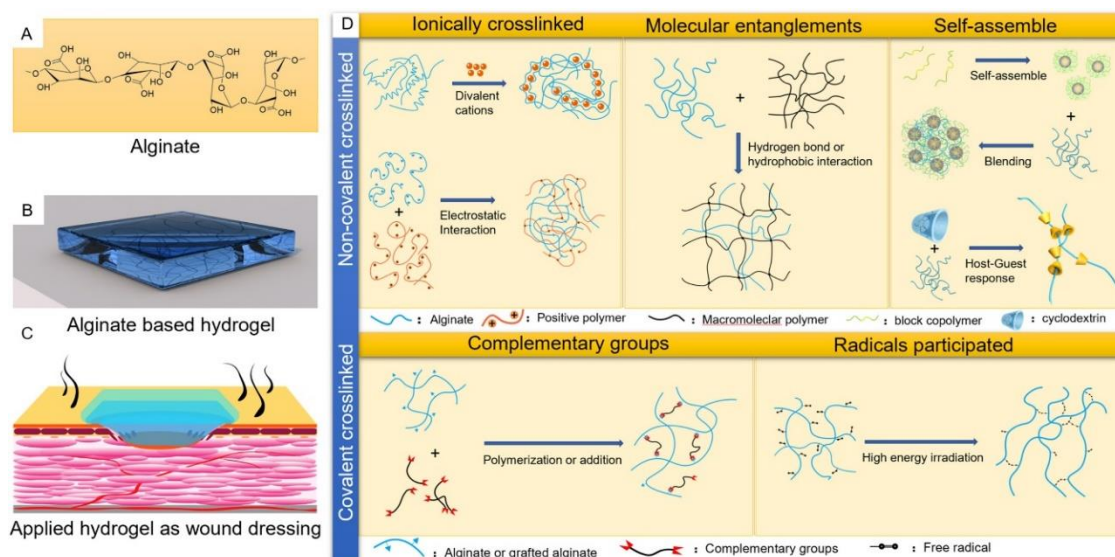
Le medicazioni ideali per ferite dovrebbero presentare le seguenti caratteristiche: (1) arrestare l'emorragia, alleviare il dolore e fornire protezione meccanica; (2) assorbire l'essudato in eccesso e mantenere umida la ferita, sciogliere il tessuto necrotico e la fibrina; (3) facilitare l'adesione alla pelle sana, ma non al tessuto di granulazione neoformato, per evitare lesioni secondarie durante la sostituzione della medicazione; (4) essere permeabile al vapore acqueo e ai gas; (5) ridurre il rischio di infezione; (6) migliorare la guarigione, accelerare la formazione del tessuto di granulazione e il tasso di riepitelizzazione; (7) essere biocompatibile e non tossico.

In base alle caratteristiche e alle esigenze delle ferite, sono state sviluppate una serie di medicazioni in polimeri naturali e sintetici. Film, idrogel, idrocolloidi, schiume e idrofibre sono opzioni di medicazione che trattengono l'umidità. Tra i vari biopolimeri, l'idrogel di alginato è stato ampiamente studiato come materiale per la medicazione delle ferite.

L'idrofilia, l'eccellente biocompatibilità e l'enorme capacità di assorbimento dei liquidi rendono l'alginato un materiale interessante per le medicazioni delle ferite. In particolare, l'alginato può attivare i macrofagi e stimolare i monociti a produrre interleuchina-6 (IL-6) ed il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) per accelerare la guarigione delle ferite.

### 1.2.3 Metodi di reticolazione

Le reticolazioni chimiche e fisiche dell'alginato sono (**Figura 1.12**) utilizzate per produrre idrogel. Le proprietà fisico-chimiche del prodotto finale dipendono fortemente dal tipo di struttura iniziale, insieme al peso molecolare ed alla composizione dell'alginato. Esistono vari approcci per la preparazione degli idrogel reticolati.



**Figura 1.12:** (A) Struttura dell'alginato. (B) Idrogel di alginato. (C) Idrogel di alginato applicato su una ferita. (D) Diversi approcci di reticolazione [47].

### Reticolazione non covalente

Gli idrogel di alginato reticolato in modo non covalente sono solitamente innescati dal congelamento, da un valore di pH più basso, da polimeri anionici e cationici. Le interazioni interne sono relativamente deboli come l'interazione elettrostatica, il legame idrogeno e l'interazione idrofobica. In questo modo, la forza della rete di idrogel può essere modificata dal pH, dalla temperatura o dal solvente organico.

### Reticolazione ionica

La reticolazione ionica crea un ponte all'interno della rete polimerica. L'alginato ha la caratteristica di far interagire le unità G con cationi bivalenti, come i cationi in soluzione, tramite un modello "egg-box", con conseguente formazione di una rete di gel insolubili. La capacità gelificante e la resistenza meccanica dell'idrogel di alginato possono essere regolate variando il rapporto M/G relativo alle unità di acido  $\beta$ -D-mannu-



---

ronico (M) rispetto alle unità di acido  $\alpha$ -L-guluronico (G). L'alginato può anche reticolare con altre molecole ioniche attraverso interazioni elettrostatiche. Gli idrogel reticolati ionicamente hanno una caratteristica di rigonfiamento dipendente dal pH, in quanto la reticolazione ionica è reversibile.

### **Entanglement molecolare**

L'entanglement molecolare è un altro metodo importante per formare idrogel non covalenti, che sono comunemente generati dal congelamento-scongelo o dai legami idrogeno.

### **Autoassemblaggio**

Le interazioni fisiche spontanee auto-assemblanti vengono ampiamente utilizzate nella formazione di reti fisiche. Un'ampia gamma di molecole, tra cui peptidi, polimeri termicamente reattivi e polimeri *guest-host*, può formare strutture reticolate. Questi polimeri *smart-blocks* possiedono la capacità di auto-assemblaggio o di riconoscimento molecolare in risposta a cambiamenti ambientali esterni e inducono la gelificazione del loro copolimero in soluzione acquosa.

### **Reticolazione covalente**

Gli idrogel reticolati covalentemente di solito hanno reti ad alta resistenza meccanica perché i legami covalenti sono irreversibili. I legami covalenti aiutano anche a mantenere l'acqua e i farmaci all'interno della rete senza interferire con l'integrità meccanica. L'alginato ha gruppi funzionali come -COOH ed -OH, e quindi può essere utilizzato per la formazione di idrogel covalenti. Gli idrogel di alginato reticolato covalentemente possono essere sintetizzati tramite varie reazioni, tra cui polimerizzazione, addizione, click chemistry o irradiazioni ad alta energia (raggi gamma o fasci di elettroni). Tuttavia, per l'eliminazione di questi idrogel impiantati nel corpo umano è necessaria la degradazione chimica o altre strategie.

### **Idrogel ibridi di alginato**

Insieme agli idrogel reticolati non covalenti e covalenti, gli idrogel ibridi possono essere fabbricati da diversi materiali polimerici utilizzando una combinazione di tecniche di reticolazione fisiche e chimiche. L'idrogel ibrido può conferire nuove funzioni agli

---

idrogel tradizionali, quali migliori proprietà meccaniche e biologiche per imitare il microambiente necessario alla riorganizzazione delle cellule e dei tessuti.

### 1.3 Ossido Ferrico

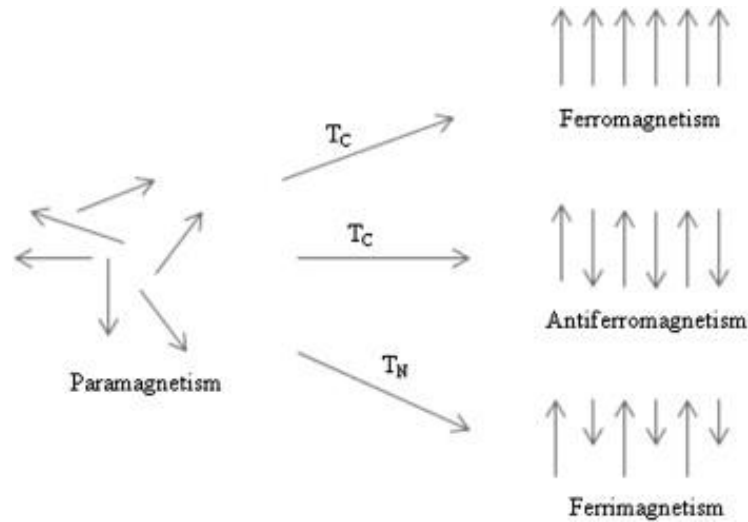
Le nanoparticelle magnetiche presentano molte proprietà interessanti che possono essere sfruttate in una varietà di applicazioni. L'applicazione di nanoparticelle di ossido di ferro nei campi della purificazione dell'acqua, della biomedicina o della chimica richiede spesso proprietà magnetiche controllate che possono essere modificate dal cambiamento della temperatura e delle condizioni redox. Negli ultimi decenni, numerosi ricercatori hanno prestato attenzione allo studio delle nanoparticelle di ossido di ferro (ION) [50,51].

Gli ossidi di ferro esistono in molte forme in natura, con magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ed ematite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) che rappresentano probabilmente le più comuni. Questi tre ossidi sono anche molto importanti dal punto di vista tecnologico.

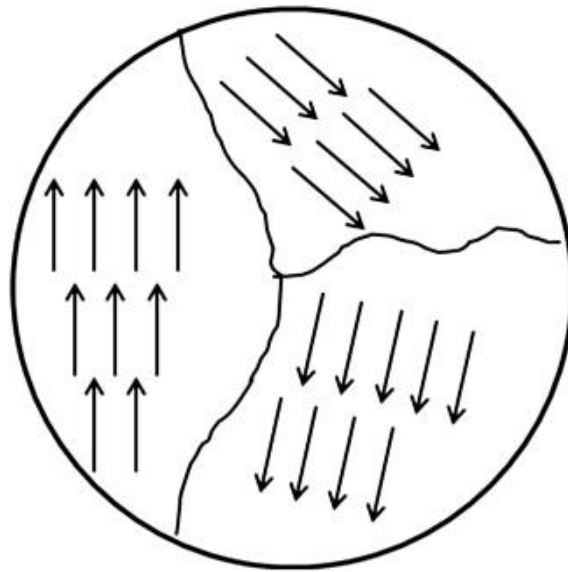
L'atomo di ferro ha un forte momento magnetico a causa di quattro elettroni spaiati nei suoi orbitali  $3d$ . Quando gli atomi di ferro cristallizzano, possono verificarsi diversi stati magnetici. Nello stato paramagnetico, i singoli momenti magnetici atomici sono allineati in modo casuale l'uno rispetto all'altro ed il cristallo ha un momento magnetico netto nullo. Se questo cristallo è soggetto a un campo magnetico esterno, alcuni di questi momenti si allineeranno e il cristallo raggiungerà un piccolo momento magnetico netto. In un cristallo ferromagnetico, tutti i singoli momenti sono allineati anche senza un campo esterno. Un cristallo ferrimagnetico, d'altra parte, ha un momento magnetico netto da due tipi di atomi con momenti di diversa forza che sono disposti in modo antiparallelo. Se i momenti magnetici antiparalleli sono della stessa grandezza, allora il cristallo è antiferromagnetico e non possiede momento magnetico netto (**Figura 1.13**).

In un materiale ferromagnetico, la magnetizzazione  $M$  è la somma vettoriale per unità di volume di tutti i momenti magnetici degli atomi nel materiale. La grandezza di  $M$  è generalmente inferiore al suo valore quando tutti i momenti atomici sono perfettamente allineati, per la presenza di domini (**Figura 1.14**), con ogni dominio che ha il proprio vettore di magnetizzazione derivante da un allineamento di momenti magnetici

atomici all'interno del dominio. I vettori di magnetizzazione di tutti i domini del materiale potrebbero non essere allineati, portando a una diminuzione della magnetizzazione massima complessiva.



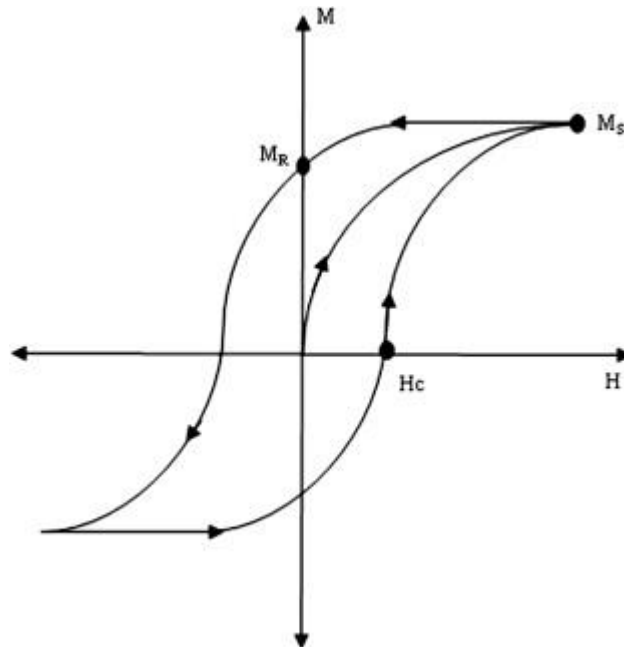
**Figura 1.13:** Allineamento dei singoli momenti magnetici atomici [51].



**Figura 1.14:** Domini magnetici in un materiale ferromagnetico [51].

Se si applica un campo magnetico esterno di forza  $H$  ad un ferromagnete di forza magnetica  $M$ , si ottiene la curva di magnetizzazione di **Figura 1.15** che mostra che  $M$  aumenta con  $H$  fino a che il valore di saturazione  $M_s$  non viene raggiunto. La curva di magnetizzazione mostra un ciclo di isteresi, perché tutti i domini non tornano ai loro

orientamenti originali, quando  $H$  diminuisce dopo che è stata raggiunta la saturazione magnetica. Quindi, quando  $H$  ritorna a zero, c'è una magnetizzazione residua  $M_R$  che può essere rimossa solo applicando un campo coercitivo  $H_C$  nella direzione opposta al campo applicato inizialmente.



**Figura 1.15:** Magnetizzazione  $M$  in funzione di un campo magnetico applicato  $H$  [51].

Un materiale magnetico a dominio singolo non ha un ciclo di isteresi e si dice che è superparamagnetico. Le nanoparticelle di ossido di ferro più piccole di circa 20 nm mostrano spesso un comportamento superparamagnetico a temperatura ambiente.

La disposizione ordinata dei momenti magnetici diminuisce con l'aumentare della temperatura a causa delle fluttuazioni termiche dei singoli momenti. Oltre la temperatura di Néel o Curie, il materiale diventa disordinato e perde la sua magnetizzazione. La temperatura di transizione è chiamata temperatura di Curie  $T_C$  per sostanze ferromagnetiche e ferrimagnetiche, e la temperatura di Néel  $T_N$  per sostanze antiferromagnetiche. Le particelle superparamagnetiche sono solitamente ordinate al di sotto di una temperatura di blocco,  $T_B$ . Le nanoparticelle (NP) composte da materiali ferromagnetici e con dimensioni  $<10-20$  nm mostrano una forma inimitabile di magnetismo, cioè il superparamagnetismo. Grazie alla loro bassa tossicità, alle proprietà superparamagnetiche, all'elevato rapporto tra superficie e volume, e alla semplice metodologia di preparazione, le nanoparticelle magnetiche di ossido di ferro ( $Fe_3O_4$  e  $\gamma-Fe_2O_3$ ) hanno attirato

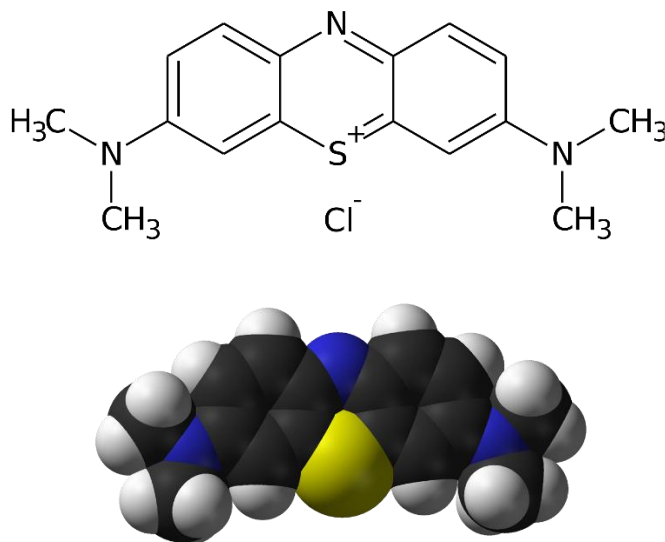
molta attenzione e sono particolarmente interessanti nelle applicazioni biomediche per l'immobilizzazione delle proteine, come agenti di contrasto per la risonanza magnetica (MRI), nella terapia termica e nella somministrazione di farmaci.

