POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale

in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Produzione di nanoparticelle polimeriche per il rilascio controllato di Dicamba

Relatore

Prof. Roberto Pisano

Candidato

Dario Giovanni Casà

OTTOBRE 2019

Indice

1 Introduzione ... 1

1.1 Nano-carrier ... 1

1.2 Gli idrogeli ... 2

1.3 Tecniche di preparazione di nanoparticelle polimeriche ... 4

1.3.1 Metodi di preparazione delle nanoparticelle dalla dispersione di polimeri preformati ... 4

1.3.2 Gelificazione ionica o coacervazione di polimeri idrofili ... 5

1.3.3 Metodi di preparazione di nanoparticelle da polimerizzazione di monomeri ... 5

1.4 Formazione di nanoparticelle per miniemulsione e miniemulsione inversa ... 9

1.4.1 Formazione nanoparticelle per miniemulsione ... 10

1.4.2 Formazione di nanoparticelle per miniemulsione inversa ... 11

1.5 Descrizione e meccanismo di formazione di nano-idrogeli ... 12

1.5.1 Nano-idrogeli ... 13

1.6 Rilascio controllato dei principi attivi dai nano-idrogeli ... 14

1.6.1 Rilascio per swelling ... 14

1.6.2 Rilascio a controllo chimico ... 16

1.7 Obiettivo della tesi: rilascio controllato di un erbicida (Dicamba) ... 16

1.8 Organizzazione del manoscritto di tesi ... 17

2 Materiali e metodi ... 19

2.1 Reagenti ... 19

2.2 Strumentazione ... 20

2.3 Metodo per la produzione del nano-idrogelo ... 21

2.3.1 Metodo per la dissoluzione del Dicamba e preparazione della seconda soluzione acquosa ... 22

2.3.2 Meccanismo di formazione di nano-idrogeli partendo da Alginato di Sodio e Cloruro di Calcio e struttura dell'idrogelo ... 23

2.4 Caratterizzazione dimensionale delle nanoparticelle ... 24

2.5 Separazione degli idrogeli per centrifugazione ... 25

2.6 Determinazione delle curve di rilascio di Dicamba ... 26

2.7 Programmazione delle prove sperimentali ... 27

3 Risultati ... 29

3.1 Studio preliminare sul processo di produzione dell'emulsione inversa ... 29

3.1.1 Influenza della velocità di rotazione dell'Ultra Turrax sulla miniemulsione ... 33

3.1.2 Stabilità della miniemulsione ... 34

3.2 Sintesi del carrier ... 35

3.2.1 Effetto della concentrazione di alginato di sodio ... 36

3.2.2 Effetto della velocità di rotazione 37
3.2.3 Stabilità nel tempo del nano-idrogelo 38
3.2.4 Prova di separazione dalla fase continua tramite centrifugazione 39
3.3 Incapsulamento del Dicamba 40
3.3.1 Studio della solubilità del Dicamba 40
3.3.2 Produzione del nano-idrogelo contenente il Dicamba 41
3.3.3 Analisi spettroscopica preliminare 43
3.4 Prove di rilascio 45
3.4.1 Prove di rilascio idrogeli in assenza di Dicamba 45
3.4.2 Rilascio del Dicamba dall'idrogelo 46
3.4.3 Confronto con il rilascio da miniemulsione 52
4 Conclusioni 53
Bibliografia 58
Ringraziamenti 60

Indice delle figure

Figura 1.1 *Morfologia di una nanosfera e una nanocapsula. Figura presa e modificata da [2].* 1
Figura 1.2 *Esempio di struttura di un idrogelo.* 2
Figura 1.3 *Schema della polimerizzazione per miniemulsione.* 7
Figura 1.4 *Differenza tra polimerizzazione per emulsione, mini-emulsione e micro-emulsione. Figura presa da [9] e modificata.* 8
Figura 1.5 *Schema del processo di polimerizzazione interfacciale. Figura presa da [13] con modifiche.* 9
Figura 1.6 *Rappresentazione di miniemulsione e miniemulsione inversa. Figura presa e modificata da [17].* 11
Figura 1.7 *Polimerizzazione in miniemulsione inversa. Figura presa e modificata da [17].* 12
Figura 1.8 *Schema della variazione del mesh size data dall'inglobamento d'acqua. Immagine presa e modificata da [23]* 14
Figura 2.1 *Struttura monomero di Alginato di Sodio* 19
Figura 2.2 *Struttura del Dicamba* 19
Figura 2.3 *Struttura Pluronic PE 6100* 20
Figura 2.4 *Rappresentazione della struttura dell'alginato in cui viene mostrata la differenza tra il monomero G e il monomero M.* 23
Figura 2.5 *Egg box model* 24
Figura 3.1 *Distribuzione dimensionale dell'emulsione, campione E_01* 30
Figura 3.2 *Distribuzione dimensionale dei campioni E_01, E_02 ed E_03 ottenuti a differenti concentrazioni di Pluronic nell'olio.* 31
Figura 3.3 *Distribuzione dimensionale campione E_04* 32
Figura 3.4 *Dispersione dimensionale campione E_03, E_05, E_06 ottenuti a diverse velocità di rotazione.* 34
Figura 3.5 *Andamento della dimensione della miniemulsione nel tempo.* 35
Figura 3.6 *Distribuzione dimensionale delle nanoparticelle di idrogeli del campione I_01.* 36
Figura 3.7 *Distribuzione dimensionale idrogeli prodotti a differenti velocità di rotazione* 37
Figura 3.8 *Andamento della dimensione dell'idrogelo nel tempo.* 38
Figura 3.9 *Distribuzione dimensionale del campione I_05 nel tempo.* 39
Figura 3.10 *Distribuzione dimensionale campione I_06 pre e post centrifugazione.* 40
Figura 3.11 *Curva di assorbanza Dicamba* 43
Figura 3.12 *Curva di assorbanza alginato di sodio* 44
Figura 3.13 *Curva di assorbanza dell'idrossido di sodio* 45
Figura 3.14 *Retta di taratura a 280,5 nm per il Dicamba* 47
Figura 3.15 *Curva di rilascio per il Dicamba dal nano-idrogelo ottenuto utilizzando i rapporti della formulazione D_05, con Ultra Turrax a 10000 rpm per 15 minuti.* 48
Figura 3.16 *Regressione lineare del rilascio con la cinetica di ordine zero* 49
Figura 3.17 *Regressione lineare del rilascio con cinetica di primo ordine* 50
Figura 3.18 *Regressione lineare del rilascio con il modello di Higuchi* 50
Figura 3.19 *Regressione lineare del rilascio con il modello di Hixson-Crowell* 51
Figura 3.20 *Regressione lineare del rilascio con il modello di Baker-Lonsdale* 51
Figura 3.21 *Curva di rilascio percentuale di Dicamba nel tempo da miniemulsione* 52

Indice delle tabelle

Tabella 1.1 *Principali interazioni che stanno alla base della formazione di idrogeli chimici e fisici.* 13
Tabella 2.1 *Parametri operative adoperati per la misurazione al DLS* 25
Tabella 2.2 *Parametri impiegati per la produzione delle diverse miniemulsioni.* 27
Tabella 2.3 *Parametri impiegati per la produzione dei diversi campioni di nano-idrogelo senza Dicamba.* 27
Tabella 2.4 *Parametri comuni, applicati per tutte le formulazioni di nano-idrogelo contenenti Dicamba.* 28
Tabella 2.5 *Parametri impiegati per la produzione dei diversi campioni di nano-idrogelo contenenti Dicamba* 28
Tabella 3.1 *Diametro e polidispersità ottenuti a diverse quantità di tensioattivo* 32
Tabella 3.2 *Diametro e polidispersità delle minismuelsioni ottenute a diverse velocità di rotazione* 33
Tabella 3.3 *Studio della stabilità della miniemulsione* 34
Tabella 3.4 *(a sinistra) e* ***Tabella 3.5*** *(a destra) rappresentano rispettivamente I valori di assorbanza del Dicamba e dell'alginato di sodio per le varie lunghezze d'onda.* 44
Tabella 3.6 *Misura dell'assorbanza nel tempo della prova di dialisi per l'idrogel senza Dicamba* 46
Tabella 3.7 *Modelli matematici per l'approssimazione della curva di rilascio* 49