I metodi di sintesi, lo stato cristallino, le dimensioni, la forma e la qualità delle NP di ossido di ferro ne influenzano notevolmente le caratteristiche chimico-fisiche NP [52].

### 1.4 Blu di metilene

Uno dei coloranti cationici più diffusi, che persiste nell'ambiente, tossico, cancerogeno e mutageno è il blu di metilene (MB). Visto l'ampio consumo industriale, un grande volume di MB contenuto nelle acque reflue viene scaricato nelle acque sotterranee e superficiali. A dosi superiori a 5 mg/kg, le caratteristiche inibitorie dell'ossidato monoamminico del colorante MB possono indurre tossicità da serotonina fatale nell'uomo, oltre ad essere una minaccia per la fauna nell'ecosistema acquatico. Pertanto, è assolutamente necessario eliminare il MB dalle acque reflue [53].

Il blu di metilene (3,7-bis(dimetilammino) fenotiazina cloruro di tetrametilitionina cloruro) è un composto chimico aromatico, eterociclico, con una struttura planare. Ha un peso molecolare di 319,85 g/mol e formula chimica  $C_{16}H_{18}N_3S^+Cl^-$  (**Figura 1.16**).

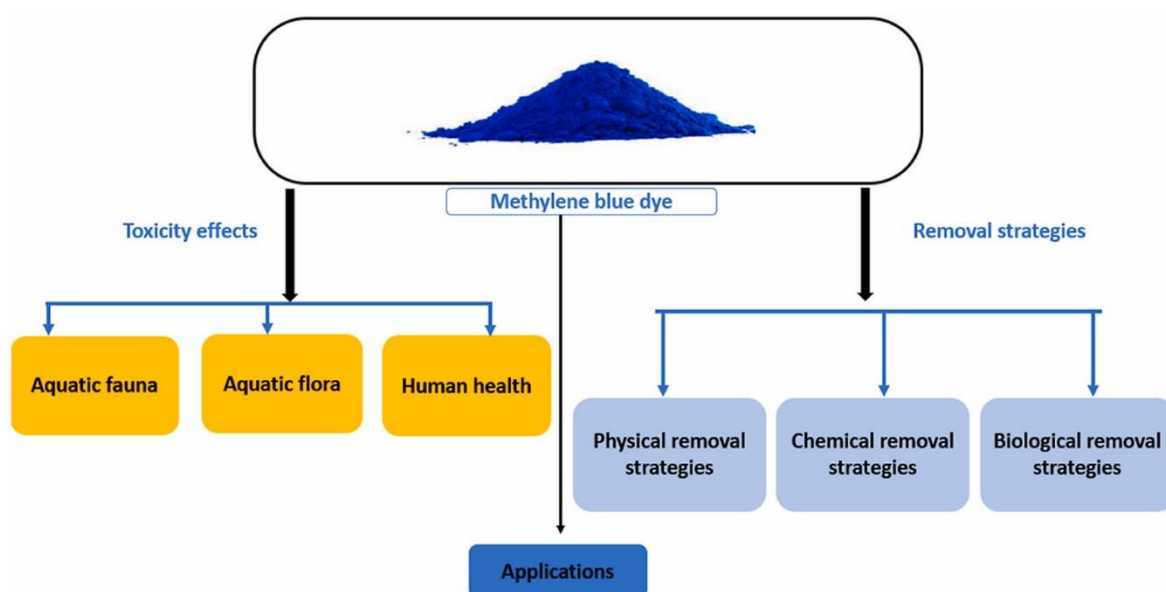


**Figura 1.16:** *Struttura molecolare del blu di metilene* [54].

Il MB viene comunemente applicato come colorante sintetico per la tintura di tessuti nell'abbigliamento, nell'industria tessile ed anche per la tintura di carte e pelli. Inoltre,

le industrie farmaceutiche ne consumano una grande quantità per le loro produzioni. Sebbene sia stato dimostrato che l'MB possiede alcuni effetti terapeutici, ciò si verifica quando viene utilizzato in modo sicuro come indicato/prescritto clinicamente, a differenza dell'assunzione incontrollata attraverso l'acqua contaminata. Ad esempio, può essere utilizzato per trattare la vasoplegia dopo un'operazione di trapianto, nel trattamento della malaria e per la neutralizzazione dell'eparina. Tuttavia, il rilascio di acque reflue caricate con il MB da una qualsiasi delle industrie potrebbe causare molti rischi per la salute. Ad esempio, negli esseri umani, il MB può indurre vari disturbi come cianosi, necrosi tissutale, formazione del corpo di Heinz, vomito, ittero, shock, aumento della frequenza cardiaca.

A causa della minaccia rappresentata dal MB nell'ambiente fisico, gli scienziati sono alla ricerca di modi per risanare l'ambiente dallo stesso colorante. Diversi metodi di trattamento, tra cui metodi biologici (uso di enzimi e microrganismi), metodi chimici (uso di processi di ossidazione avanzati) e **metodi fisico-chimici (principalmente adsorbimento)**, sono stati ampiamente applicati per eliminare il colorante dall'ambiente. I metodi di adsorbimento includono, ma non si limitano, l'uso di colla di riso, carboni attivi derivati da scarti di palma da olio, scarti di buccia di banana attivata, guscio di Palmyra (palma), zeoliti, carbone attivo, e nanotubi di carbonio incorporati (**Figura 1.17**).



**Figura 1.17:** Tossicità e possibili strategie per la rimozione del blu di metilene dall'ambiente [55].

---

#### 1.4.1. Proprietà terapeutiche del MB

Uno dei principali metodi di trattamento comunemente utilizzati per le infezioni batteriche sono gli antibiotici. Tuttavia, l'uso diffuso di antibiotici ha portato alla comparsa di ceppi batterici multiresistenti o patogeni. Di conseguenza, lo sviluppo di nuovi materiali e tecniche battericide ha acquisito una notevole importanza [56].

Il blu di metilene è efficace contro batteri, funghi e virus, interrompendo più siti all'interno delle cellule batteriche, i processi cellulari all'interno delle cellule fungine e la replicazione virale attraverso la sua modalità d'azione unica.

#### Attività antibatterica

I progressi nella tecnologia antimicrobica per combattere la resistenza batterica sono in costante sviluppo, esempi sono **l'incorporazione di nanoparticelle nei disinfettanti**, lo sviluppo di terapia fotodinamica con blu di metilene, **la creazione di rivestimenti multifunzionali** o superfici incorporate con blu di metilene nonché l'esplorazione di combinazioni sinergiche con altri agenti biocidi. Il potenziale del blu di metilene come agente antimicrobico efficace è stato dimostrato nei primi esperimenti condotti da scienziati come Paul Ehrlich e Robert Koch, aprendo la strada a ulteriori ricerche sulle sue applicazioni. La capacità del blu di metilene di inibire la crescita di alcuni agenti patogeni lo ha reso uno strumento essenziale nella lotta contro le malattie infettive durante i periodi in cui gli antibiotici non erano ancora disponibili [57].

È davvero affascinante come la struttura e la composizione uniche del blu di metilene contribuiscano alle sue potenti proprietà antimicrobiche, proteggendoci da agenti patogeni dannosi. La molecola è costituita da un sistema interconnesso di tre anelli: due anelli benzenici uniti da un atomo di zolfo e un anello contenente azoto tra di loro. Queste interazioni modificano le proprietà della molecola e svolgono un ruolo cruciale nella sua capacità di agire come un efficace disinfettante. Ad esempio, il MB può esistere in diversi stati di ossidazione: la forma ridotta è chiamata leucometilene e la forma ossidata è chiamata blu di metilene. Questo ciclo redox consente al MB di interrompere le funzioni delle cellule microbiche generando specie reattive dell'ossigeno che danneggiano i componenti cellulari come proteine e DNA.

Tre aspetti chiave dell'efficacia del blu di metilene contro i batteri sono:

- 
1. **Generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS):** Il blu di metilene può produrre ROS se esposto alla luce. Queste molecole reattive danneggiano i componenti cellulari batterici come DNA, proteine e lipidi, portando alla morte cellulare.
  2. **Inibizione della respirazione cellulare:** Il blu di metilene interferisce con la catena di trasporto degli elettroni nelle cellule batteriche, interrompendo il loro processo di produzione di energia e, in ultima analisi, causando la morte cellulare.
  3. **Permeabilità migliorata:** È stato dimostrato che il blu di metilene aumenta la permeabilità delle membrane cellulari batteriche, rendendo più facile la penetrazione e la distruzione delle cellule da parte di altri agenti antimicrobici.

### **Attività antifungina**

Il MB ha mostrato risultati promettenti nella lotta contro varie infezioni fungine, ciò lo rende un'alternativa interessante ai tradizionali farmaci antimicotici. L'aumento della resistenza fungina ai trattamenti convenzionali evidenzia la necessità di nuovi metodi per affrontare questi organismi persistenti e spesso pericolosi. Il MB interrompe i processi cellulari all'interno delle cellule fungine, portando infine alla loro scomparsa, grazie alle sue proprietà antimicrobiche ad ampio spettro. La ricerca ha dimostrato che il blu di metilene è particolarmente efficace contro le specie di *Candida* e *Aspergillus*, che causano mugugno orale, infezioni da lieviti e infezioni polmonari potenzialmente pericolose per la vita [57].

Questo non solo fornisce un potenziale sollievo per coloro che soffrono di questi disturbi, ma apre anche strade per ulteriori esplorazioni delle capacità antimicotiche del blu di metilene in altri contesti.

### **Attività antivirale**

Quando si tratta di combattere i virus, il blu di metilene si è dimostrato molto promettente come potenziale agente antivirale. Offre nuovi modi per mantenere il nostro mondo più sano e più sicuro interrompendo la replicazione virale attraverso la sua modalità d'azione unica che interagisce con gli acidi nucleici e le proteine essenziali. Il blu di metilene ha dimostrato efficacia contro una varietà di virus, tra cui HIV, HCV e HSV, rendendolo un antivirale ad ampio spettro [57].



---

Inoltre, può ridurre la probabilità di sviluppare ceppi resistenti rispetto ai farmaci antivirali convenzionali grazie alle sue molteplici modalità d'azione.

La combinazione del blu di metilene con altri agenti antivirali potrebbe anche migliorarne l'efficacia riducendo al minimo gli effetti collaterali negativi.

Tuttavia, prima di un'implementazione diffusa, è necessario considerare attentamente le implicazioni per la sicurezza e l'ambiente.

---

## CAPITOLO 2

### Materiali e Metodi

#### 2.1 Sintesi degli idrogel

Tutti gli idrogel sono stati sintetizzati utilizzando un supporto di Agar per la diffusione del reticolante, preparato disperdendo 0.1 g di  $\text{CaCl}_2$  in 12.5 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata contenente 0.125 mg di Agar. La miscela è stata portata ad ebollizione a  $150^\circ\text{C}$  e poi versata in una piastra a gelificare per 1-2 h.

La procedura generale per la sintesi delle membrane polimeriche è la seguente: la miscela di reazione è stata versata sul supporto di agar, lasciata reagire per 2 h e la membrana risultante è stata lavata con abbondante  $\text{H}_2\text{O}$  distillata ed infine essiccata a temperatura ambiente per 24 h fino a costanza di peso.

La miscela di reazione è così costituita:

- **Idrogel contenente SA ( $\text{H}_{\text{SA}}$ ):** 0.125 g di SA disciolti in 12,5 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata;
- **Idrogel contenente GO ( $\text{H}_{\text{SAGO}}$ ):** 0.125 g di SA disciolti in 12,5 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata in cui sono dispersi 1.25 mg di GO mediante cicli di sonicazione (3 min) ed agitazione (2 h);
- **Idrogel contenente Ossido di Ferro ( $\text{H}_{\text{SAFe}}$ ):** 0.125 g di SA disciolti in 12,5 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata in cui sono dispersi 12.5 mg di Ossido di Ferro mediante cicli di sonicazione (3 min) ed agitazione (2 h);
- **Idrogel contenente GO e Ossido di ferro ( $\text{H}_{\text{SAFeGO}}$ ):** 0.125 g di SA disciolti in 12,5 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata in cui sono dispersi 1.25 mg di GO e 12.5 mg di Ossido di Ferro nella soluzione di alginato mediante cicli di sonicazione (3 min) ed agitazione (2 h).

La stabilità della dispersione di GO e ossido di Ferro nella miscela di reazione è stata determinata mediante Dynamic Light Scattering utilizzando un 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corp, Holtsville, NY, USA) a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  misurando la funzione di autocorrelazione a  $90^\circ$  (lunghezza d'onda del laser di 658 nm).

Tutte le sostanze chimiche sono state acquistate da Merck/ Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania.

## 2.2 Procedura di caratterizzazione degli idrogel

### 2.2.1 Determinazione del grado di rigonfiamento

La capacità di rigonfiamento degli idrogel in acqua è stata studiata in presenza ed in assenza di un campo magnetico come segue: da ciascun campione sono state ritagliate delle strisce di  $\sim 20$  mg, che sono state lasciate rigonfiare immergendole in una piastra Petri contenente il mezzo di rigonfiamento ( $H_2O$ ) a temperatura ambiente ( $25^\circ C$ ). A intervalli di tempo predeterminati, l'acqua in eccesso è stata rimossa ed i campioni, dopo essere stati tamponati con un tessuto per rimuovere l'umidità superficiale, sono stati pesati. La percentuale di contenuto di acqua, WR, è espressa dalla seguente equazione:

$$WR = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2.1)$$

dove  $W_s$  e  $W_d$  sono rispettivamente i pesi degli idrogel rigonfiati (swelled) e secchi (dry). La procedura è stata ripetuta per ciascuna tipologia di membrana ponendo il campione a contatto con un magnete e confrontando gli assorbimenti in presenza ed in assenza del campo magnetico.

I diametri medi dei pori degli idrogel ( $\xi$ ) sono stati determinati applicando il modello empirico proposto in letteratura [58] secondo l'equazione (2.2):

$$\xi = 0,071 \phi^{-1/3} (\bar{M}_c)^{1/2} \quad (2.2)$$

$\bar{M}_c$ , il peso molecolare della catena polimerica tra due punti di reticolazione vicini, è calcolato secondo l'equazione (2.3):

$$\bar{M}_c = -d_p v_{m,1} \phi^{1/3} [\ln(1 - \phi) + \phi + \phi^2]^{-1} \quad (2.3)$$

$v_{m,1}$  è il volume molare del mezzo di swelling, mentre  $\chi$  e  $\phi$  rappresentano rispettivamente il parametro di interazione di Flory-Huggins e la frazione volumetrica del polimero rigonfiato.

$\phi$  è calcolato secondo l'equazione (2.4):

$$\phi = \left[ \left( \frac{d_p}{d_s} \right) \left( \frac{W_s - W_d}{W_d} \right) + 1 \right]^{-1} \quad (2.4)$$

$d_p$  e  $d_s$  sono la densità del polimero e del solvente, mentre  $W_d$  e  $W_s$  rappresentano il peso del polimero prima e dopo 3 h di swelling.

$\chi$  è stato calcolato sperimentalmente dal coefficiente di temperatura della frazione volumetrica secondo l'equazione (2.5):

$$\chi = [\phi(1 - \phi)^{-1} + N \ln(1 - \phi) + N\phi] \left[ 2\phi - \phi^2 N - \phi^2 T^{-1} \left( \frac{d\phi}{dT} \right)^{-1} \right]^{-1} \quad (2.5)$$

$d\phi/dT$  è la pendenza ottenuta riportando i dati della frazione volumetrica in funzione della temperatura (espressa in K).