1 Introduzione

1.1 Nano-carrier

I nano-idrogeli sono definiti come solidi dispersi o come particelle solide con una grandezza che sta nel range dei 10-1000 [nm]. Tra le varie applicazioni, le nanoparticelle possono essere utilizzate come nanovettori per principi attivi, che possono essere incorporati in esse tramite tecniche differenti allo scopo di garantirne la stabilizzazione, di convertirle in polvere, ma soprattutto per modificarne le proprietà di rilascio per qualsiasi tipo di somministrazione. Questi sistemi sono sfruttati per il trasporto del principio attivo in modo controllato dal sito di somministrazione al target, cercando di superare le numerose barriere fisiologiche. I campi di applicazione dei nano-vettori sono innumerevoli e in continua espansione e tra questi abbiamo l'elettronica, il fotovoltaico, materiali conduttori, sensori, medicina, biotecnologia, agricoltura e controllo degli inquinanti. [1] [2]

Il principio attivo può essere disciolto, intrappolato, incapsulato o attaccato alla matrice della particella, ottenendo, in base al metodo usato, nanosfere o nanocapsule. Si parla di nanocapsule quando vi è un core liquido all'interno della nanoparticella in cui il principio attivo e racchiuso, mentre le nanosfere sono strutture piene in cui il principio attivo è disperso e a diretto contatto con il carrier, come si può vedere in Figura 1.1. [2]

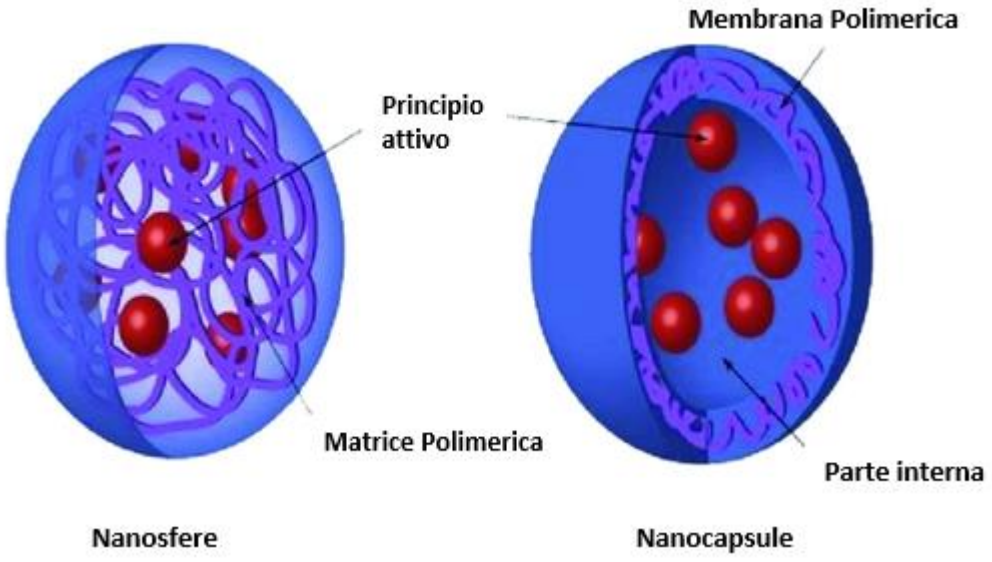

Figura 1.1 *Morfologia di una nanosfera e una nanocapsula. Figura presa e modificata da [2].*

I principali vantaggi nell'usare nano-carrier sono:

- Se ne possono manipolare dimensione e forma, andando così a variare il tempo di rilascio del principio attivo racchiuso;
- In base ai materiali scelti per la formazione dei nano-carrier, si può controllare il rilascio e le caratteristiche di degradazione delle particelle;
- Le dimensioni nanometriche permettono una permeazione attraverso diversi tipi di membrane fisiologiche.

In questo lavoro di tesi si utilizzeranno i nano-carrier per la somministrazione di un pesticida. In letteratura ci sono già diversi studi per l'applicazione dei nano-carrier in campo medico, mentre si hanno molte meno informazioni sul rilascio controllato di pesticidi. I nano-carrier contenenti pesticidi possono essere molto più efficaci contro le pesti rispetto ai metodi tradizionali. Le dosi di principio attivo presenti all'interno dei nano-carrier sono molto minori, quindi si hanno rischi più bassi di andare incontro ad effetti negativi sugli uomini e sugli altri organismi non oggetto di trattamento. In seguito al suo incapsulamento nel nano-carrier, si riesce a rendere il pesticida più eco-friendly; infatti uno dei principali problemi dei pesticidi è la contaminazione di aria, di acque sotterranee e superficiali. In più, grazie al rilascio controllato e all'uso di una minore quantità di pesticida, si hanno anche perdite minori del principio attivo dovute a percolazione, volatilizzazione, degradazione (processi di degradazione dei pesticidi sono: biodegradazione, fotodegradazione, idrolisi) e ciò rende queste formulazioni non solo meno tossiche ma anche più economiche delle formulazioni tradizionali e in grado di rimanere più a lungo a contatto con l'organismo mirato. [3]

Questi miglioramenti puntano quindi a rendere più efficace l'uso di pesticidi aumentando così la percentuale di principio attivo che raggiunge l'organismo mirato. Con gli attuali metodi, a causa delle perdite citate precedentemente, questa percentuale è solo dello 0,1%. Da ciò si può facilmente intendere che l'uso del principio attivo è molto superiore rispetto al necessario e ciò ovviamente crea problemi di inquinamento.

1.2 Gli idrogeli

In questo progetto di tesi i nano-carrier usati sono dei nano-idrogeli. Gli idrogeli possono essere definiti come un reticolo polimerico tridimensionale e idrofilo capace di assorbire ingenti quantità di acqua o fluidi biologici mantenendo intatta la propria struttura, schematizzata in Figura 1.2. Grazie a questa proprietà, in un mezzo acquoso non si dissolvono ma rigonfiano. Ciò è dovuto alla presenza di gruppi idrofili, come: -OH, -COOH, $-CONH_2$ e SO_3H. I legami presenti nel reticolo polimerico possono essere sia legami fisici (legami idrogeno, di Van der Waals, interazioni idrofobiche, ecc…) sia legami chimici (legami covalenti).

***Figura 1.2** Esempio di struttura di un idrogelo.*

I campi in cui gli idrogeli si applicano sono innumerevoli. Una delle maggiori applicazioni degli idrogeli è il campo biomedico, poiché riescono a copiare i comportamenti degli organi umani in risposta a cambiamenti di pH, temperatura, enzimi e campi elettrici. Trovano quindi applicazioni in impianti medici, protesi, dispositivi diagnostici e varie altre. Ad esempio, Jeong e Gutowska hanno osservato che idrogeli costituiti da PEG-PLGA, grazie al riconoscimento molecolare, possono essere usati per trattamenti e imaging del cancro [4], oppure, idrogeli costituiti da metilcellulosa-PEG possono essere applicati per prevenire irritazioni della pelle. Un altro possibile campo sarebbe quello farmaceutico, gli idrogeli di PVA, ad esempio, vengono utilizzati per inglobare al loro interno insulina e grazie ad essi si riesce ad ottenere un rilascio più controllato e specifico agli organi oggetti di trattamento. Un'altra applicazione è quella nell'industria agricola in cui si usano gli idrogeli per controllare meglio il rilascio di fertilizzanti o erbicidi, evitandone perdite dovute alla volatilità dei prodotti usati, a piogge eccessive, a terreni eccessivamente porosi e altri fattori. Questo è un approccio nuovo su cui si stanno ancora svolgendo diversi studi. La maggior parte degli idrogeli usati per questo tipo di applicazione sono costituiti da polisaccaridi come la pectina, carbossimetil cellulosa e il chitosano. Queste sono solo alcune delle possibili applicazioni degli idrogeli. Infatti, gli idrogeli vengono anche usati nell'industria di imballaggio dei cibi, nell'industria cosmetica, tecnologie di separazione e come biosensori. [5]

Si possono caratterizzare gli idrogeli in base a: metodi di preparazione, proprietà meccaniche e strutturali, natura dei gruppi laterali e risposta agli stimoli ambientali. [6] [7] È di estrema importanza il tipo di monomero che si utilizza per la sintesi del network polimerico che ne influenza in seguito l'applicabilità e le caratteristiche.