$N$  è calcolato secondo l'equazione (2.6):

$$N = \left( \frac{\phi^{2/3}}{3} - \frac{2}{3} \right) \left( \phi^{1/3} - \frac{2}{3} \phi \right)^{-1} \quad (2.6)$$

### 2.2.2 Analisi Calorimetrica

Le analisi DSC (intervallo di temperatura da 25 a 350 °C, flusso d'azoto 20 mL min<sup>-1</sup>, velocità di riscaldamento 10°C/min) sono state eseguite utilizzando un DSC200 (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Germania) posizionando i campioni in crogioli di alluminio.

### 2.2.3 Analisi SEM

Le analisi al microscopio elettronico a scansione sono state eseguite su un NOVA NanoSEM 200 (0-30 kV) (Thermo Fisher Scientific, Hillsboro, OR, USA). I campioni sono stati tagliati in piccoli frammenti e posizionati con nastro biadesivo conduttivo su opportuni supporti (Plano GmbH, Wetzlar, Germania).

## 2.3 Studi di assorbimento all'equilibrio

Le condizioni utilizzate per gli studi di adsorbimento del Blu di Metilene (MB) in acqua (4 mL) sono state le seguenti:

- i) studi isotermici: 2,5 mg mL<sup>-1</sup> di H<sub>SA</sub>, H<sub>SAGO</sub>, H<sub>SAFe</sub> e H<sub>SAFeGO</sub>; 0,01-5 mg mL<sup>-1</sup> di soluzione colorante; tempo di contatto 4.320 min; temperatura 25°C;
- ii) studi cinetici: 4 mg mL<sup>-1</sup> di H<sub>SA</sub>, H<sub>SAGO</sub>, H<sub>SAFe</sub> e H<sub>SAFeGO</sub>; 0,01 mg mL<sup>-1</sup> di soluzione colorante, tempo di contatto 15-2.880 min, temperatura 25°C.

La concentrazione del MB è stata determinata mediante analisi UV-Vis su uno spettrofotometro Evolution 201 (ThermoFisher Scientific, Hillsboro, OR, USA).

La determinazione delle quantità di MB in soluzione è stata determinata utilizzando una retta di taratura ( $R^2 = 0.9969$ ) costruita nell'intervallo di concentrazione 0,001-0.008 mg mL<sup>-1</sup>.

La quantità sperimentale di MB adsorbito ( $q_{exp}$ , mg g<sup>-1</sup>) è stata espressa utilizzando l'equazione:

$$q_{max} = \frac{C_0 - C_f}{m} \times V \quad (2.7)$$

$C_0$  e  $C_f$  sono la concentrazione iniziale e quella finale del colorante,  $m$  è la massa di idrogel e  $V$  è il volume della soluzione di colorante.

Le capacità di adsorbimento in funzione del tempo  $t$  ( $q_t$ ) e all'equilibrio ( $q_e$ ) sono stati espresse utilizzando le equazioni:

$$q_t = \frac{C_0 - C_t}{m} \times V \quad (2.8)$$

$$q_e = \frac{C_0 - C_e}{m} \times V \quad (2.9)$$

## 2.4 Studi di rilascio del MB da parte dell'idrogel

Il rilascio di MB da parte di H<sub>SA</sub>, H<sub>SAGO</sub>, H<sub>SAFe</sub> e H<sub>SAFeGO</sub> è stato ottenuto immergendo aliquote (10 mg) di idrogel precedentemente sottoposte a cicli di assorbimento di MB (5mg/mL) in mezzi di rilascio a pH 7.0 (tampone fosfato) e 3.0 (soluzione CH<sub>3</sub>COOH).

Ad intervalli di tempo prestabiliti (15, 30, 60, 120, 240, 360, 1440 min), la concentrazione del colorante nel mezzo di rilascio è stata determinata mediante analisi UV-Vis su uno spettrofotometro Evolution 201 (ThermoFisher Scientific, Hillsboro, OR, USA) in accordo alla seguente **equazione 2.7**.

$$Rilascio = \frac{M_t}{M_0} \quad (2.7)$$

## 2.5 Analisi Statistiche

Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplice copia e i dati espressi come valori medi  $\pm$  SD. I parametri termodinamici, isotermici e cinetici sono stati calcolati usando il Software OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

---

## CAPITOLO 3

### Risultati e Discussione

#### Premessa

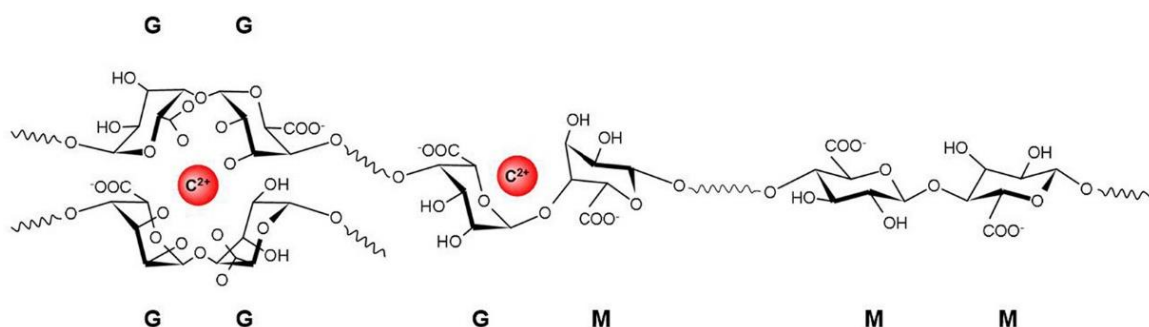
Obiettivo del presente lavoro di tesi è la progettazione, la realizzazione e la caratterizzazione di un idrogel ottenuto dalla combinazione tra un polimero di origine naturale e un sistema nanoparticellare da utilizzare nel trattamento delle acque, valutandone anche una possibile applicazione come medicazione multifunzionale delle ferite cutanee. Nello specifico il sistema è costituito da un idrogel di SA, ottenuto mediante una reazione tra il cloruro di calcio (agente reticolante), l'ossido di ferro (elemento *magnetic-responsive*) e l'ossido di grafene (elemento funzionale). Il sistema è stato quindi impiegato per l'assorbimento del blu di metilene - MB (colorante cationico con proprietà antibatteriche) al fine di ricavare un dispositivo, sensibile ad un duplice stimolo, in grado di adsorbire gli inquinanti nonché di rilasciare un'agente terapeutico in modo controllato, grazie all'azione di un campo magnetico esterno ed alla modulazione del pH.

#### 3.1 Sintesi degli idrogel

Gli idrogel intelligenti, in grado di rispondere a stimoli esterni, stanno suscitando un sempre crescente interesse. A tal proposito, gli idrogel magnetici che vengono preparati incorporando nanomateriali *magnetic-responsive* sono molto vantaggiosi per applicazioni sia nel trattamento delle acque che in campo biomedico. In seguito all'applicazione di un campo magnetico esterno, gli idrogel magnetici possono essere attivati per indurre molteplici modalità di risposta come la locomozione, la deformazione e la termogenesi, per scopi terapeutici [59] e per scopi ambientali grazie alla loro elevata resistenza fisica, alto tasso di adsorbimento e rinnovabilità [60].

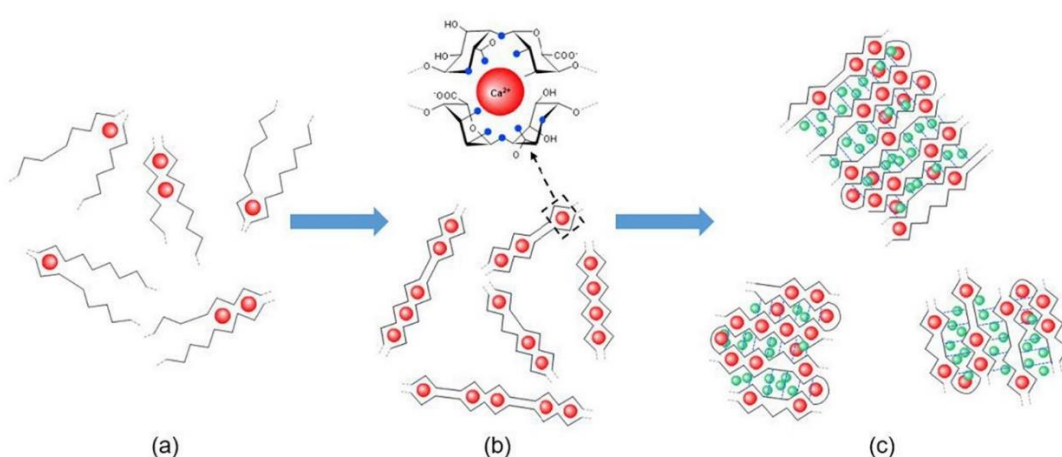
La reticolazione degli idrogel è stata di tipo ionico. Il meccanismo generale di gelificazione dell'alginato è ben noto come il modello "egg-box", che è stato proposto da *Grant et al.* nel 1973 [61]. I gel di alginato indotti da ioni sono formati principalmente da interazioni elettrostatiche tra i gruppi carbossilici caricati negativamente nelle molecole

di alginato ed i cationi caricati positivamente, portando alla formazione di complessi polielettrolitici. Gli ioni bivalenti sono l'agente più comunemente utilizzato per indurre la formazione di gel di alginato. I gruppi carbossilici nel SA (principalmente residui G) possono reticolare con ioni bivalenti come il  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  o qualsiasi altro catione bivalente (**Figura 3.1**) per formare idrogel, ad eccezione di  $\text{Mg}^{2+}$  ed  $\text{Hg}^{2+}$ .



**Figura 3.1:** Struttura molecolare dell'alginato che mostra i siti di legame per i cationi bivalenti. I cerchi rossi rappresentano i cationi bivalenti [48].

Fang *et al.* hanno rivelato, in primo luogo, tre fasi distinte e successive della gelificazione Ca-alginato: (1) interazione del  $\text{Ca}^{2+}$  con una singola unità guluronato per formare monocomplessi; (2) formazione di dimeri egg-box tramite appaiamento di monocomplessi; e (3) associazione laterale dei dimeri egg-box per generare multicomplexi (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2:** Schema del meccanismo di formazione degli idrogel Ca-alginato.



Per valutare l'effetto della presenza di GO e ossido di ferro sulle proprietà di assorbimento e di rilascio degli idrogel di alginato, sono stati sintetizzati 4 diversi sistemi:

- Idrogel di controllo contenente esclusivamente SA:  $H_{SA}$ ;
- Idrogel contenente SA e GO:  $H_{SAGO}$ ;
- Idrogel contenente SA e Ossido di Ferro:  $H_{SAFe}$ ;
- Idrogel contenente SA, GO e Ossido di ferro:  $H_{SAFeGO}$ .

In **Figura 3.3** è riportato l'aspetto degli idrogel sintetizzati.

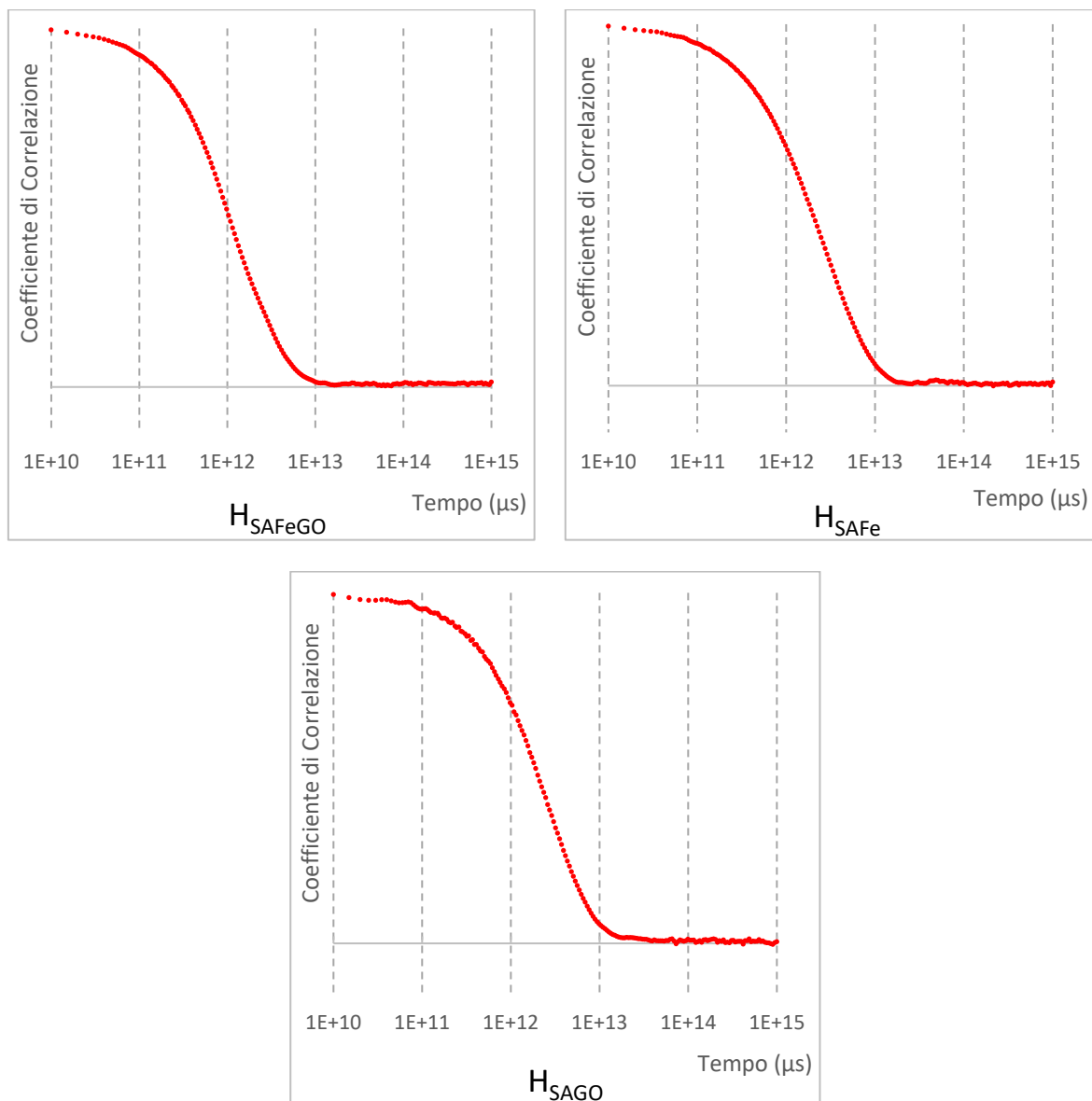


**Figura 3.3:** Immagine dei quattro tipi di idrogel realizzati;  $H_{SA}$  (Bianco),  $H_{SAGO}$  (Nero),  $H_{SAFe}$  (Ruggine) e  $H_{SAFeGO}$  (Marrone).

### 3.2 Analisi Calorimetrica

Per verificare la dispersione omogenea delle nanoparticelle (NP) di GO e  $Fe_2O_3$  all'interno della miscela di reazione è stata eseguita un'analisi al Dinamic Light Scattering (DLS) prima della reticolazione. Il SA, l'ossido ferrico e l'ossido di grafene sono stati dispersi in acqua distillata come descritto nella preparazione degli idrogel e sottoposte ad analisi.

I risultati hanno rivelato la presenza di una sospensione con particelle con un diametro medio di circa 600nm omogeneamente disperse nella soluzione di alginato, come confermato dai valori dell'indice di polidispersività (PDI) inferiori a 0,3 per tutti i campioni analizzati (**Figura 3.4**).