Per la formazione delle nanoparticelle possiamo usare sia polimeri di origine naturale che di origine sintetica. Alcuni polimeri comunemente usati di origine naturale sono:

- Chitosano
- Gelatina
- Alginato di Sodio
- Albumina

Esempi di polimeri di origine sintetica sono:

- Polilactidi (PLA)
- Poliglicolidi (PGA)
- Polianidridi
- Policianoacrilati
- Poli(N-vinil pirrolidone)
- Poli acrilammide

Per quanto riguarda i processi di formazione dei nano-idrogeli, possono essere applicate le stesse tecniche usate per produrre nanoparticelle polimeriche.

1.3 Tecniche di preparazione di nanoparticelle polimeriche

In questo paragrafo verranno illustrati i vari metodi di produzione delle nano-particelle. Il metodo di preparazione è di fondamentale importanza e dipende dal tipo di polimero utilizzato; esso influenza le proprietà finali del nano-carrier e in particolare ne influenza la dimensione finale nonché la struttura interna che, a sua volta, si ripercuote sulla velocità di rilascio.

Possiamo dividere le tecniche di preparazione delle nanoparticelle in tre categorie:

- preparazione dalla **dispersione di polimeri preformati**;
- preparazione dalla **polimerizzazione di monomeri**;
- Gelificazione ionica o coacervazione di polimeri idrofili.

1.3.1 Metodi di preparazione delle nanoparticelle dalla dispersione di polimeri preformati

Evaporazione solventi

L'evaporazione di solventi fu il primo metodo di formazione di nanoparticelle a partire da un polimero preesistente. Il metodo prevede la preparazione di una soluzione di polimero in un solvente volatile e poi la sua emulsione, in una fase non solubile per il polimero e immiscibile con il primo solvente, attraverso agitazione meccanica, l'uso di ultrasuoni o abbassamento della pressione. Una volta stabilizzata l'emulsione continua il processo di agitazione per far evaporare il solvente volatile, in quest'ultimo passaggio avviene la formazione delle nanoparticelle. Per la formazione dell'emulsione si possono utilizzare diverse configurazioni: l'emulsione singola (olio in acqua) o l'emulsione doppia (acqua in olio in acqua), l'emulsione acqua in olio in acqua, etc. In generale i solventi usati in questo metodo sono il cloroformio, diclorometano e l'etilene acetato, mentre i principali polimeri usati in questo metodo sono l'etilcellulosa, il poli (metil) acrilato, poli L-lactide-co-glicolide (PLGA). Questa tecnica permette di ottenere particelle con una grandezza di 60-200 [nm]. [8]

Nanoprecipitazione

La nanoprecipitazione, o metodo di spostamento del solvente, è una tecnica che si basa sulla precipitazione di un polimero preformato da una soluzione organica (es. etanolo, acetone, esano) e diffusione del solvente organico in un medium acquoso, con o senza la presenza di tensioattivi. La rapida diffusione della fase solvente nella fase non solvente risulta in una diminuzione delle tensioni interfacciali tra le due fasi e un conseguente aumento dell'area superficiale che porta alla formazione di piccole goccioline di solventi organici. È un metodo comunemente usato sia per la formazione di nanoparticelle che di nanocapsule. [2] [9]

Emulsificazione / diffusione solvente (ESD)

È una versione alternativa del metodo di evaporazione solventi. Il polimero si dissolve in un solvente parzialmente solubile in acqua (es. propilene carbonato). Per promuovere la precipitazione del polimero e la conseguente formazione di nanoparticelle, è necessario promuovere la diffusione del solvente, ovvero della fase dispersa, diluendo con un eccesso d'acqua. In seguito, il polimero nella fase solvente saturata d'acqua viene emulsionato in

una soluzione acquosa che contiene stabilizzanti, e porta la diffusione del solvente alla fase esterna e la formazione di nanosfere e nanocapsule. Il solvente viene eliminato attraverso evaporazione o filtrazione. [2]

Salting out

Il polimero è inizialmente dissolto in un solvente (es. acetone), che viene emulsionato in gel acquoso in cui sono presenti l'agente salting-out (elettroliti, come cloruro di magnesio, calcio cloruro o anche non elettroliti come saccarosio) e un colloide. L'emulsione olio/acqua viene diluita con un volume sufficiente d'acqua per aumentare la diffusione dell'olio nella soluzione acquosa creando nanosfere. Alla fine, viene eliminato sia l'agente salting-out che l'olio attraverso un processo di filtrazione in controcorrente. [2] [10]

Dialisi

Il polimero, disciolto in un solvente organico, viene posto in un tubo da dialisi con un adeguato molecular weight cut-off. Lo spostamento del solvente attraverso la membrana è seguito da una progressiva aggregazione dei polimeri a causa della perdita di solubilità e la formazione di sospensioni omogenee di nanoparticelle. [9]

Tecnologia dei fluidi supercritici

I fluidi supercritici ci permettono di produrre nanoparticelle polimeriche ad alta purezza e senza tracce di solventi organici, rendendo il processo più sicuro da un punto di vista ambientale. Sono stati sviluppati due metodi per la formazione di nanoparticelle coi fluidi supercritici:

- Espansione rapida di soluzioni supercritiche (RESS);
- Espansione rapida di soluzioni supercritiche in solventi liquidi (RESOLV). [9]

1.3.2 Gelificazione ionica o coacervazione di polimeri idrofili

In breve, in base alla solubilità del principio attivo e del polimero, vengono disciolti in un acido debole o acqua e la soluzione risultante viene aggiunta ad una soluzione contenente contro ioni e gocce di stabilizzante e messa sotto costante agitazione. Le particelle di forma sferica si formano a causa della complessazione di specie caricate in modo opposto, che si traduce in gelificazione e precipitazione. La dimensione delle particelle è ridotta alla gamma nanometrica attraverso la sonicazione della soluzione risultante. [9]

1.3.3 Metodi di preparazione di nanoparticelle da polimerizzazione di monomeri

Le tecniche discusse in precedenza riguardano la produzione di nanoparticelle polimeriche da polimeri preformati e non vi sono processi di polimerizzazione. Per ottenere le proprietà desiderate per un'applicazione particolare, deve essere progettato un polimero adatto. Risulta quindi necessario formare la nanoparticella attraverso la polimerizzazione di un monomero. [9]

Polimerizzazione per emulsione

La polimerizzazione per emulsione è il metodo più comune di produzione di nano-polimeri. La polimerizzazione per emulsione include diversi processi ottenuti con diverse tecniche quali: (1) macropolimerizzazione o emulsione convenzionale polimerizzata, (2) polimerizzazione per mini-emulsione, (3) polimerizzazione per micro-emulsione, (4) polimerizzazione per dispersione, (5) polimerizzazione per sospensione.

1) **Macropolimerizzazione:** per questo metodo vengono solitamente usati: acqua, un monomero con scarsa solubilità in acqua, un iniziatore solubile in acqua e un tensioattivo. Si preparano delle emulsioni cineticamente stabili attraverso l'accurata scelta di temperatura, concentrazione del monomero, concentrazione del tensioattivo e natura dell'emulsificante. Inizialmente si hanno grandi gocce di monomero (1-10 [μm]) stabilizzate dalle molecole di surfattante; in soluzione sono presenti contemporaneamente micelle vuote o con il monomero dentro. La polimerizzazione avviene principalmente all'interno delle micelle. Vi è la formazione di oligo-radicali dalla dissociazione dell'iniziatore solubile in acqua che penetra le micelle dove vi è presente il monomero e inizia la polimerizzazione. Le particelle di monomero passano dalla soluzione a dentro le micelle e continua così la crescita del polimero. In questa formulazione la grandezza finale della nano particella polimerica non corrisponde alla grandezza iniziale dell'emulsione, ma bensì dipende dai parametri cinetici citati all'inizio. [9] [11]

   Se vengono usati tensioattivi, questi alla fine del processo devono essere eliminati e ciò porta costi energetici maggiori e anche maggiori problemi ambientali. [9] Per questo motivo sono stati sviluppati metodi di polimerizzazione per emulsione che non necessitano di tensioattivi. In questo progetto di tesi però non saranno usati tali metodi, pertanto non verranno approfonditi.

   La **polimerizzazione per emulsione inversa** è un tipo particolare di macropolimerizzazione. Si fa partendo da una soluzione acquosa e un monomero solubile in acqua. Il monomero viene disperso in una fase continua organica usando un tensioattivo, in modo da stabilizzare l'emulsione ed evitare che le goccioline di acqua vadano a coalescere tra loro. Questa tecnica, essendo applicata nel progetto, verrà meglio approfondita in seguito.

2) **Polimerizzazione per miniemulsione:** in questo metodo la polimerizzazione prende luogo all'interno di ogni nano-goccia di monomero stabilizzata, ottenendo particelle che hanno un diametro tra i 30 e i 500 nm. In seguito alla prima procedura di mini emulsificazione non vi è più l'equilibrio delle pressioni nelle gocce poiché solitamente la pressione osmotica è minore della pressione di Laplace. Per raggiungere nuovamente l'equilibrio le gocce tendono a coalescere tra loro, attraverso collisione o maturazione di Ostwald, aumentando di volume.

Questa crescita è solitamente più veloce del processo di polimerizzazione. Per impedire la crescita delle gocce si usano molecole ultraidrofobe o ultraidrofile (in base a se si ha una miniemulsione olio in acqua o acqua in olio) che non sono in grado di passare da una goccia all'altra e rimangono intrappolate in una singola goccia. Si ottiene così una pressione osmotica nella goccia sufficiente a contrastare la pressione di Laplace rendendo la goccia stabile ed evitando il processo di maturazione di Ostwald. [11] Nella Figura 1.3 troviamo schematizzato il precedente processo.

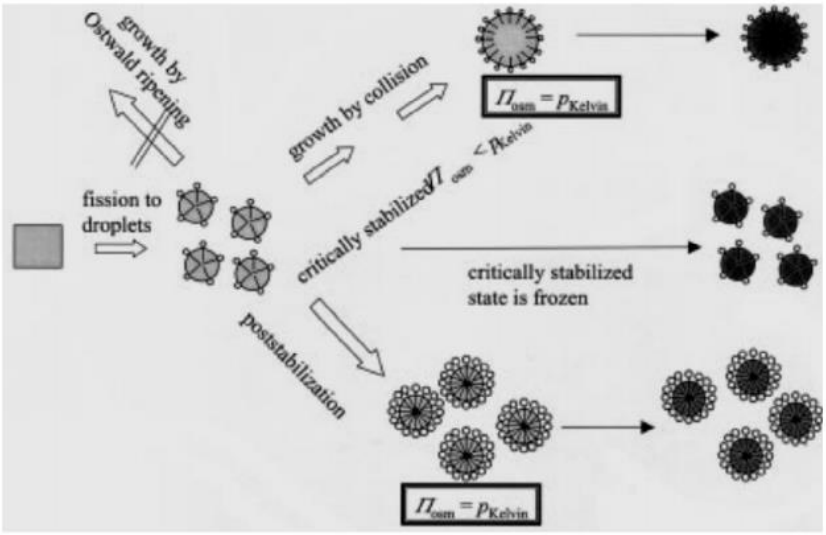

Figura 1.3 *Schema della polimerizzazione per miniemulsione.*

3) La **polimerizzazione per microemulsione** avviene quando la concentrazione del tensioattivo è sopra un determinato valore, dando origine a micro-emulsioni stabili, a differenza delle mini-emulsioni che si stabilizzano difficilmente e hanno bisogno di alti sforzi di taglio per raggiungere lo stato stazionario. La maggiore stabilità è data dalla bassa tensione superficiale nelle micro-emulsioni, dovuta proprio all'alto contenuto di tensioattivo usato per preparare questi sistemi, il quale va a ricoprire totalmente la superficie della particella. Con questa tecnica però non si ottengono polimeri in tutte le micelle formate; infatti, alla fine del processo molte delle micelle rimangono vuote. Le particelle così formate hanno in genere una dimensione tra i 10 e i 50 nm. [11] [12] Troviamo in Figura 1.4 le rappresentazioni della polimerizzazione per emulsione, per mini-emulsione e micro-emulsione.

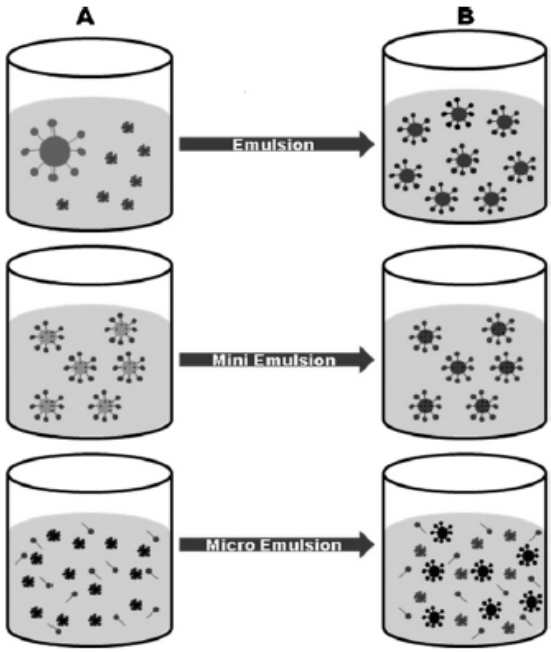

Figura 1.4 *Differenza tra polimerizzazione per emulsione, mini-emulsione e micro-emulsione. Figura presa da [9] e modificata.*

4) Nella **polimerizzazione per dispersione** il monomero, l'iniziatore e lo stabilizzatore sono tutti dissolti nel solvente. La polimerizzazione inizia in una fase continua e il polimero, che non è solubile nel solvente, precipita e appaiono dei nuclei instabili. Questi nuclei sono stabilizzati dallo stabilizzatore presente nel sistema. Quando tutto lo stabilizzatore presente nella soluzione è impiegato nello stabilizzare nuclei già esistenti la nucleazione cessa. La grandezza di queste particelle è maggiore di quella ottenuta con la macro-emulsione, ma minore di quella ottenuta con la polimerizzazione per sospensione.

5) **Polimerizzazione per sospensione**: Nella polimerizzazione per sospensione la grandezza delle gocce di monomero supera i 10 μm. Si applica un'agitazione meccanica per disperdere la fase contenente un iniziatore e uno o più monomeri in una fase liquida continua (es. acqua). In questo modo il polimero è prodotto all'interno delle gocce.

Polimerizzazione interfacciale

Per questo metodo si ha una fase dispersa in cui è presente l'iniziatore della reazione di polimerizzazione e una fase continua in cui è presente il monomero; la reazione di polimerizzazione avviene quindi all'interfaccia delle due fasi. Le fasi di questo processo sono schematizzate in Figura 1.5. [2]

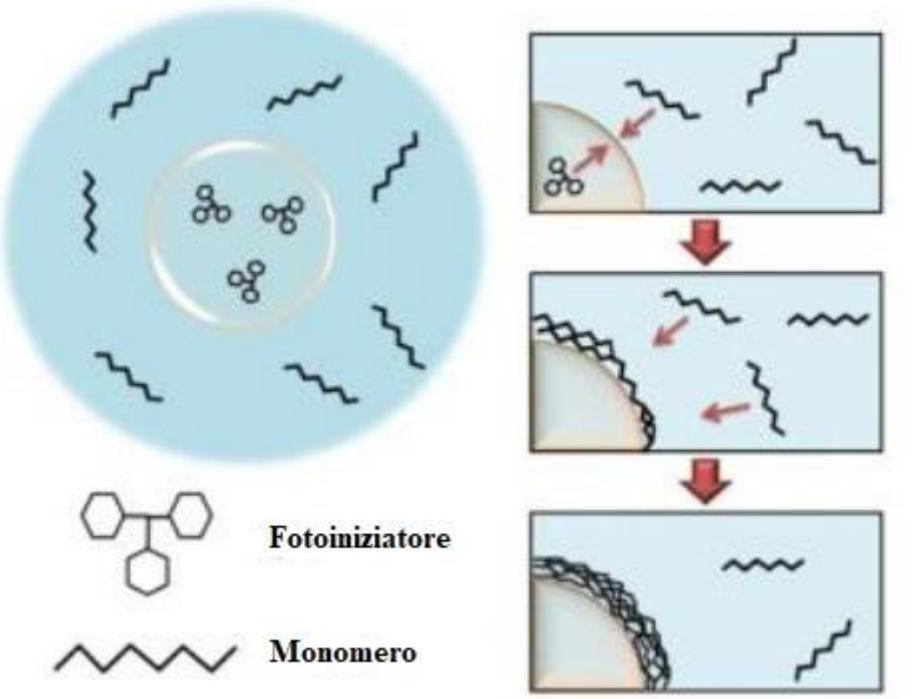

Figura 1.5 *Schema del processo di polimerizzazione interfacciale. Figura presa da [13] con modifiche.*

Si ottengono nanocapsule attraverso reazioni di policondensazione o poliaddizione che possono contenere olio o acqua in base al tipo di emulsione usata. La reazione avviene sempre all'interfaccia olio/acqua (o acqua/olio) dell'emulsione.