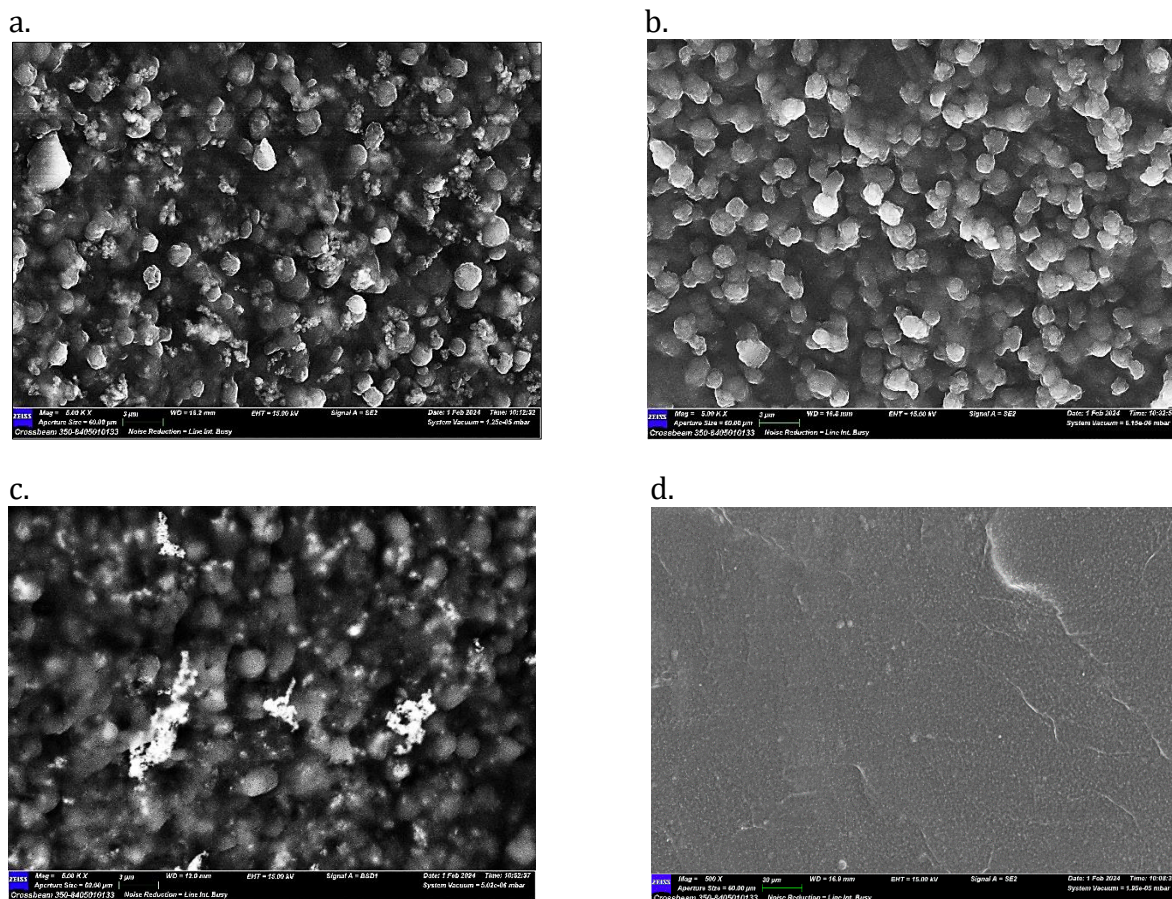


**Figura 3.4:** Curve di correlazione delle tre miscele di reazione per la sintesi degli idrogel  $H_{SAFeGO}$ ,  $H_{SAGO}$  e  $H_{SAFe}$ .

### 3.3 Caratterizzazione morfologica

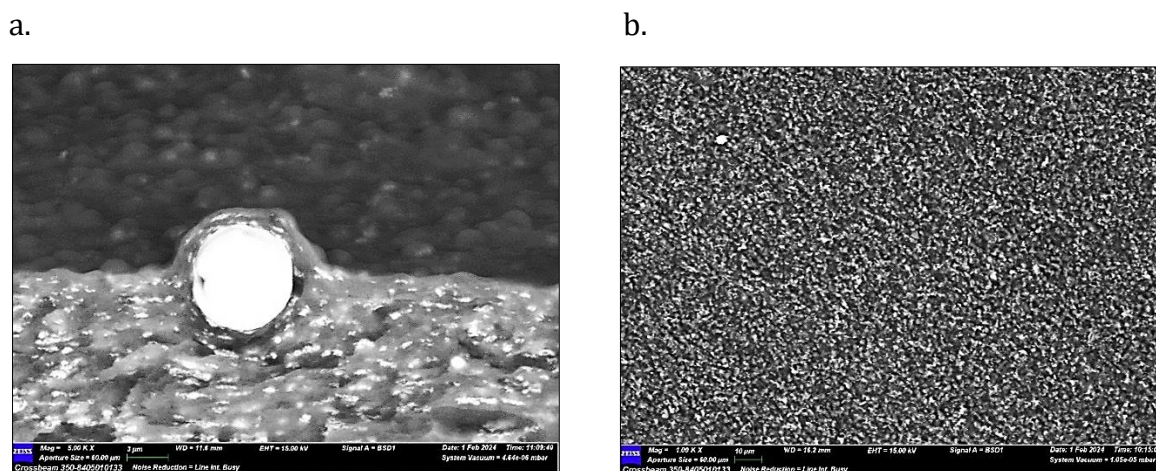
La caratterizzazione morfologica degli idrogel è stata effettuata mediante microscopia a scansione elettronica (SEM) (**Figura 3.5**).

La **Figura 3.5** mostra il buon grado di dispersione delle nanoparticelle magnetiche e del GO in tutte le matrici polimeriche.



**Figura 3.5:** Analisi morfologica dell'idrogel  $H_{SAFeGO}$  (a),  $H_{SAGO}$  (b),  $H_{SAFe}$  (c) e  $H_{SA}$  (d).

Inoltre, le analisi quantitative EDX mostrano che la percentuale di ferro trattenuta nella membrana  $H_{SAFeGO}$  è superiore rispetto a quella presente nella membrana  $H_{SAFe}$ , segno di una buona interazione tra l'ossido di grafene e l'ossido di ferro all'interno del sistema  $H_{SAFeGO}$  (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Immagine SEM di un campione di a)  $H_{SAFe}$  e b)  $H_{SAFeGO}$ .

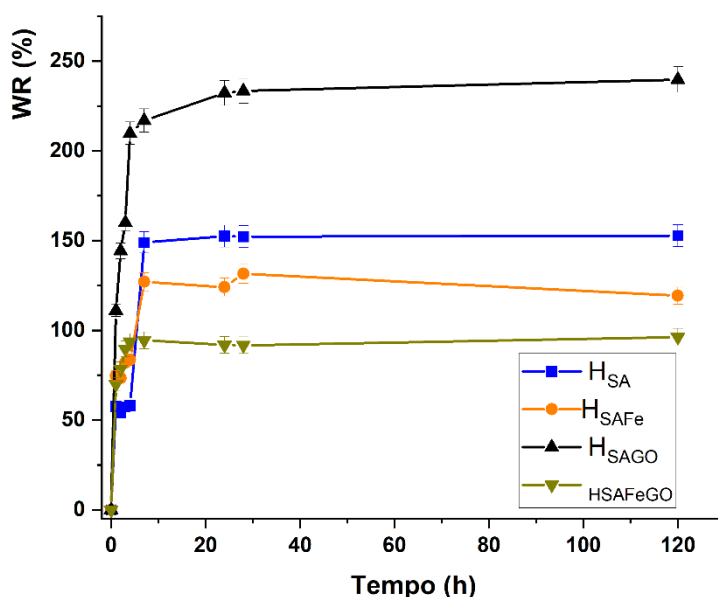
### 3.4 Caratterizzazione degli idrogel

La caratterizzazione degli idrogel è stata effettuata mediante determinazione del profilo di rigonfiamento in acqua e delle proprietà termiche.

Il comportamento degli idrogel in acqua è stato studiato allo scopo di determinare l'affinità ai mezzi acquosi da parte dei polimeri ed inoltre per poter ottenere informazioni utili all'ottimizzazione delle condizioni sperimentali negli esperimenti di assorbimento degli inquinanti ed in quelli di rilascio del farmaco dalla matrice polimerica. Per effettuare tali studi, pesi noti dei campioni di  $H_{SA}$ ,  $H_{SAFe}$ ,  $H_{SAGO}$  ed  $H_{SAFeGO}$ , sono stati posti in acqua per 24 h, calcolando le percentuali di rigonfiamento (WR %) in accordo all'equazione 2.1.

Tutti gli idrogel hanno mostrato elevata capacità di rigonfiamento, requisito fondamentale per tutti i dispositivi destinati al trattamento delle acque e delle lesioni cutanee: devono essere, infatti, in grado di assorbire una notevole quantità di inquinanti, nel primo caso e di essudato nel secondo, garantendo il mantenimento di un ambiente umido, condizione a sua volta indispensabile per garantire un corretto processo di rimarginazione delle ferite.

I risultati ottenuti sono riportati in **Figura 3.7**, e mostrano come la quantità di acqua assorbita cresca in funzione del tempo, fino a raggiungere il massimo dell'idratazione dopo le 24 ore.

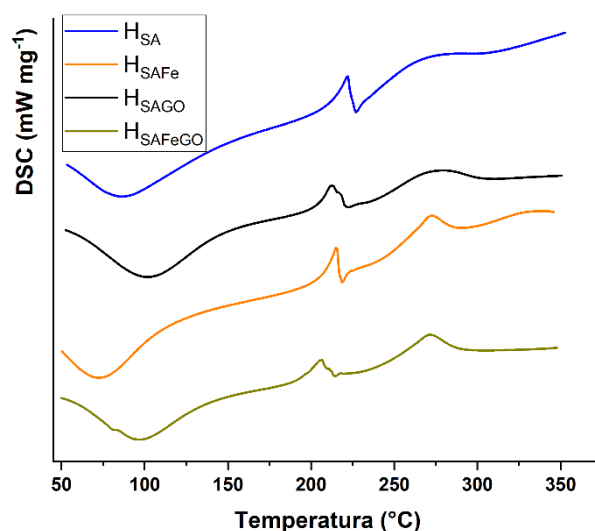


**Figura 3.7.** *Profili di rigonfiamento degli idrogel in assenza di campo magnetico*

Una prima considerazione può essere fatta in relazione al comportamento di swelling in funzione della composizione delle matrici. Dati di letteratura supportano l'ipotesi che l'inserimento di un sistema nanoparticellare di natura prevalentemente idrofobica quale il GO tende a ridurre il grado di rigonfiamento. Nel nostro caso, in comportamento apparentemente in disaccordo con la natura del GO (maggiore swelling del sistema  $H_{SAGO}$  rispetto a  $H_{SA}$ ), può essere spiegato con la tendenza del GO di assorbire sostanze sia apolari (interazioni idrofobiche con il sistema di carboni  $sp^2$ ) che polari (interazioni con i gruppi contenenti ossigeno quali  $-OH$  e  $-COOH$ ), che va ad interferire con il processo di reticolazione, andando a creare dei punti di discontinuità che comportano un aumento della porosità e quindi della capacità di assorbire  $H_2O$ .

Per quanto riguarda l'inserimento delle particelle di ossido di ferro, come atteso si ha una riduzione delle capacità di swelling poiché gli ioni ferro possono essere coordinati dai residui di alginato e quindi aumentare la reticolazione del sistema finale.

Tali risultati sono in pieno accordo con quelli ottenuti dall'analisi calorimetrica (DSC) volta a determinare le proprietà termiche dei sistemi polimerici (**Figura 3.8**).



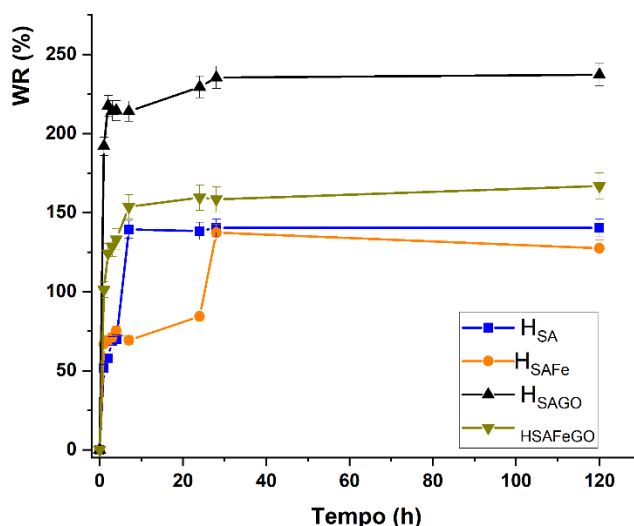
**Figura 3.8.** *Analisi DSC degli idrogel sintetizzati*

Le curve mostrano chiaramente che la transizione a 221°C dovuta alla degradazione delle catene di alginato nel campione  $H_{SA}$  si sposta a valore inferiori nei campioni contenenti GO, proprio a conferma dell'interferenza della nanostruttura con il processo di



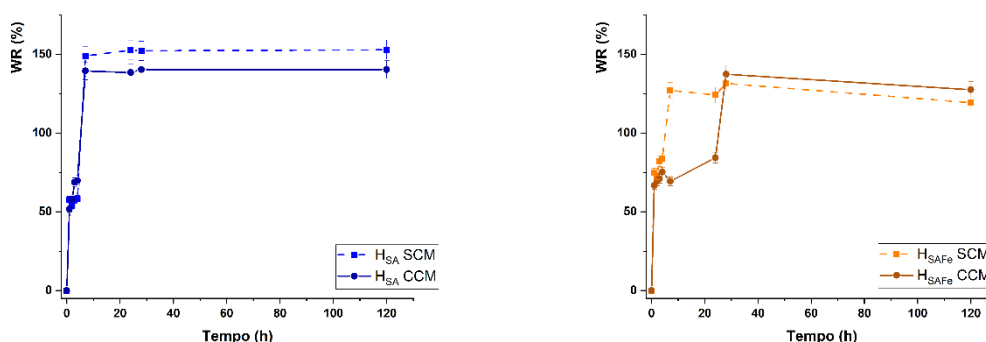
reticolazione. Il GO, infatti, generalmente contribuisce ad aumentare la stabilità termica di un sistema polimerico, ma nelle nostre condizioni sperimentali prevale il contributo dovuto al minor grado di reticolazione. Un comportamento analogo si può osservare nei campioni magnetici contenenti ossido ferrico.

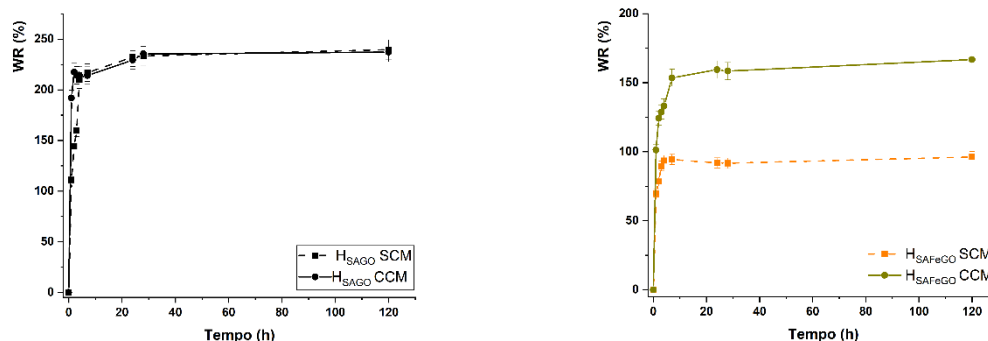
La determinazione del profilo di rigonfiamento è stata successivamente condotta in presenza ed in assenza di un campo magnetico (induzione magnetica pari a 244,7 mT, **Figura 3.9**).



**Figura 3.9.** *Profili di rigonfiamento degli idrogel in presenza di campo magnetico*

Per una migliore interpretazione dei dati, in **Figura 3.10** è riportato il confronto tra i due differenti comportamenti per ogni idrogel in presenza ed in assenza di stimolo magnetico.