Il vantaggio principale di questo tipo di tecnica è l'alta efficienza di incapsulamento del principio attivo. [9]

1.4 Formazione di nanoparticelle per miniemulsione e miniemulsione inversa

In questo progetto di tesi la tecnica usata per la formazione dei nano-carrier è la miniemulsione inversa. Per averne una migliore comprensione, si spiega in maniera più approfondita la miniemulsione.

1.4.1 Formazione nanoparticelle per miniemulsione

Si chiama miniemulsione un sistema colloidale stabile, ottenuto applicando elevate forze di taglio e costituito da particelle di dimensioni solitamente comprese tra i 30-500 nm. Per ottenere una miniemulsione devono essere presenti due fasi non miscibili tra loro, una finemente dispersa nell'altra, in presenza di tensioattivi (si possono aggiungere anche altri additivi per migliorare la stabilità del sistema). In base a quale sia la fase dispersa e quale sia la fase continua si parla di emulsione diretta o emulsione inversa. In Figura 1.6 si riporta un esempio di miniemulsione diretta e inversa.

Come già scritto nel paragrafo precedente, per poter ottenere una miniemulsione si devono stabilizzare le nanoparticelle sia rispetto alla degradazione della sospensione colloidale indotta da diffusione molecolare (ovvero l'effetto precedentemente citato di maturazione di Ostwald), che rispetto alla coalescenza indotta da collisione. Nel 1962 è stato visto che si poteva contrastare il fenomeno della maturazione di Ostwald aggiungendo all'interno della fase dispersa un altro componente, nel caso di emulsione diretta un agente ultraidrofobo, che aumenta la pressione osmotica andando a contrastare la pressione di Laplace. Invece per ovviare al problema della coalescenza per collisione delle gocce si usano dei tensioattivi che formano delle micelle intorno alle gocce della fase dispersa respingendole così tra loro. In base al tipo di tensioattivo che si usa questa repulsione può essere di natura elettrostatica e/o sterica. La natura chimica e la quantità di tensioattivo influenzano radicalmente la formazione delle emulsioni e quindi anche la formazione successiva dei nano-carriers. A volte può anche essere usato un co-tensioattivo che si ripartisce tra fase dispersa e continua, diminuisce la tensione all'interfaccia e favorisce un migliore impaccamento del tensioattivo. [14] [15]

I tensioattivi vengono caratterizzati dal valore HLB (hydrophilic-lipophilic balance). Questo valore ci permette di scegliere con più facilità in base alla nanoparticella che stiamo creando e al suo utilizzo quale tensioattivo usare. L'HLB è una grandezza semi-empirica, viene valutata in base alla struttura del tensioattivo ed è usata per descrivere il suo carattere idrofilo/lipofilo. I valori di HLB vanno da 0 a 40, dove a 0 il tensioattivo è totalmente lipofilo e 40 è totalmente idrofilo; in base al suo HLB un tensioattivo può essere più indicato per emulsioni dirette o inverse. [15]

Il processo di emulsificazione è costituito da due passaggi: un aumento dell'area superficiale tra le due fasi dovuta alla rottura delle particelle, e una stabilizzazione, grazie al tensioattivo e agli eventuali additivi. Per generare una miniemulsione si devono applicare elevate forze di taglio e ciò può essere fatto o con agitatori meccanici (come in questo progetto di tesi, in cui si adopererà un agitatore, l'Ultra-Turrax) oppure con un bagno ultrasonico che crea miniemulsioni per cavitazione. Solitamente usando agitatori meccanici si ottengono particelle più grandi a causa delle forze viscose che disperdono molta energia trasformandola in calore. Nei primi istanti del processo di produzione della miniemulsione il sistema è molto polidisperso, ma andando avanti nel tempo la polidispersità del sistema diminuisce e si raggiunge un sistema pseudo-stazionario. Raggiunto questo stadio le dimensioni delle micelle non sono più funzione della quantità di forza meccanica applicata. [16]

Studi sperimentali confermano che le micelle nelle miniemulsioni raggiungono le dimensioni minime, ovvero sfruttano in maniera più efficace possibile il tensioattivo, nelle

condizioni sperimentali (temperatura, frazione volumetrica, quantità tensioattivo, ecc..) in cui vengono generate e alla fine del processo si trovano in uno stato meta-stabile e vengono definite “stabilizzate criticamente”. [14]

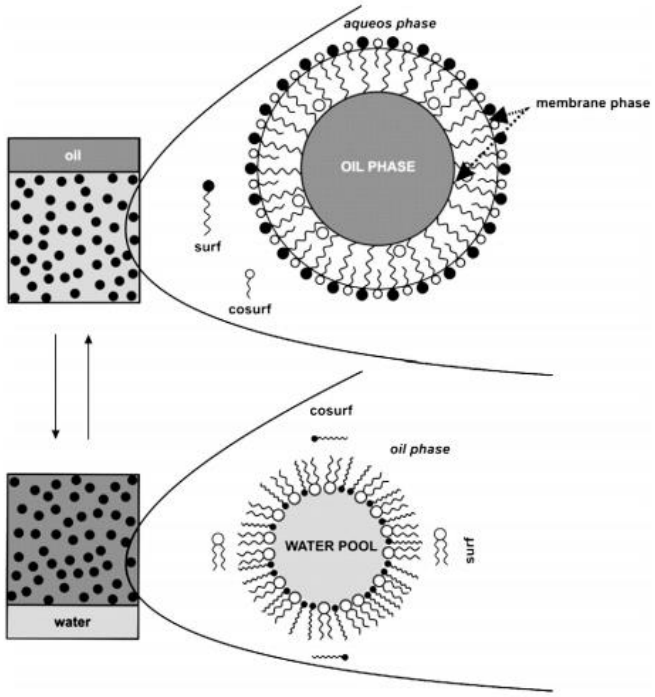

Figura 1.6 *Rappresentazione di miniemulsione e miniemulsione inversa. Figura presa e modificata da [17].*

Le gocce formate hanno la funzione di nanoreattori, dentro le quali avviene la reazione di polimerizzazione. Nel caso della miniemulsione diretta i monomeri usati, dovendo stare all’interno della goccia, saranno solubili in olio e non in acqua. Vi sono tre possibili meccanismi di nucleazione per le polimerizzazioni eterofasiche: nucleazione micellare, omogenea e di goccioline. Nella nucleazione micellare l’iniziatore entra in una micella in cui all’interno è presente il monomero e reagisce con quest’ultimo formando il polimero, ma questo tipo di nucleazioni per le miniemulsioni è improbabile. Più probabile invece la nucleazione omogenea, meccanismo che viene influenzato principalmente dalla solubilità del monomero impiegato e dalla concentrazione di iniziatore. Il meccanismo di nucleazione di goccioline è però quello principale; in questo meccanismo si ha il radicale che entra nella goccia e reagisce col monomero presente formando il polimero. [18]

1.4.2 Formazione di nanoparticelle per miniemulsione inversa

Le miniemulsioni inverse sono costituite da una fase continua oleosa e una fase dispersa acquosa. Anche in questo caso si può andare incontro a problemi di coalescenza per maturazione Ostwald o per collisione. Per risolvere il problema della maturazione di Ostwald si usano composti ionici, sali o zuccheri, tutti composti poco solubili in solventi organici che fungono quindi da agente osmotico. Per il problema della coalescenza per collisione anche in questo caso vengono usati i tensioattivi. Per le miniemulsioni inverse sono più indicati i tensioattivi con un HLB basso. [14] [17]

La principale differenza tra una miniemulsione diretta ed una inversa è che nella seconda, in seguito al processo di emulsificazione (sia esso meccanico o fatto con ultrasonicazione), le particelle sembrano raggiungere immediatamente una situazione di pressione effettiva nulla, se in presenza dell'agente osmotico. L'elevata stabilità del sistema infatti è dovuta all'agente osmotico e le dimensioni dipendono direttamente da quest'ultimo e, quindi, non si parla più di sistema criticamente stabile ma bensì di sistema effettivamente stabile.

Per quanto riguarda la polimerizzazione nell'emulsione inversa il monomero deve essere comunque presente nella fase dispersa, quindi non sarà più disciolto nell'olio ma si userà un monomero idrofilo disciolto nelle goccioline d'acqua. Una semplificazione della polimerizzazione in miniemulsione inversa è rappresentata in Figura 1.7.

I meccanismi alla base della polimerizzazione in miniemulsione inversa sono i seguenti:

- Generazione del radicale libero nella fase continua;
- Ingresso del radicale libero nella goccia d'acqua dando inizio al processo di polimerizzazione;
- Propagazione del polimero all'interno della goccia;
- Uscita (desorbimento) del radicale dalla particella;
- Terminazione o propagazione del radicale libero che rientra in un'altra goccia. [17]

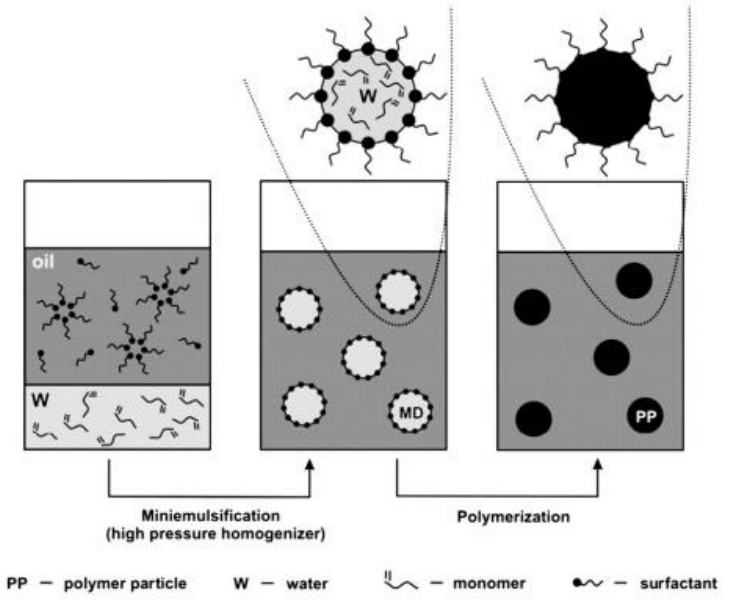

Figura 1.7 *Polimerizzazione in miniemulsione inversa. Figura presa e modificata da [17].*

1.5 Descrizione e meccanismo di formazione di nano-idrogeli

Si è parlato fino ad ora delle varie tecniche di formazione dei nanopolimeri e se ne sono anche visti, in maniera molto superficiale, i meccanismi di produzione. In questo progetto di tesi però non viene sintetizzato un nanopolimero ma bensì un nano-idrogelo. Come è stato già detto, le tecniche di formazione dei nanopolimeri e dei nano-idrogeli sono le stesse. Nella

sezione seguente viene analizzato meglio cos'è un nano-idrogelo e qual è il meccanismo di formazione del nano-idrogelo utilizzato in questo progetto di tesi per la sua sintesi.

1.5.1 Nano-idrogeli

Gli idrogeli sono dei bio-materiali applicabili in una miriade di campi diversi grazie alla loro biocompatibilità, biodegradabilità, idrofilicità e non tossicità. Gli idrogeli sono costituiti da polimeri legati tra loro tramite cross-linking e organizzati in sistemi tridimensionali capaci di accumulare grandi quantità d'acqua o di fluidi biologici tra le loro catene polimeriche formando così semisolidi acquosi o gel. Sono in grado di assorbire fino a migliaia di volte il loro peso secco in acqua. [19]

L'acqua presente negli idrogeli può essere associata ad esso in diversi modi in base a come essa viene intrappolata nella struttura tridimensionale dell'idrogeli. Appena l'idrogelo entra in contatto con l'acqua comincia a gonfiarsi a causa della formazione dei primi legami tra l'acqua e le parti idrofiliche dell'idrogelo. Gonfiandosi vengono esposti anche i gruppi idrofobici dell'idrogelo e anch'essi interagiscono con le molecole d'acqua. L'acqua intrappolata in questo modo viene chiamata *primary and secondary bound water* e una volta intrappolata viene rilasciata dal sistema solamente in condizioni estreme e viene considerata come parte integrante della struttura del nano-idrogelo. Oltre alla *bound water* abbiamo anche la *semibound water,* che si trova tra la bound water e l'acqua del bulk e la *interstitial water* intrappolata fisicamente negli interstizi della struttura tridimensionale. [20]

Gli idrogeli possono essere classificati in base al legame del cross-linking e possono essere divisi in gel fisici o reversibili e gel chimici o permanenti. In Tabella 1.1 si riportano le principali interazioni che possono manifestarsi nei due tipi di idrogelo.

Tabella 1.1 *Principali interazioni che stanno alla base della formazione di idrogeli chimici e fisici.*

Interazioni che danno origine ai gel fisici:	**Interazioni che danno origine ai gel chimici:**
▪ Interazioni idrofobiche ▪ Interazioni di cariche (o ioniche) ▪ Complessi polielettrolitici ▪ Miscele fisiche e legami-H ▪ Stereocomplessi ▪ Chimica sopramolecolare	▪ Interazioni tra piccole molecole ▪ Interazioni tra polimeri diversi ▪ Cross-linking fotoindotto ▪ Cross-linking enzimatico

[20]

Il nano-idrogelo considerato in questa tesi forma un cross-linking di tipo ionico. Il cross-linking di tipo ionico può presentarsi in due modi:

- Tra due polimeri che hanno cariche opposte;
- Tra due polimeri legati tra loro da una piccola molecola di carica opposta a quella dei polimeri.

L'idrogelo qui preso in considerazione sarà del secondo tipo. Questo tipo di cross-linking può essere innescato anche da variazioni di pH, che possono caricare positivamente o negativamente i gruppi funzionali dei polimeri. Questi idrogeli possono avere caratteristiche tali che gli permettono di degradarsi in specifiche condizioni di temperatura o sotto determinati stress meccanici. [20]

1.6 Rilascio controllato dei principi attivi dai nano-idrogeli

Uno dei principali motivi del perché gli idrogeli vengono sempre più usati è la possibilità di ottenere un rilascio controllato del principio attivo incapsulato al loro interno. Osserviamo quindi quali sono i meccanismi di rilascio e in breve anche i modelli matematici che li descrivono. Il principio attivo presente all'interno dell'idrogelo può essere rilasciato attraverso due meccanismi differenti: uno dovuto allo swelling e l'altro ad interazioni chimico-fisiche.

1.6.1 Rilascio per swelling

Come è già stato discusso, gli idrogeli sono in grado di assorbire quantità d'acqua superiori al 90% del loro peso. Assorbendo acqua, l'idrogelo inizia a gonfiarsi aumentando così il suo *mesh size,* ovvero la dimensione della maglia del reticolo dell'idrogelo. A titolo di esempio si veda il processo di swelling rappresentato in Figura 1.8. Ciò è dovuto all'accumulo dell'interstitial water, definita nella sezione §1.4.1. Il principio attivo viene rilasciato per diffusione attraverso l'interstitial water accumulata. Per questo meccanismo possiamo avere due fenomeni controllanti, la diffusione o lo swelling. [23]

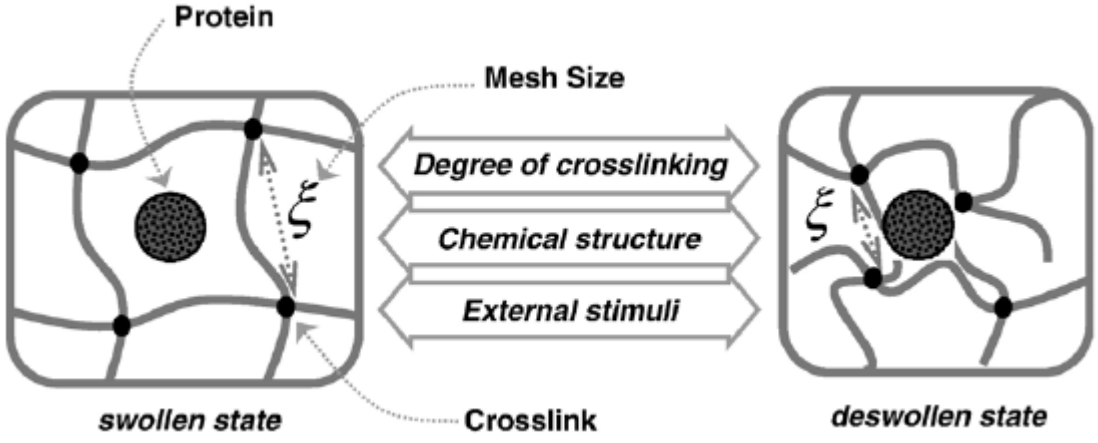

Figura 1.8 *Schema della variazione del mesh size data dall'inglobamento d'acqua. Immagine presa e modificata da [23]*