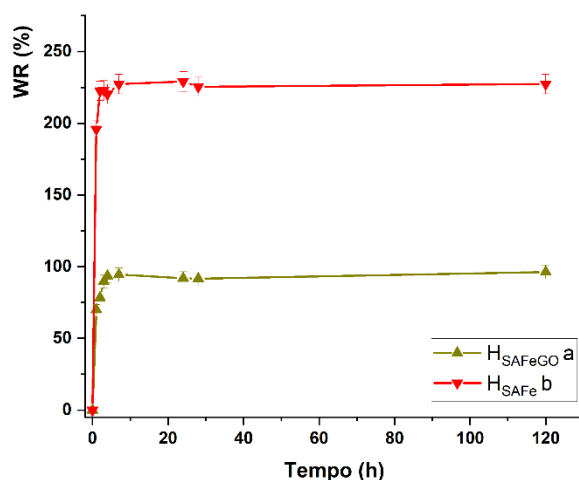


**Figura 3.10:** Confronto dei profili di rigonfiamento degli idrogel in presenza (CCM) ed in assenza (SCM) di un campo magnetico.

Il confronto mostra come il comportamento degli idrogel contenenti l'elemento *magnetic-responsive* ( $H_{SAFe}$  e  $H_{SAFeGO}$ ) venga influenzato dalla presenza del campo magnetico a differenza di quello delle membrane  $H_{SA}$  e  $H_{SAGO}$  che resta inalterato. Nello specifico, si assiste ad un aumento del grado di rigonfiamento probabilmente come conseguenza di una possibile riorganizzazione a livello molecolare dei residui di calcio e ferro all'interno del reticolo polimerico con riduzione del grado di reticolazione.

Per incrementare ulteriormente il grado di swelling, ulteriori esperimenti sono stati effettuati riducendo la quantità dell'agente reticolante  $CaCl_2$  utilizzata, e passando da una concentrazione percentuale massa/massa (p/p %) del 480% ( $H_{SAFeGO}$  a) ad una dell'80% ( $H_{SAFeGO}$  b). I dati di  $WR(\%)$  ottenuti sono riportati nella **Figura 3.11**.

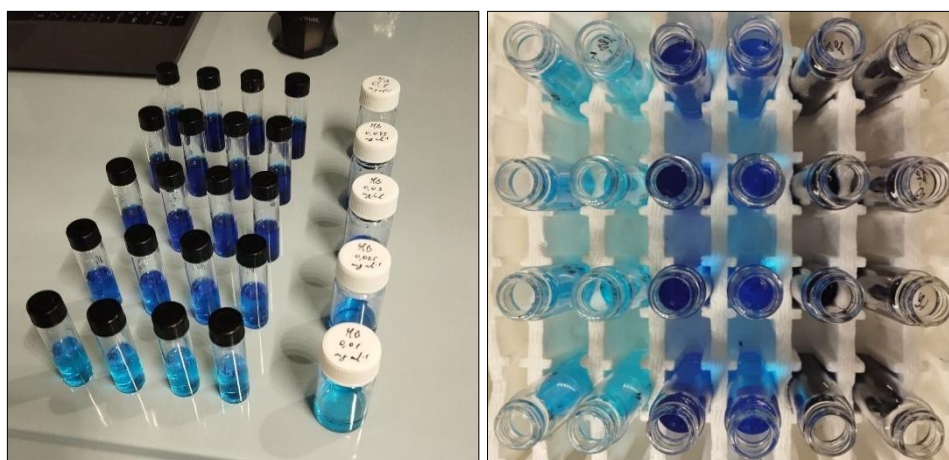
Si può effettivamente osservare un netto aumento del grado di swelling nel campione realizzato impiegando una minore concentrazione di  $CaCl_2$ , come lecito attendersi dal minor grado di reticolazione dell'idrogel. Tale ipotesi è confermata dai valori del diametro delle maglie della rete polimerica ( $\xi$ ), ottenibili empiricamente applicando il modello di Flory-Rehner nella versione proposta da Kulkarni [58]. I risultati ottenuti indicano come il diametro dei pori passi da 15 nm a 22 nm in seguito a riduzione del grado di reticolazione.



**Figura 3.11:** *Profili di rigonfiamento degli idrogel con diverse concentrazioni di agente reticolante (p/p %). a: 480%; b: 80%.*

### 3.5 Isoterme di assorbimento

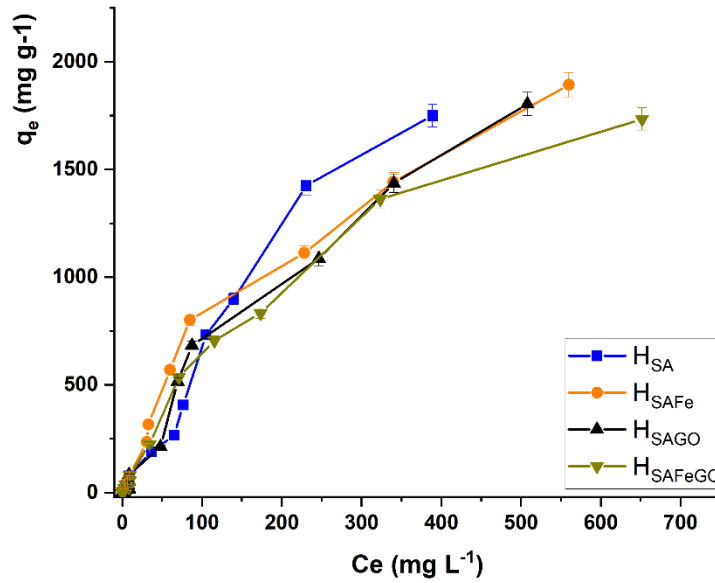
Per una corretta comprensione di un processo di adsorbimento (ad esempio, fenomeni fisici o chimici, processi mono- o multistrato, assorbimento omogeneo o eterogeneo) e la progettazione di sistemi efficaci con parametri ottimizzati, è di fondamentale importanza la valutazione delle relazioni tra adsorbente e adsorbato all'equilibrio. Infatti, mentre la cinetica di assorbimento valuta l'andamento dell'assorbimento da parte dell'idrogel a diversi intervalli di tempo, le isoterme d'assorbimento determinano la quantità di soluto assorbita dal polimero all'equilibrio quando questo è immerso in soluzioni con concentrazioni differenti (**Figura 3.12**).



**Figura 3.12:** *Campioni per la determinazione delle isoterme di assorbimento.*



Le isoterme di assorbimento risultanti sono riportate in **Figura 3.13**.



**Figura 3.13:** *Isoterme d'assorbimento delle quattro membrane in assenza (a) e in presenza di campo magnetico (b).*

Tra i diversi modelli proposti in letteratura per descrivere le isoterme di assorbimento, sono stati utilizzati i modelli Langmuir, Freundlich, Redlich-Peterson, Sips, Dubinin-Radushkevich (Dub-Rad) e Temkin (**Equazioni 3.1-3.6**).

$$\text{Langmuir} \quad q_e = \frac{q_{max} k_L C_e}{1 + k_L C_e} \quad (3.1)$$

$$\text{Freundlich} \quad q_e = k_F C_e^{1/n_F} \quad (3.2)$$

$$\text{Red- Pet} \quad q_e = \frac{k_{RP} C_e}{1 + \alpha_{RP} C_e^g} \quad (3.3)$$

$$\text{Sips} \quad q_e = \frac{q_{max} k_S C_e^{n_S}}{1 + k_S C_e^{n_S}} \quad (3.4)$$

$$\text{Dub-Rad} \quad q_e = q_{max} e^{(-\beta_{DR} \epsilon)^2} \quad (3.5)$$

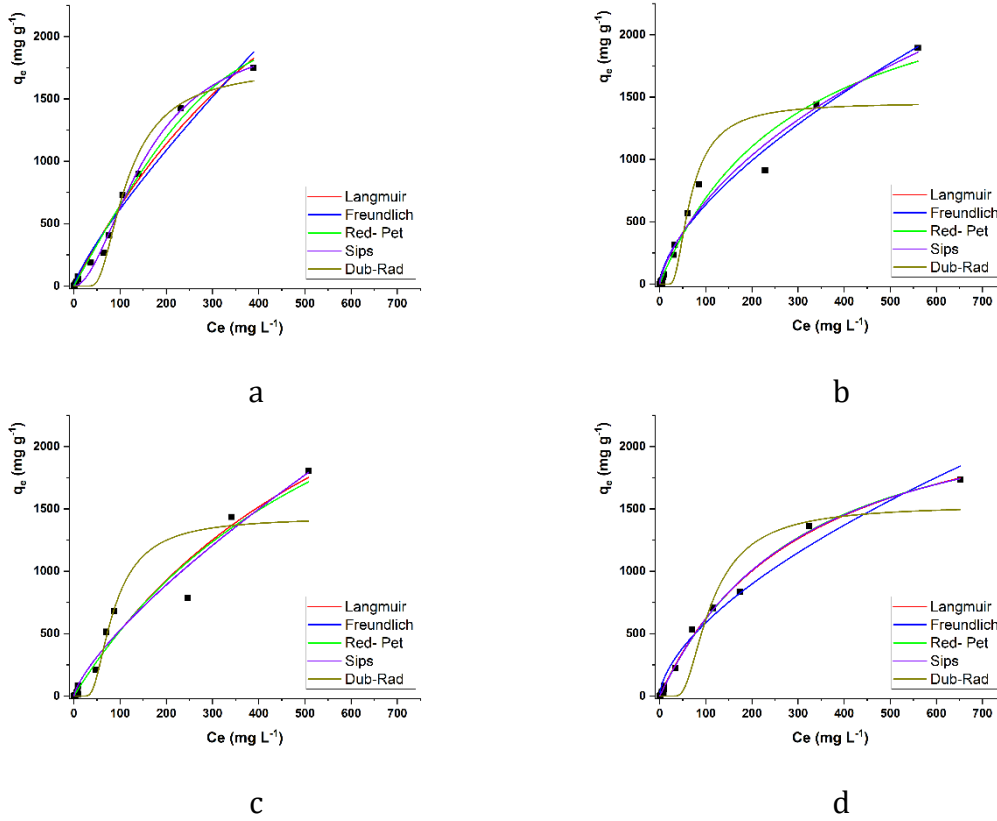
$$\text{Temkin} \quad q_e = B \ln(A_T C_e) \quad (3.6)$$

$q_{max}$  indica la massima capacità adsorbente ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_e$  la concentrazione del colorante all'equilibrio ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $k_L$ ,  $k_F$ ,  $k_S$ , e  $A_T$  sono le costanti di Langmuir, Freundlich, Sips, e Temkin,  $n_F$  and  $n_S$  sono gli esponenti di Freundlich e di Sips;  $k_{RP}$  e  $\alpha_{RP}$  sono i parametri caratteristici dell'isoterma di Red-Pet,  $\beta_{DR}$  and  $\epsilon$  sono il coefficiente di attività e il coefficiente di Polanyi dell'isoterma di Dub-Rad. Le isoterme di assorbimento sono riportate in **Figura 3.14** e i parametri matematici relativi ad ogni modello in **Tabella 3.1**.

**Tabella 3.1** Costanti e variabili dei modelli isothermici per il processo di adsorbimento.

Modello/Parametro		H <sub>SA</sub>	H <sub>SAFe</sub>	H <sub>SAGO</sub>	H <sub>SAFeGO</sub>
Langmuir	R <sup>2</sup>	0.98	0.97	0.96	0.99
	$q_{max}$ (10 <sup>2</sup> )	50.52	27.30	41.45	26.06
	$k_L$ (10 <sup>-2</sup> )	1.45	0.39	0.14	0.31
	$R_L$	0.58	0.84	0.93	0.87
Freundlich	R <sup>2</sup>	0.96	0.94	0.94	0.97
	$k_F$	14.15	34.30	16.58	35.60
	$1/n_F$	0.82	0.63	0.75	0.61
Red-Pet	R <sup>2</sup>	0.99	0.97	0.95	0.99
	$k_{RP}$	6.65	9.24	6.02	7.75
	$\alpha_{RP}$ (10 <sup>-2</sup> )	0.28	0.34	0.15	0.19
	$G$	2	1	1	1
	$q_{RP}$ (10 <sup>2</sup> )	23.75	27.25	39.09	40.79
Sips	R <sup>2</sup>	0.99	0.97	0.96	0.99
	$q_{max}$ (10 <sup>2</sup> )	20.73	61.69	27.12	25.08
	$k_S$ (10 <sup>-3</sup> )	0.07	3.95	0.06	2.76
	$n_S$	1.58	0.94	0.95	1.03
Dub-Rad	R <sup>2</sup>	0.98	0.90	0.90	0.92
	$q_{max}$ (10 <sup>2</sup> )	17.54	14.55	14.32	15.27
	$\beta_{DR}$ (10 <sup>2</sup> )	16.60	5.73	9.33	15.56
	$E$	0.02	0.03	0.02	0.02
Temkin	R <sup>2</sup>	0.45	0.33	0.35	0.37

$q_{max}$  (mg g<sup>-1</sup>);  $k_L$  (L mg<sup>-1</sup>);  $k_F$  (mg g<sup>-1</sup>(L mg<sup>-1</sup>)<sup>1/ $n_F$</sup> );  $k_{RP}$  (L mg<sup>-1</sup>);  $\alpha_{RP}$  (L mg<sup>-1</sup>) g;  $k_S$  ((L mg<sup>-1</sup>) <sup>$n_S$</sup> );  $\beta_{DR}$  (mol<sup>2</sup>/kJ<sup>2</sup>);  $E$  (kJ mol<sup>-1</sup>).



**Figura 3.14:** Modelli matematici relativi alle cinetiche di assorbimento degli idrogel sintetizzati (a:  $H_{SA}$ ; b:  $H_{SAFe}$ ; c:  $H_{SAGO}$ ; d:  $H_{SAFeGO}$ ).

Nel modello di Langmuir (**equazione 3.1**), inizialmente progettato per descrivere gli adsorbimenti in fase gassoso-solido, l'equilibrio dinamico di adsorbimento e desorbimento è descritto come l'equilibrio tra l'estensione della superficie assorbente disponibile (adsorbimento favorito) e rivestita dalle molecole di adsorbato (desorbimento favorito). Il modello descrive l'adsorbimento come un processo monostrato ideale, con un numero fisso di siti di legame disponibili sulla superficie dell'adsorbente e nessuna interazione tra le specie adsorbite. Come conseguenza di questa affermazione, in uno specifico sito assorbente nessun ulteriore adsorbimento può avvenire quando questo è occupato da una molecola di sorbato. In questo modello, il parametro di equilibrio  $R_L$  (**equazione 3.7**) è la caratteristica essenziale che denota la natura dell'adsorbimento come sfavorevole ( $R_L > 1$ ), lineare ( $R_L = 1$ ), favorevole ( $0 < R_L < 1$ ) o irreversibile ( $R_L = 0$ ).

$$R_L = \frac{1}{1 + k_L C_0} \quad (3.7)$$

I sistemi assorbenti eterogenei sono descritti dal modello di Freundlich (**equazione 3.2**), con il fattore di eterogeneità  $n_F$  che indica se il processo è favorevole ( $0 < 1/n_F <$

1), irreversibile ( $1/n_F = 1$ ) o sfavorevole ( $1/n_F > 1$ ). I processi di assorbimento investigati sono risultati come favorevoli da entrambi i modelli ( $0 < R_L < 1$  e  $0 < \frac{1}{n_F} < 1$ ), dimostrando l'idoneità degli idrogel ibridi come materiali assorbenti efficaci.

Maggiori informazioni possono essere ottenute dall'applicazione del modello Red-Pet (**equazione 3.3**), spesso usato come compromesso tra i sistemi di Freundlich e Langmuir in base al valore  $g$  compreso tra 0 e 1: un'isoterma di Langmuir si ottiene infatti quando  $g = 1$ , mentre  $\alpha_{RP} C_e^g \gg 1$  rappresenta il modello di Freundlich. I dati della **Figura 3.14** (linee verdi) e della **Tabella 3.1** dimostrano l'idoneità di questo modello nel descrivere l'adsorbimento ( $R^2 > 0,95$  per tutte le matrici polimeriche). Dall'analisi della capacità di assorbimento  $q_{RP}$  (calcolato dall'**equazione 3.8**) è evidente la maggiore affinità degli idrogel contenenti grafene.

$$q_{RP} = \frac{k_{RP}}{\alpha_{RP}} \quad (3.8)$$

L'isoterma di Sips (**Figura 3.14**, linee viola) è un altro modello a tre parametri applicato per descrivere il processo di assorbimento (**equazione 3.4**) come una combinazione di quelli di Langmuir e Freundlich. In questo caso  $n_s = 1$  e  $K_s$  vicino a 0 risultano rispettivamente nelle equazioni di Langmuir e Freundlich. I parametri calcolati (**Tabella 3.1**) mostrano che il processo di assorbimento è intermedio tra i due modelli limite, discostandosi da Langmuir in particolare per il sistema HSA, in accordo con i dati ottenuti dal modello Red-Pet.

Dub-Rad (**equazione 3.5**) è, invece, un modello più generale, che non assume superfici omogenee o eterogenee, ed è utile per comprendere la natura (chimica o fisica) del processo di adsorbimento. In questo modello, il parametro chiave è l'energia apparente del meccanismo di adsorbimento ( $E$ , **equazione 3.9**), che indica un processo chimico ( $8 \text{ kJ mol}^{-1} < E < 16 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) o fisico ( $E < 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).

$$E = (2\beta)^{-1/2} \quad (3.9)$$

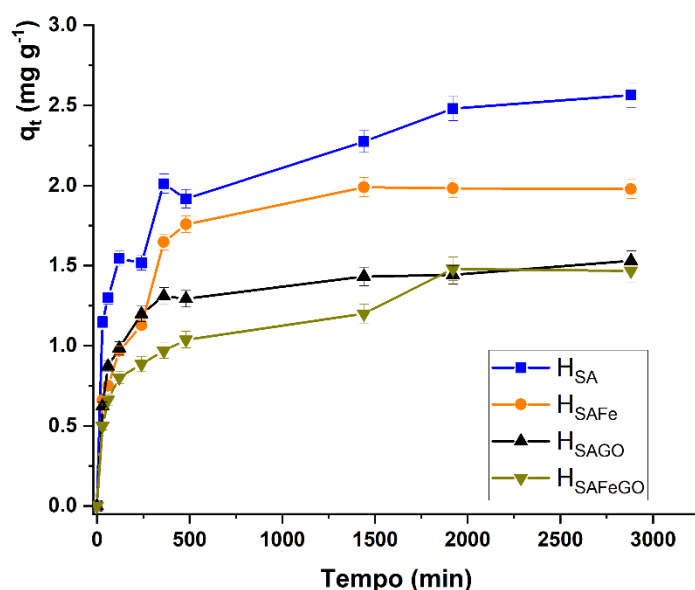
Il modello è risultato adatto a descrivere l'adsorbimento del MB da parte di tutti gli idrogel sintetizzati ( $R^2 > 0,90$ , **Tabella 3.1**), con i valori di  $E$  ottenuti che indicano un fenomeno prevalentemente fisico in tutti i casi.

Infine, è stato applicato ai dati sperimentali il modello Temkin (**equazione 3.6**), che prende in considerazione l'energia libera del processo di assorbimento. Il modello non si è tuttavia dimostrato idoneo a descrivere i dati sperimentali.

### 3.6 Cinetiche di Assorbimento

Per poter valutare la cinetica di assorbimento dei polimeri, campioni di ciascuna membrana sono stati posti a contatto con una soluzione a concentrazione nota di MB ( $0,008 \text{ mg ml}^{-1}$ ) per 48 h. Ad intervalli di tempo prestabiliti, il polimero è stato rimosso dalla soluzione e la concentrazione di MB residua è stata determinata per via spettrofotometrica.

I primi test mostravano che le membrane avevano un salto di assorbimento tra le 6 e le 8 ore, dovuto al riarrangiamento delle catene nel reticolo dell'idrogel in seguito al repentino assorbimento di acqua. Di conseguenza, è stato deciso di proseguire i test partendo da membrane precedentemente swellate in  $\text{H}_2\text{O}$  per 24/48 h. Procedendo in questo modo il jump non si è manifestato e la curva di assorbimento è risultata più uniforme (**Figura 3.15**). Si osserva come la membrana di riferimento ( $\text{H}_{\text{SA}}$ ) abbia un maggiore assorbimento rispetto alle altre. Questo fenomeno potrebbe essere ricondotto all'interferenza del GO nel processo di reticolazione, che porta infatti a matrici dotate di maggior grado di rigonfiamento e quindi capaci di trattenere minori quantità di MB nonostante la presenza di GO quale elemento funzionale.

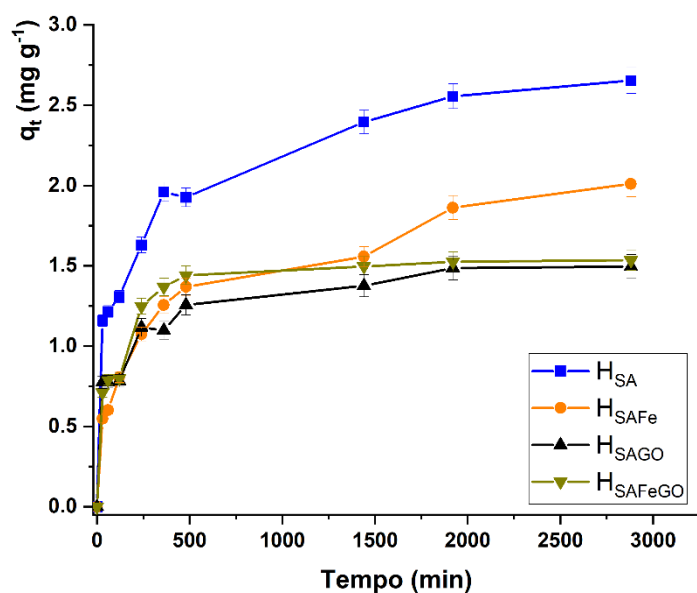


**Figura 3.15:** Cinetiche d'assorbimento degli idrogel sintetizzati in assenza di campo magnetico esterno.

Successivamente è stata valutata la cinetica di assorbimento in presenza di un campo magnetico (**Figura 3.16**). I risultati sono mostrati in **Figura 3.17**.

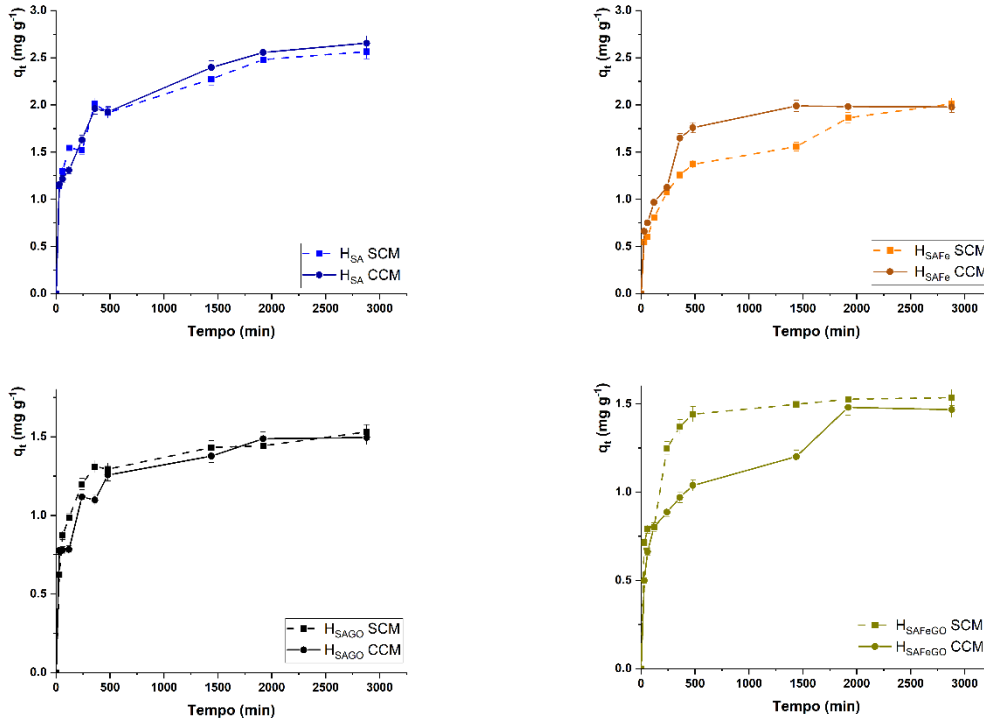


**Figura 3.16:** *Esperimenti di assorbimento in presenza di campo magnetico esterno.*



**Figura 3.17:** *Cinetiche d'assorbimento degli idrogel sintetizzati in presenza di campo magnetico esterno.*

Come per i profili di rigonfiamento, anche in questo caso si procede con un'analisi comparativa del comportamento delle singole matrici in assenza e in presenza di campo magnetico esterno (**Figura 3.18**).



**Figura 3.18:** Confronto delle cinetiche d'assorbimento in presenza ed in assenza di un campo magnetico.

I grafici mostrano come in presenza di un campo magnetico la cinetica delle matrici polimeriche contenenti l'elemento magnetic-responsive venga alterata, mentre i profili d'assorbimento delle membrane che non contengono l'ossido ferrico non presentino differenze significative. Per meglio valutare l'andamento cinetico, il tasso di adsorbimento è stato studiato da sei modelli che descrivono cinetiche di pseudo-primo ordine, pseudo secondo ordine, diffusione intraparticellare, Avrami, potenza frazionaria, ed Elovich (equazioni 3.10-3.15).

$$\text{Pseudo-primo ordine} \quad q_t = q_e (1 - e^{-k_1 t}) \quad (3.10)$$

$$\text{Pseudo-secondo ordine} \quad q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t} \quad (3.11)$$

$$\text{Avrami} \quad q_t = q_e [1 - e^{-(k_A t)^n}] \quad (3.12)$$

$$\text{Potenza frazionaria} \quad q_t = k_p t^\nu \quad (3.13)$$

$$\text{Diffusione intraparticellare} \quad q_t = k_i t^{1/2} + C \quad (3.14)$$

$$\text{Elovich} \quad q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha \beta t) \quad (3.15)$$

$q_e$  è la capacità di adsorbimento dell'adsorbente all'equilibrio ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_A$ ,  $k_p$  e  $k_i$  sono le costanti cinetiche dei modelli di pseudo primo ordine, pseudo-secondo ordine,

---

Avrami, potenza frazionaria e diffusione intraparticellare,  $n$  e  $v$  sono gli esponenti di Avrami e della potenza frazionata,  $\alpha$  and  $\beta$  indicano l'assorbimento iniziale e i tassi di desorbimento del modello di Elovich.

In **Figura 3.19** sono riportate le curve ottenute in seguito all'applicazione delle equazioni 3.1-3.6 ai dati sperimentali.

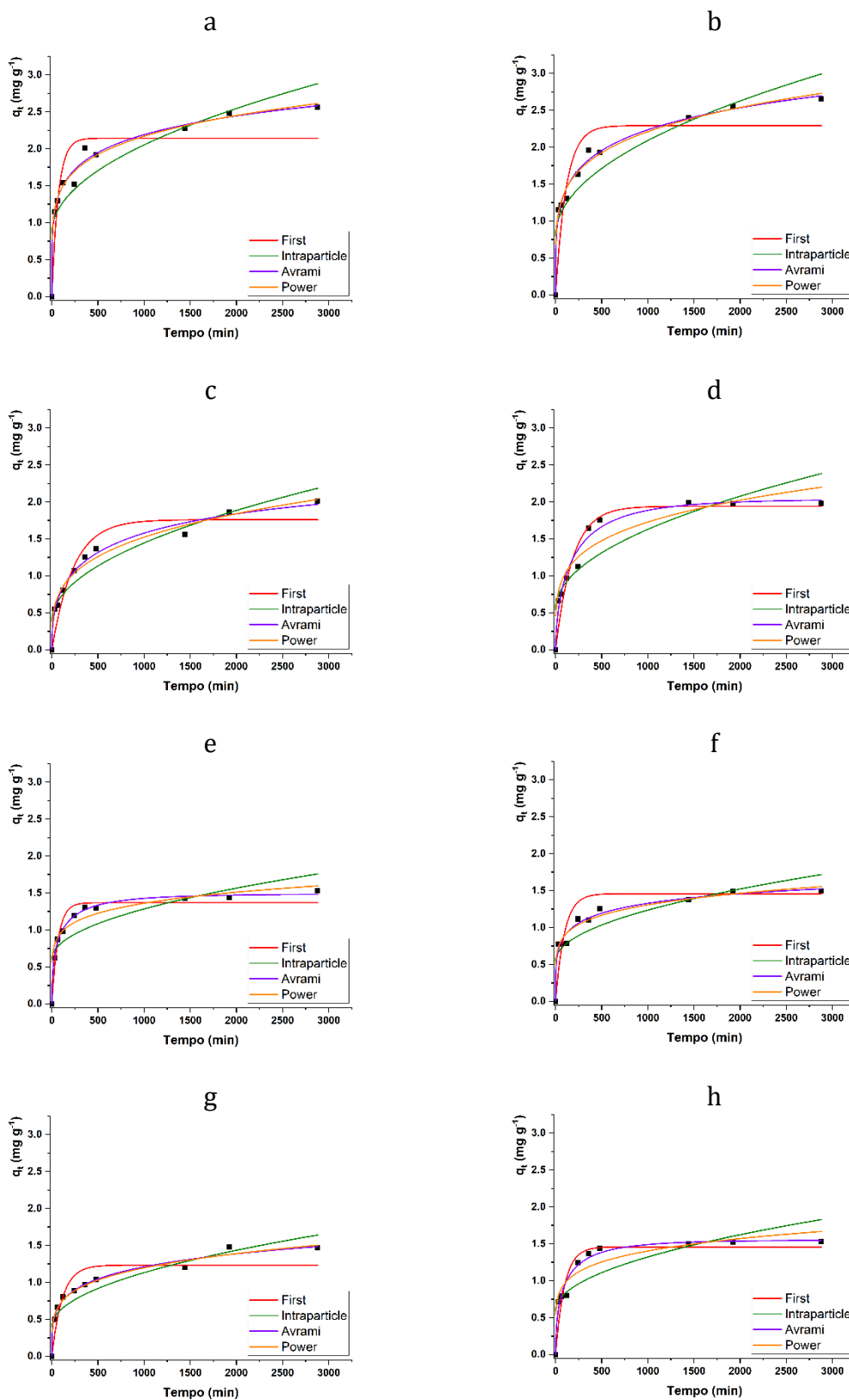
La **Tabella 3.2** riporta i parametri matematici ottenuti per ogni modello. In tabella è anche introdotto il rapporto ( $\Delta$ ) quale indice della variazione (%) di un determinato parametro in seguito all'applicazione del campo magnetico esterno.

In primo luogo, sono stati considerati modelli di pseudo-primo ordine (**equazione 3.10**) e pseudo-secondo ordine (**equazione 3.11**). Nel primo caso la velocità di adsorbimento è funzione della capacità totale di adsorbimento, mentre nel secondo caso viene considerato il contributo della condivisione elettronica tra l'assorbente e il sorbato.

Il confronto dei risultati di modelli di pseudo-primo e pseudo-secondo ordine (**Tabella 3.2**) indica chiaramente che il modello del secondo ordine non è adatto a descrivere il processo di assorbimento, evidenziando come il processo di adsorbimento sia prevalentemente fisico, mentre il comportamento elettronico sia della superficie dell'idrogel che delle molecole di colorante non svolge un ruolo cruciale nel determinare le interazioni adsorbente/adsorbato. L'applicazione del campo magnetico, inoltre, determina un aumento delle proprietà di assorbimento, prevalentemente in termini di velocità di assorbimento piuttosto che di quantità di colorante assorbita all'equilibrio.