Innanzitutto, per assicurarci che il nostro principio attivo sia in grado di uscire dobbiamo calcolare il mesh size ξ e verificare se è maggiore delle dimensioni della molecola attiva. Il parametro ξ può essere così determinato:

$$\xi = v_{2,s}^{-\frac{1}{3}} (\bar{r}_o^2)^{1/2} = Q^{\frac{1}{3}} (\bar{r}_o^2)^{\frac{1}{2}} \tag{1.1}$$

dove $v_{2,s}$ descrive la quantità di liquido che può essere assorbita nell'idrogelo, Q è l'inverso di $v_{2,s}$, cioè il rapporto tra volume del gel gonfio su volume del polimero e $\bar{r}_o$ è la distanza media tra due cross-link adiacenti. [24]

Nel caso di un idrogelo, che ha una dimensione dei pori molto più grande della dimensione della molecola di principio attivo, il meccanismo controllante è in genere quello diffusivo. Questo processo può essere descritto dalla legge di Fick (1.2):

$$J_A = -D \frac{dC_A}{dx} \tag{1.2}$$

dove J_A è il flusso della molecola di principio attivo, D è il coefficiente di diffusione e C_A la sua concentrazione. In molti casi il coefficiente di diffusione viene considerato costante anche se generalmente è funzione della concentrazione e si devono utilizzare correlazioni apposite per avere il corretto calcolo del flusso del principio attivo. [23] La velocità di rilascio è spesso descritta usando delle correlazioni empiriche come, ad esempio, quella proposta da Peppas et al. [23]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \tag{1.3}$$

dove M_t e M_∞ sono rispettivamente il numero di molecole rilasciate al tempo t e la quantità finale di molecole rilasciate, k è un parametro che dipende dalla struttura/geometria del gel, n è un esponente che dipende dalla geometria e dal tipo di meccanismo di rilascio (diffusione *vs*. swelling).

E` stato poi proposto un secondo modello che descrive il rilascio come il risultato di due meccanismi in parallelo, la diffusione e lo swelling:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \tag{1.4}$$

dove k_1 , k_2 e m sono dei parametri sperimentali. [25]

Esistono anche modelli più complessi per descrivere il rilascio di una molecola attiva da un idrogelo, ma non saranno descritte perché esulano dallo scopo di questo lavoro di tesi.

1.6.2 Rilascio a controllo chimico

Il rilascio a controllo chimico può essere ulteriormente diviso in:

- Rilascio **controllato cineticamente** dovuto alla degradazione dell'idrogelo;
- Rilascio che tiene conto dell'**effetto combinato della diffusione e della degradazione** dell'idrogelo.

Per quanto riguardo il rilascio a **controllo solamente cinetico**, si possono distinguere due sistemi:

- Sistema a catena pendente, dove il principio attivo è legato covalentemente all'idrogelo e il rilascio è dovuto allo sfaldamento dei legami della struttura dell'idrogelo;
- Sistema ad erosione superficiale, dove il rilascio del principio attivo dipende dalla velocità dell'erosione superficiale. [23]

I modelli matematici che descrivono questi meccanismi sono molto complessi e non verranno qui trattati.

1.7 Obiettivo della tesi: rilascio controllato di un erbicida (Dicamba)

In questo progetto di tesi si studierà l'incapsulamento, e il suo successivo rilascio, di un erbicida: Dicamba. Esso è un erbicida ad ampio spettro registrato per la prima volta nel 1967. Intorno al 2016 il Dicamba fu dichiarato illegale dall'EPA perché pericoloso per la sua volatilità e tendenza a diffondersi dal sito di applicazione ai terreni adiacenti diventando potenzialmente pericolo anche per la popolazione limitrofa. Questo problema era essenzialmente legato al metodo di applicazione, che prevedeva la sua nebulizzazione nell'ambiente. Negli ultimi anni vari gruppi di ricerca, in accademia e in azienda, hanno iniziato a studiare metodi alternativi per la l'applicazione del Dicamba in modo che fosse localizzata al sito di interesse e quindi più sicura. L'uso di nano-carrier è una delle soluzioni proposte.

Il Dicamba viene usato principalmente per sterminare le piante parassite a foglia larga annuali e perenni. La sua principale applicazione commerciale è il controllo della crescita delle piante infestanti per le colture di cereali e le aree in erba, ma può essere anche usato per bonificare colture di legumi e cactus. L'effetto di quest'erbicida sulla pianta indesiderata è quello di aumentarne il tasso di crescita fino ad esaurire le riserve di nutrienti e causarne la morte. [26]

Per quanto riguarda i rischi di manipolazione, è moderatamente tossico per ingestione e leggermente tossico per inalazione o esposizione cutanea. Vari studi sugli animali hanno rilevato risposte differenti in base alla specie ed è considerato ad elevate concentrazioni un potenziale distruttore endocrino per i pesci, effetto da tenere in conto data la solubilità del

Dicamba in acqua e la possibilità che raggiunga la falda sotterranea grazie alla sua buona permeabilità nella maggior parte dei suoli.

1.8 Organizzazione del manoscritto di tesi

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la produzione di nanoparticelle polimeriche di idrogelo, per il rilascio di Dicamba su piante. A tal proposito, è stata impiegata la polimerizzazione in miniemulsione di acqua in olio mediante cross-linking ionico.

Nel Capitolo 1 si sono esaminati diversi metodi di produzione di nanoparticelle polimeriche, in particolari quelli applicati in questo studio. Si è discusso in seguito sulla struttura particolare dei nano-idrogeli, sui loro meccanismi di rilascio e sulle proprietà del principio attivo, Dicamba.

Nel Capitolo 2 verranno esposti in dettaglio i materiali e i metodi impiegati per la conduzione del lavoro sperimentale.

Nel Capitolo 3 saranno riportati e analizzati i risultati ottenuti durante le prove sperimentali. Sono state condotte prove sulla:

- Formazione della miniemulsione;
- Formazione dei nano-idrogeli;
- Incapsulamento del Dicamba da parte del carrier;
- Prove di separazione dell'idrogelo dalla soluzione e di rilascio.

Infine, nel Capitolo 4 si riportano le conclusioni raggiunte dallo studio dei risultati e alcuni suggerimenti per gli studi futuri.

2 Materiali e metodi

In questo capitolo vengono esposti i reagenti e gli strumenti usati e sono spiegate in maniera dettagliata le procedure adoperate in fase sperimentale. Inoltre, si descrivono gli strumenti adoperati per le misure dei risultati di interesse quali, il DLS (*dinamic light scattering*), usato per la caratterizzazione dimensionale delle miniemulsioni e dei nano-idrogeli e lo spettrofotometro UV/visibile, usato per misurare la quantità di principio attivo rilasciato nel tempo dall'idrogelo.

2.1 Reagenti

In questo studio il monomero che andrà a formare l'idrogelo è l'**alginato di sodio** $NaC_6H_7O_6$, mostrato in Figura 2.1. L'alginato di sodio è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

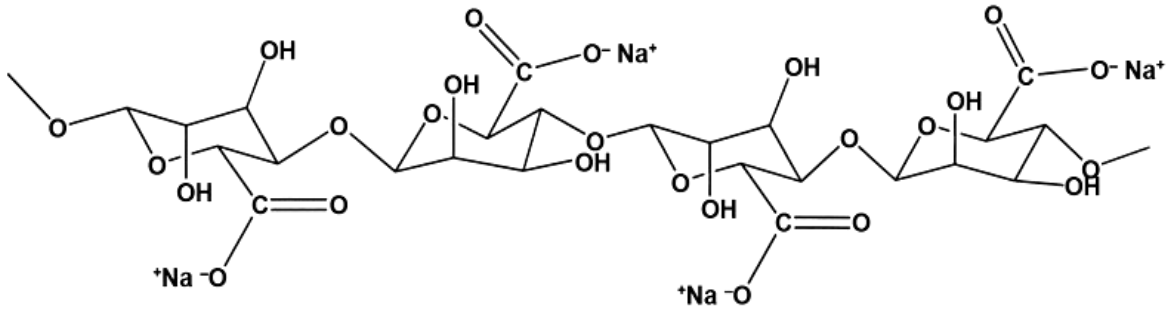

Figura 2.1 *Struttura monomero di Alginato di Sodio*

Per ottenere lo ione divalente Ca^{2+} necessario per la formazione del cross-linking ionico verrà disciolto in soluzione il **cloruro di calcio** $CaCl_2$ acquistato dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Presenta un peso molecolare di 110,99 g/mol.