Poiché dati di letteratura suggeriscono che generalmente il meccanismo di assorbimento è un fenomeno complesso che coinvolge più ordini cinetici che possono cambiare durante le interazioni adsorbente/ sorbato, è stato applicato il modello cinetico di Avrami (**equazione 3.12**), poiché l'esponente di Avrami  $n$  è un chiaro indicatore dei cambiamenti nel meccanismo di adsorbimento durante l'intero processo. Si osserva chiaramente come i diversi idrogel abbiano diversi valori di  $n$ , ad indicare come la presenza di GO e Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vada a modificare profondamente le cinetiche di assorbimento, che tuttavia non varia in seguito all'applicazione del campo magnetico esterno. I parametri  $q_e$  e  $k_A$  seguono lo stesso andamento registrato per il modello di primo ordine.





**Figura 3.19:** Modelli matematici relativi alle cinetiche di assorbimento degli idrogel  $H_{SA}$  (a,b);  $H_{SAFe}$  (c,d);  $H_{SAGO}$  (e,f);  $H_{SAFeGO}$  (g,h).

**Tabella 3.2.** Parametri dei modelli cinetici applicati ai processi di adsorbimento.

Modello/Parametro		H <sub>SA</sub>			H <sub>SAFe</sub>			H <sub>SAGO</sub>			H <sub>SAFeGO</sub>		
		SCM	CCM	$\Delta$ (%)	SCM	CCM	$\Delta$ (%)	SCM	CCM	$\Delta$ (%)	SCM	CCM	$\Delta$ (%)
Pseudo- primo ordine	R <sup>2</sup>	0.91	0.93	---	0.94	0.92	---	0.91	0.91	---	0.92	0.93	---
	$q_e$	2.04	2.09	2	1.76	1.94	10	1.34	1.37	2	1.23	1.46	18
	$k_1$	1.04	0.97	7	0.43	0.54	26	1.49	1.36	8	0.88	1.25	41
	(10 <sup>-2</sup> )												
Pseudo- secondo ordine	R <sup>2</sup>	0.55	0.30	---	0.48	0.35	---	0.47	0.35	---	0.58	0.41	---
Avrami	R <sup>2</sup>	0.98	0.97	---	0.99	0.98	---	0.98	0.98	---	0.97	0.96	---
	$q_e$	4.22	4.57	8	2.04	2.49	22	1.94	1.95	0.1	1.55	1.66	72
	$k_A$	0.03	0.03	0.7	0.47	1.02	115	1.7	1.7	2	0.02	0.89	5241
	(10 <sup>-2</sup> )												
Potenza frazionata	$n$	0.24	0.27	---	0.47	0.42	---	0.48	0.47	---	0.51	0.53	---
	R <sup>2</sup>	0.97	0.95	---	0.90	0.98	---	0.95	0.96	---	0.91	0.97	---
	$q_e$	1.84	2.13	16	1.03	1.80	75	1.02	1.26	24	0.96	1.77	84
	$K_p$	0.65	0.66	0.6	0.27	0.36	33	0.42	0.48	14	0.27	0.46	69
Diffusione intraparticellare	$V$	0.18	0.20	---	0.23	0.27	---	0.15	0.16	---	0.22	0.23	---
	R <sup>2</sup>	0.91	0.91	---	0.92	0.92	---	0.92	0.91	---	0.92	0.93	---
	$q_e$	1.58	1.57	---	6.24	7.51	---	1.01	0.96	---	4.20	11.6 9	---
	$k_i$	0.04	0.04	8	0.30	0.38	27	0.02	0.02	2	0.2	0.4	198
Elovich	C	0.86	0.80	---	0.55	0.30	---	0.60	0.54	---	0.40	0.40	---
	R <sup>2</sup>	0.66	0.54	---	0.59	0.35	---	0.74	0.69	---	0.57	0.48	---

$q_e$  (mg g<sup>-1</sup>);  $k_1$  (min<sup>-1</sup>);  $k_A$  (min<sup>-1</sup>),  $k_p$  (mg g<sup>-1</sup> min<sup>-v</sup>);  $k_i$  (mg g<sup>-1</sup> min<sup>-1/2</sup>)

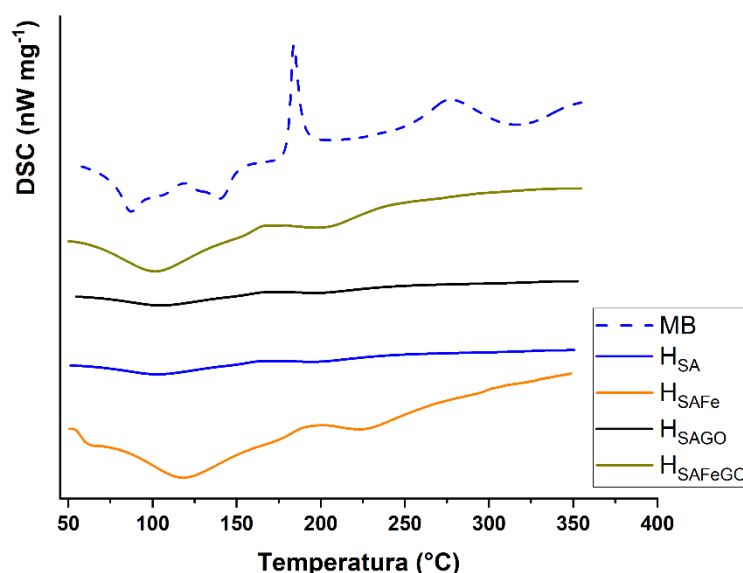
I parametri ottenuti applicando il modello di potenza frazionaria (**equazione 3.13**) sembrano essere invece in disaccordo con quanto registrato con il modello del primo ordine, poiché, in seguito all'applicazione dello stimolo magnetico, si registra una variazione più consistente nella quantità di colorante assorbita all'equilibrio piuttosto

che nella velocità di assorbimento. Questo tuttavia è da ricondurre al fatto che il modello è poco adatto a descrivere il processo di assorbimento in assenza di campo magnetico (bassi valori di  $R^2$ ). L'applicazione del modello di diffusione intraparticellare (**equazione 3.14**) mira a chiarire il contributo della diffusione delle molecole di colorante all'interno della rete dell'idrogel. Si riscontra che l'assorbimento è principalmente un fenomeno superficiale (bassi valori di  $R^2$ ). Infine, il modello di Elovich (**equazione 3.15**), che mira a determinare la correlazione tra il tasso di adsorbimento iniziale e la costante di velocità in qualsiasi fase del processo non risulta applicabile, ad indicare come, dato l'elevato grado di rigonfiamento del sistema, la saturazione dei siti di legame del colorante sia estremamente lenta.

### 3.7 Determinazione dei profili di rilascio

Come riportato in letteratura, le proprietà antimicrobiche del MB possono essere sfruttate a fini terapeutici quando si dispone di sistemi in grado di modularne la concentrazione nel sito d'azione. Nel presente lavoro di tesi è stata quindi esplorata la possibilità di sfruttare per applicazioni in campo biomedico e farmaceutico l'elevata capacità degli idrogel sintetizzati di interagire ed assorbire il MB in soluzione.

Un'analisi preliminare è stata effettuata considerando le curve DSC dei campioni caricati con MB (**Figura 3.20**).



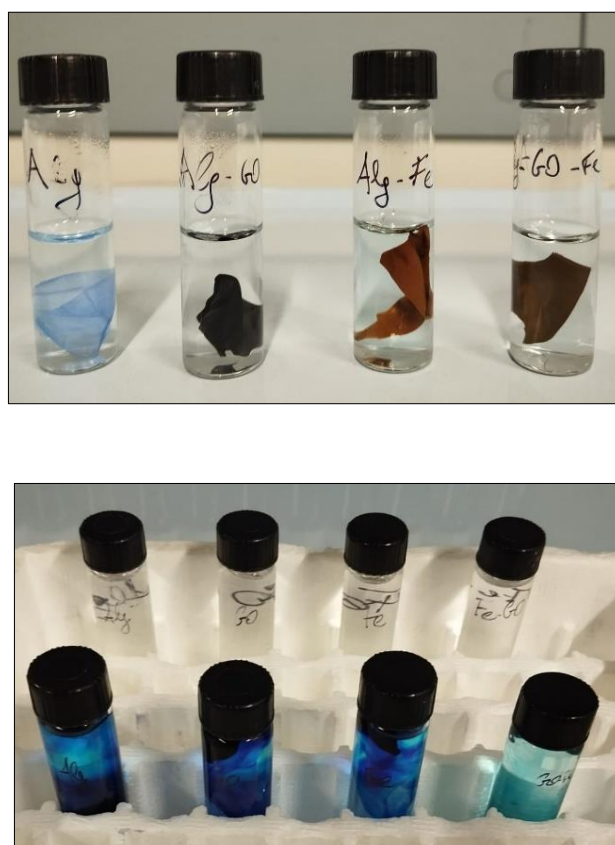
**Figura 3.20.** Analisi DSC degli idrogel sintetizzati in seguito ad assorbimento del MB

È noto infatti che un pre-requisito affinché un sistema sia in grado di modulare le cinetiche di rilascio di un principio attivo è che quest'ultimo sia molecularmente disperso, senza siti di cristallizzazione.

I risultati ottenuti mostrano chiaramente che tutte le matrici soddisfano questo requisito, in quanto in nessuna curva è evidente la transizione a 184°C riconducibile alla decomposizione del colorante.

Sono stati quindi approntati esperimenti di rilascio in cui gli idrogel precedentemente sottoposti a cicli di assorbimento sono stati collocati in mezzi di rilascio adeguati. Per tale scopo, è stato deciso di valutare i profili di rilascio sia a pH 7.0 che a pH acido (3.0), poiché è noto che tali condizioni promuovono il desorbimento del colorante da matrici assorbenti di diversa natura, inclusi sistemi polimerici.

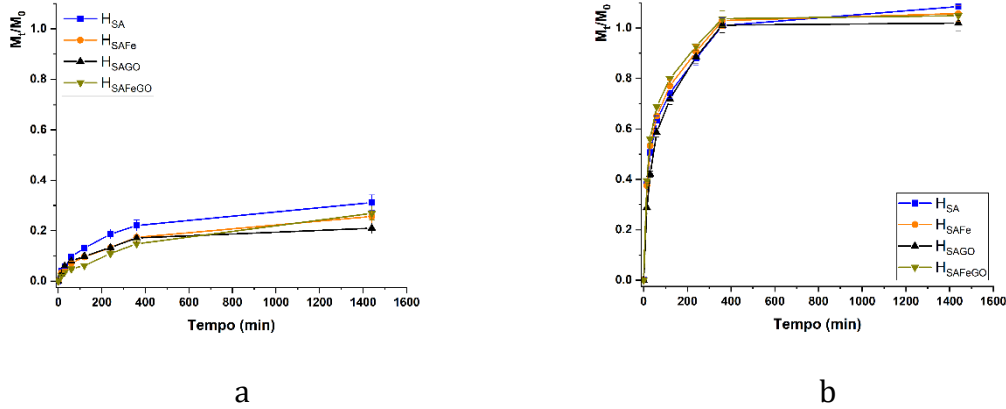
Come atteso, si nota che in ambiente fisiologico la quantità di MB rilasciato è praticamente trascurabile, mentre in condizioni acide il rilascio diventa particolarmente evidente (**Figura 3.21**).



**Figura 3.21:** Esperimenti di rilascio di MB a pH 7.0 (in alto) e 3.0 (in basso).

Per determinare analiticamente i profili di rilascio, le membrane impregnate di MB sono state quindi poste nel mezzo di rilascio ed i profili di cessione del farmaco sono stati poi ottenuti in seguito a determinazione spettrofotometrica della quantità di MB presente in soluzione.

In **Figura 3.22** sono riportati i profili di rilascio calcolati in accordo all'**equazione 2.7**.



**Figura 3.22:** Profili di rilascio di MB dalle matrici polimeriche (a: pH 7.0; b: pH= 3.0).

Si nota chiaramente che tutti i rilasci hanno un comportamento pH sensibile, con le quantità di MB rilasciate in ambiente acido significativamente più alte di quelle registrate a pH fisiologico. Questo è estremamente importante da un punto di vista applicativo, in quanto è noto che un'infezione attiva una serie di processi biologici che portano ad un significativo abbassamento del pH. Pertanto, tutti i sistemi sono in grado di evitare un rilascio di MB in condizioni fisiologiche (quantità di MB in soluzione inferiore al 30% anche dopo 24h), riducendo quindi i rischi di insorgenza di effetti collaterali. Al contrario, in presenza di micro-organismi responsabili dell'abbassamento del pH, il rilascio viene attivato (rilascio completo in 3 ore).

Le relative cinetiche sono state analizzate utilizzando due modelli matematici proposti da Reis (**Equazione 3.16**) e Peppas-Sahlin (**Equazione 3.17**).

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{max}(1 - e^{-(k_R/M_{max})t}) \quad (3.16)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = K_1 \cdot t^{1/2} + K_2 \cdot t \quad (3.17)$$

Il primo modello considera la quantità di farmaco che passa nel mezzo di rilascio come il risultato della ripartizione tra il veicolo e il mezzo di rilascio, mentre con il secondo è possibile determinare il contributo della diffusione Fickiana (primo termine) e anomala (secondo termine) alla velocità di rilascio.

Il modello di Reis permette inoltre di determinare l'affinità fisico-chimica ( $\alpha$ ) del farmaco tra il mezzo esterno e il veicolo può essere determinata secondo l'**equazione 3.18**:

$$\alpha = \frac{M_{max}}{1-M_{max}} \quad (3.18)$$

In pratica, il parametro  $\alpha$  può essere assimilato al coefficiente di ripartizione tra il carrier e il mezzo di rilascio del farmaco.

I risultati ottenuti dall'applicazione dei due modelli sono riportati in **Tabella 3.3**.

**Tabella 3.3.** parametri cinetici del rilascio di MB dalle matrici polimeriche.

Modello/Parametro		H <sub>SA</sub>		H <sub>SAFe</sub>		H <sub>SAGO</sub>		H <sub>SAFeGO</sub>	
		7.0	3.0	7.0	3.0	7.0	3.0	7.0	3.0
Reis	R <sup>2</sup>	0.97	0.92	0.96	0.94	0.94	0.96	0.98	0.97
	M <sub>max</sub>	0.30	0.96	0.25	0.96	0.2	0.96	0.28	0.97
	$\alpha$	0.4	24	0.3	24	0.3	24	0.4	32
	k <sub>R</sub> (10 <sup>-2</sup> )	0.5	2.1	0.4	2.2	0.6	1.5	0.2	2.5
Peppas-Sahlin	R <sup>2</sup>	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
	K <sub>1</sub> (10 <sup>-1</sup> )	0.08	1.5	0.07	1.5	0.08	4.7	0.03	1.7
	K <sub>2</sub> (10 <sup>-3</sup> )	0.06	5.2	0.04	5.3	0.07	1.9	0.01	0.7

I risultati mostrano chiaramente che la riduzione del pH non porta solo ad un aumento della quantità di farmaco rilasciato, ma che la riduzione dell'affinità farmaco-matrice (aumento dei valori di  $\alpha$ ) determina anche un aumento della velocità del rilascio, come evidenziato dal significativo aumento dei valori di tutte le costanti cinetiche. Inoltre, il modello di Peppas-Sahlin evidenzia come il rilascio segua prevalentemente un meccanismo di diffusione Fickiana ( $K_1 \gg K_2$ ), con il contributo anomalo che diventa più significativo a pH acido data la protonazione della molecola di MB.

---

## CONCLUSIONI

Scopo del presente lavoro di tesi è stato la progettazione, la realizzazione e la caratterizzazione di un sistema composito idrogel-nanoparticelle magnetiche capace di rispondere al duplice stimolo pH-magnetico. Il sistema è pensato per applicazioni sia nel trattamento delle acque reflue che per la medicazione funzionale delle ferite cutanee: a tale scopo è stato selezionato il blu di metilene quale molecola contaminante ma con proprietà antimicrobiche.

Nello specifico, il sistema è costituito da una rete polimerica di alginato reticolato mediante ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , in cui sono stati inseriti elementi quali l'ossido di grafene e l'ossido ferrico.

Per valutare l'effetto dei singoli componenti sulle caratteristiche chimico-fisiche e funzionali del sistema finale, sono state esaminate tutte le combinazioni possibili, con e senza GO e  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , attraverso un approccio comparativo, sono stati discussi i meccanismi e le cinetiche di adsorbimento utilizzando dei modelli matematici.

I risultati hanno mostrato come l'inserimento dei sistemi nanoparticellari non vada a modificare i meccanismi di assorbimento, che sono termodinamicamente favoriti, di natura fisica e prevalentemente superficiali. L'applicazione del campo magnetico va a modificare le cinetiche di assorbimento come conseguenza della modulazione del grado di rigonfiamento: in presenza di elemento magneto-responsivo e di campo magnetico applicato, l'assorbimento risulta più rapido.

Infine, i sistemi sono risultati in grado di controllare il rilascio del blu di metilene in funzione del pH. A valori di pH neutro, si registrano percentuali di rilascio trascurabili, un effetto che ben si presta ad applicazioni biomediche poiché evita possibili effetti collaterali. Nello stesso tempo però, la riduzione del pH funge da innesco al rilascio che diventa più consistente e più veloce, lasciando intuire la possibilità di inibire efficacemente la contaminazione microbica nel sito di applicazione.

In definitiva, i sistemi polimerici così realizzati dimostrano un potenziale significativo per la realizzazione di idrogel multifunzionali e dual-stimuli responsive con possibili applicazioni nell'*environmental health* e nell'area biomedica.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Dan Zheng, Kai Wang, Bo Bai. A critical review of sodium alginate-based composites in water treatment. Carbohydrate Polymers. Volume 331, 1 May 2024, 121850;
- [2] Vibha Sinha, Sumedha Chakma. Advances in the preparation of hydrogel for wastewater treatment: A concise review. Journal of Environmental Chemical Engineering. Volume 7, Issue 5, October 2019, 103295.
- [3] A.M. Dimiev, S. Eigler Graphene Oxide: Fundamentals and Application (2016), 10.1002/9781119069447;
- [4] Immagine tratta da: *giubberosse.news*;
- [5] F. Ortolani, L. Ortola, V. Morandi, D. Reali. Grafene: Proprietà, Sintesi e Applicazioni. Alma Mater Studiorum · Università di Bologna;
- [6] Immagine tratta da: *F. Ortolani, L. Ortola, V. Morandi, D. Reali. Grafene: Proprietà, Sintesi e Applicazioni. Alma Mater Studiorum Università di Bologna*;
- [7] Ashcroft, Neil W.; Mermin, N. David Solid State Physics, Cengage Learning Emea. (1976);
- [8] Ruess G., Vogt F. Höchstlamellarer Kohlenstoff aus Graphitoxhydroxyd, Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften, Volume 78, Issue 3-4 , pp 222-242. (1948);
- [9] Boehm H. P. et. al. Das Adsorptionsverhalten sehr dünner Kohlenstoff-Folien, Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie Volume 316, Issue 3-4, pages 119–127. (1962);
- [10] Immagine tratta da: *www.researchgate.net*;
- [11] Andrew T. Smith, Anna Marie LaChance, Songshan Zeng, Bin Liu, Luyi Sun. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. Nano Materials Science. Volume 1, Issue 1, March 2019, Pages 31-47;



- [12] Immagine tratta da: *www.researchgate.net*;
- [13] Novoselov, K. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films, *Science* 306, 666–669 (2004);
- [14] Chen, J. H. et al. Intrinsic and Extrinsic Performance Limits of Graphene Devices on SiO<sub>2</sub>, *Nature Nanotechnology* 3 4): 206–9. (2008);
- [15] Novoselov, K. S. et al. Electronic properties of graphene, *phys. stat. sol. (b)* 244, 4106–4111. (2007);
- [16] L. Tang, X. Li, R. Ji, K.S. Teng, G. Tai, J. Ye, C. Wei, S.P. Lau. Bottom-up synthesis of large-scale graphene oxide nanosheets. *J. Mater. Chem.*, 22 (12) (2012), pp. 5676-5683;
- [17] Balandin, A. A. et al. Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene, *Nano Letters ASAP* 8 3): 902–907. (2008-02-20);
- [18] J.D. Renteria, S. Ramirez, H. Malekpour, B. Alonso, A. Centeno, A. Zurutuza, A.I. Co-cemasov, D.L. Nika, A.A. Balandin. Strongly anisotropic thermal conductivity of free-standing reduced graphene oxide films annealed at high temperature. *Adv. Funct. Mater.*, 25 (29) (2015), pp. 4664-4672;
- [19] A.L. Higginbotham, J.R. Lomeda, A.B. Morgan, J.M. Tour. Graphite oxide flame-retardant polymer nanocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 1 (10) (2009), pp. 2256-2261;
- [20] Lee, C., X. Wei, J. W. Kysar e J. Hone (2008). Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science*, 321, 385;
- [21] Gardiner, D.J. *Practical Raman spectroscopy*, Springer-Verlag. (1989);
- [22] Jae-Ung Lee, Duhee Yoon, Hyeonsik Cheong Estimation of Young's Modulus of Graphene by Raman Spectroscopy, *Nano Letters*, ACS Publication. (2012);
- [23] J.W. Suk, R.D. Piner, J. An, R.S. Ruoff. Mechanical properties of monolayer graphene oxide. *ACS Nano*, 4 (11) (2010), pp. 6557-6564;

- [24] T. Cheng-An, Z. Hao, W. Fang, Z. Hui, Z. Xiaorong, W. Jianfang. Mechanical properties of graphene oxide/polyvinyl alcohol composite film. *Polym. Polym. Compos.*, 25 (1) (2017), pp. 11-16;
- [25] [your-physicist.com/paramagnetismo/](http://your-physicist.com/paramagnetismo/);
- [26] T.-Y. Yang, J. Balakrishnan, F. Volmer, A. Avsar, M. Jaiswal, J. Samm, et al. Observation of long spin-relaxation times in bilayer graphene at room temperature. *Phys Rev Lett*, 107 (4) (2011);
- [27] Ramakrishna Matte, H. S. S., K. S. Subrahmanyam e C. N. R Rao (2009). Novel magnetic properties of graphene: presence of both ferromagnetic and antiferromagnetic features and other aspects. *The Journal of Physical Chemistry C* 2009, 113:23, 9982-9985;
- [28] Nujiang Tang, Tao Tang Hongzhe Pan, Yuanyuan Sun, Jie Chen, Youwei Du (2020). Magnetic properties of graphene, *Spintronic 2D Materials Fundamentals and Applications*, 137-161;
- [29] Xiaodong Zhang, Guoqiang Li, Qian Li, M.S. Shaikh, Zichao Li (2021). The pure paramagnetism in graphene oxide ;
- [30] Supplement 2. Fabrizio Parodi, in *Comprehensive Polymer Science and Supplements*, 1989. 19.3.1.2(iv) Paramagnetism;
- [31] Malard, L. M., M. A. Pimenta, G. Dresselhaus e M. S. Dresselhaus (2009). Raman spectroscopy in graphene. *Physics Reports*, 473, 51-87;
- [32] Novoselov, K. S. e A. K. Geim (2007). The rise of graphene. *Nature Materials*, 6, 183- 191;
- [33] Geim, A. K. (2009). Graphene: Status and Prospects. *Science*, 324, 1530-1534;
- [34] Ciesielski, A. e P. Samorì (2014). Graphene via sonication assisted liquid-phase exfoliation. *Chem. Soc. Rev*, 43, 381-398;
- [35] Viculis, L. M.; Mack, J. J.; Kaner, R. B. A Chemical Route to Carbon Nanoscrolls, *Science* 299, 1361. (2003);

- [36] Hummers, W. S. e R. Offeman (1958). Preparation of graphitic oxide. J. Am. Chem. Soc., 80:6, 1339;
- [37] Andrew T. Smith, Anna Marie LaChance, Songsshan Zeng, Bin Liu, Luyi Sun. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. Nano Materials Science. Volume 1, Issue 1, March 2019, Pages 31-47;
- [38] Geim, A. K. (2009). Graphene: Status and Prospects. Science, 324, 1530-1534;
- [39] Andrew T. Smith, Anna Marie LaChance, Songsshan Zeng, Bin Liu, Luyi Sun. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. Nano Materials Science. Volume 1, Issue 1, March 2019, Pages 31-47;
- [40] H. Yang, L. Bolling, M.A. Priolo, J.C. Grunlan. Super gas barrier and selectivity of graphene oxide-polymer multilayer thin films. Adv. Mater., 25 (4) (2013), pp. 503-508;
- [41] Andrew T. Smith, Anna Marie LaChance, Songsshan Zeng, Bin Liu, Luyi Sun. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. Nano Materials Science. Volume 1, Issue 1, March 2019, Pages 31-47;
- [42] C.-N. Yeh, K. Raidongia, J. Shao, Q.-H. Yang, J. Huang. On the origin of the stability of graphene oxide membranes in water. Nat. Chem., 7 (2015), p. 166;
- [43] B. Tansel. Significance of thermodynamic and physical characteristics on permeation of ions during membrane separation: hydrated radius, hydration free energy and viscous effects. Separ. Purif. Technol., 86 (2012), pp. 119-126;
- [44] A.H. Compton. The spectrum of scattered X-rays. Phys. Rev., 22 (1923), pp. 409-413;
- [45] Zhihao Zhang, Hannes C. Schniepp, Douglas H. Adamson. Characterization of graphene oxide: Variations in reported approaches;
- [46] Dan Zheng, Kai Wang, Bo Bai. A critical review of sodium alginate-based composites in water treatment. Carbohydrate Polymers, Volume 331, 31 January 2024, 121850;

- [47] Miao Zhang, Xia Zhao. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 162, 1 November 2020, Pages 1414-1428;
- [48] Chuhuan Hu, Wei Lu, Analucia Mata, Katsuyoshi Nishinari, Yapeng Fang. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 177, 30 April 2021, Pages 578-588;
- [49] R. Abka-khajouei, L. Tounsi, N. Shahabi, A.K. Patel, S. Abdelkafi, P. Michaud. Structures, properties and applications of alginates. *Marine Drugs*, 20 (6) (2022), p. 364;
- [50] S. Teja, Pei-Yoong Koh. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials. Volume 55, Issues 1–2, March–June 2009, Pages 22-45;
- [51] V.P. Ponomar, T.S. Antonenko, O.A. Vyshnevskiy, A.B. Brik. Thermally induced changes in the magnetic properties of iron oxide nanoparticles under reducing and oxidizing conditions. *Advanced Powder Technology* Volume 31, Issue 7, July 2020, Pages 2587-2596;
- [52] Attarad Ali, Hira Zafar, Muhammad Zia, Ihsan ul Haq, Abdul Rehman Phull, Joham Sarfraz Ali and Altaf Hussain. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl*. 2016; 9: 49–67;
- [53] Peter Olusakin Oladoye, Timothy Oladiran Ajiboye, Elizabeth Oyinkansola Omotola, Olusola Joel Oyewola. Methylene blue dye: Toxicity and potential elimination technology from wastewater. *Results in Engineering*. Volume 16, December 2022, 100678;
- [54] Immagine da: *it.wikipedia.org/wiki/Blu\_di\_metilene*.
- [55] Peter Olusakin Oladoye, Timothy Oladiran Ajiboye, Elizabeth Oyinkansola Omotola, Olusola Joel Oyewola. Methylene blue dye: Toxicity and potential elimination technology from wastewater. *Results in Engineering*. Volume 16, December 2022, 100678;

- [56] Ermek Belekov, Khomidkhodza Kholikov, Lauren Cooper, Simran Banga, Ali O. Er. Improved antimicrobial properties of methylene blue attached to silver nanoparticles. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. Volume 32, December 2020, 102012;
- [57] Methylene Blue as a Disinfectant: Investigating Its Antimicrobial Properties. <http://blubrain.co.uk/methylene-blue-as-a-disinfectant>;
- [58] A. R. Kulkarni, K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. M. Dave, M. H. Mehta: Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application, Journal of Controlled Release, 2000; 63: 97-105;
- [59] Zhenguang Li, Yingze Li, Chang Chen, Yu Cheng. Magnetic-responsive hydrogels: From strategic design to biomedical applications. Journal of Controlled Release. Volume 335, 10 July 2021, Pages 541-556;
- [60] Fangli Gang, Le Jiang, Yi Xiao, Jiwen Zhang, Xiaodan Sun. Multi-functional magnetic hydrogel: Design strategies and applications. Nano Select Volume 2, Issue 12 Dec 2021 Pages 2237-2472;
- [61] C. P. Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, F. Veiga: Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2006; 2: 8-21;

## Ringraziamenti

*Alla mia famiglia.*

*Ai miei amici.*

*A chi mi vuole bene.*

*A chi mi è stato vicino.*

*Grazie per esserci stati sempre, grazie per tutto quello che avete fatto. Voglio che siate fieri di me.*

*“Le piccole menti discutono le persone.*

*Le grandi menti discutono i fatti, le grandi menti discutono le idee”.*

*Prima di oggi mi chiedevo cosa sarebbe successo se non ce l'avessi fatta, se non avessi raggiunto questo traguardo... se non fossi stato all'altezza.*

*“Well... I guess we'll never know!”.*

*(Beh... immagino che non lo sapremo mai!)*

*\*parte la musica\**

*Ripropongo in maniera più estesa:*

*A mio padre, capitano e timone della mia esistenza, che ha sempre cercato di guidare la mia rotta in porti sicuri. Malgrado la bufera della mia vita non mi abbia permesso di seguire il giusto tragitto lui è rimasto sempre al mio fianco, non abbandonando mai la nave e credendo in me... sempre.*

*A mia madre, vento impetuoso e brezza leggera, che mi sospinge dandomi la forza di andare avanti. Nonostante le onde e le correnti contrarie, nonostante la tempesta cerchi di affondarmi il suo vento soffia sempre avanti.*

*A Fede, compagno di viaggio leale e fidato, sempre presente nelle difficoltà. Orgoglioso, testardo, deciso e fiero. Vorrei essere stato un fratello migliore.*

*A Gabri, compagno di viaggio severo e buono, sempre pieno di consigli, sempre il migliore in tutto.*

*Voi siete le stelle nella notte della mia vita.*

*A Massimo, professionista, amico, angelo che il Signore ha mandato per assistere il mio viaggio. Nonostante l'imperversare della tempesta tu sei stato la mia darsena, hai riparato la falla ed evitato che affondassi... Grazie.*

*Alla Prof.ssa Sonia Trombino, docente preparata, persona buona, marea favorevole e onesta che dopo molti periodi di flussi contrari è riuscita a indirizzare la nave sulla giusta rotta.*

*A Victor, la cui vita appartiene agli altri. Simbolo della cristianità vera. Sei uno di quelli che non voglio deludere.*

*Al prof. Nicoletta, geniale, buono, discreto e forte. Faro che illumina e guida. Che permette di evitare gli scogli ma soprattutto che ha permesso alla nave di rientrare in porto... Il professore più chiaro che abbia mai incontrato.*

*A Giuseppe, il prof. Cirillo. Inarrestabile corrente. Il supereroe. Per esserci stato... per quello che sei. Limpido e schietto. Sincero. Vero.*

*Alla prof.ssa Iemma, la cui bontà forse non ho compreso appieno nemmeno io. Per tutte le mattine, per tutti i caffè. Per la pazienza e per la gentilezza.*

*Alla prof.ssa Curcio, una di quelle persone che capisci subito essere speciale. Di quelle che, quando entrano nella tua vita, capisci di essere fortunato.*

*Alle colleghe, grazie per l'acidità e la basicità (la dolcezza), grazie per aver colorato le mie giornate ad una  $\lambda = 665 \text{ nm}$  con una energia di  $1.000 \text{ J/g}$  ed un calore di  $10.000 \text{ K}$ . Per aver disperso i malumori sonicandoli e per aver nuotato con me nel mare del laboratorio, un mare che dopo tanto tempo mi ha permesso di ricominciare a vivere.*

*Vi voglio bene e porterò tutti voi nel cuore.*



*Ego a parte, voglio che viviate la parte migliore di me.*

*Posso essere migliore... sarò migliore.*

*“Non c’è nulla di nobile nell’essere superiore a qualcun altro.*

*La vera nobiltà consiste nell’essere superiore a chi che eravamo ieri.”*

Ernest Hemingway