Il principio attivo è il **Dicamba** o acido 3,6-dicloro-2-metossibenzoico, acquistato dalla Sigma -Aldrich (Milano, Italia), purezza ≥ 98,0%, peso molecolare 221,04 g/mol. La molecola è rappresentata in Figura 2.2.

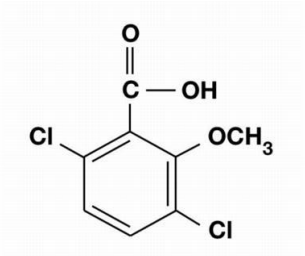

Figura 2.2 *Struttura del Dicamba*

L'acqua impiegata per la miniemulsione è **acqua deionizzata** ottenuta in laboratorio attraverso il filtro **ELGA Vision 250** acquistato dalla Veolia (Parigi, Francia).

La fase organica usata è l'**olio di semi di girasole**, scelto per la sua biocompatibilità e il basso costo, acquistato dall'Oleificio Zucchi (Cremona, Italia).

Il tensioattivo usato per la stabilizzazione della miniemulsione è il **Pluronic PE 6100** di tipo non ionico, acquistato da BASF (Cesano, Italia). La struttura è riportata in Figura 2.3.

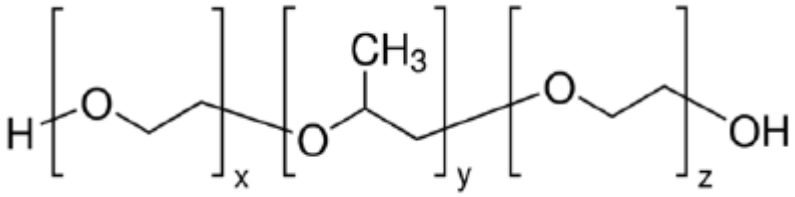

Figura 2.3 *Struttura Pluronic PE 6100*

L'**idrossido di sodio**, usato per solubilizzare il Dicamba ad alte concentrazioni, acquistato dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Conservato sotto forma di pellet bianchi che vengono disciolti in acqua, peso molecolare 40,00 g/mol.

2.2 Strumentazione

In seguito, un elenco della principale strumentazione usata nell'esecuzione delle prove sperimentali:

- **Bilance di precisione** (Mettler Toledo, Columbus, Svizzera);
- **Bagno ad ultrasuoni** (Sonorex, Bandelin, Berlino, Germania);
- **Ultra Turrax T25 digital** (IKA, Germania), un omogeneizzatore ad alta velocità, usato per creare miniemulsioni;
- **DLS Zetasiser** (Malvern Instruments, Malvern, Regno Unito);
- **Centrifuga Megafuge 8R** (Thermo Fisher Scientific, Rodano, Italia);
- **Spettrofotometro UV/Visibile SPECORD S 600** (Analytik Jena AG, Germania);
- **Misuratore di pH Orion Star A111** (Thermo Fisher Scientific, Rodano, Italia).

2.3 *Metodo per la produzione del nano-idrogelo*

In questo progetto la tecnica di produzione del nano-idrogelo è la polimerizzazione per miniemulsione inversa. Si usa una miniemulsione di acqua deionizzata come fase dispersa (viene usata l'acqua deionizzata per non far interferire gli ioni dell'acqua col la formazione del nano-idrogelo) in olio di semi di girasole come fase continua, usando come stabilizzante il tensioattivo Pluronic PE 6100. Il Pluronic è un tensioattivo non ionico che non crea schiuma, con un HLB di 3,0 (ovvero con parte lipofila molto maggiore della parte idrofila). È un copolimero costituito da un gruppo centrale di glicole polipropilenico a cui sono attaccati due gruppi di glicole polietilenico. A temperatura ambiente si presenta come un liquido viscoso e incolore.

Si è deciso di usare il Pluronic per il suo HLB ottimale per la formazione di un'emulsione inversa. Inoltre, l'effetto stabilizzante del Pluronic è dovuto solamente al suo ingombro sterico e non alla presenza di cariche ioniche, che potrebbero interferire con il processo di gelificazione dell'alginato.

Essendoci una differenza tra processo di produzione del nano-idrogelo contenente il principio attivo e quello "vuoto", verranno analizzati separatamente.

Preparazione dei nano-idrogeli in assenza di principio attivo

Nel seguito si riporta la procedura utilizzata per la produzione del nano-idrogelo in assenza di principio attivo.

- Preparare una soluzione costituita da 67,5 g di olio di semi di girasole (75 ml essendo la sua densità ~ 0,9 g/ml) e 0,29 g di Pluronic PE 6100. Questa soluzione costituirà la fase continua della miniemulsione.
- In seguito all'aggiunta del Pluronic nell'olio, la soluzione viene agitata per qualche minuto. Questo passaggio viene fatto solamente per disperdere meglio il tensioattivo nell'olio.
- Preparare una soluzione acquosa di alginato di sodio al'1% in peso. Questa è una delle due soluzioni usate per produrre la fase dispersa. Per dissolvere l'alginato, la soluzione è agitata meccanicamente per mezzo di un agitatore magnetico, impostando valori alti di velocità di rotazione, per almeno un'ora.
- Preparare una seconda soluzione acquosa costituita da cloruro di calcio 0,2 M. Il cloruro di calcio, a differenza dell'alginato, è facilmente solubile in acqua, ed è quindi sufficiente un'agitazione blanda con agitatore magnetico per circa 5 minuti. Una volta ottenute le tre soluzioni si procede con la produzione della miniemulsione. Si inserisce, quindi, la soluzione acquosa di alginato nella fase continua di olio e Pluronic in modo che la fase dispersa costituisca l'1% in volume della risultante soluzione (ovvero 0,757 ml). Le due soluzioni vengono messe sotto Turrax ad una velocità di 10.000 rpm per 10 minuti creando la miniemulsione. Trascorsi i 10 minuti, con il Turrax ancora funzionante, si aggiunge una quantità equivalente in volume della prima soluzione (cioè nuovamente 0,757 ml) della soluzione cloruro di calcio e si lascia operare il Turrax per altri 5 minuti. Durante questo ultimo passaggio avverrà la formazione del nano-idrogelo.

Preparazione dei nano-idrogeli contenenti Dicamba

Per ottenere l'idrogelo contenente il Dicamba le soluzioni di partenza di olio e Pluronic, acqua e alginato sono identiche. Il principio attivo, Dicamba, è aggiunto nella soluzione di acqua e cloruro di calcio. Durante le prove sperimentali si sono usate diverse concentrazioni di Dicamba. A questo scopo è stato necessario ricorrere a diversi metodi di preparazione che sono descritti nella sezione §2.3.1. Una volta ottenute le tre soluzioni, la procedura di lavorazione sotto Turrax è identica a quella dell'idrogelo non contenente il principio attivo. L' omogeneizzazione al Turrax deve essere fatta sotto cappa per questioni di sicurezza legate alla tossicità del Dicamba. Tutte le operazioni sono eseguite a temperatura ambiente.

2.3.1 Metodo per la dissoluzione del Dicamba e preparazione della seconda soluzione acquosa

La preparazione della soluzione di Dicamba e cloruro di calcio è più complessa di quella delle altre due soluzioni. Nei primi esperimenti in cui è presente il Dicamba, che verranno discussi nel capitolo 3, la concentrazione di Dicamba nella soluzione acquosa è bassa, circa 3 g/L. Per preparare questa soluzione si immette il Dicamba in un becker con acqua deionizzata e lo si copre con il parafilm. Per far solubilizzare il Dicamba, viene prima agitata la soluzione meccanicamente per qualche minuto usando un agitatore magnetico e in seguito, il becker viene posto per 20/30 minuti in un bagno ad ultrasuoni. Lo strumento applicato per la sonicazione è il **Bandelin Sonorex Super** (Bandelin, Berlino, Germania). Dopo aver totalmente solubilizzato il Dicamba, si aggiunge nello stesso becker il quantitativo di $CaCl_2$ necessario per ottenere una concentrazione 0,2 M e per solubilizzarlo si agita la soluzione a basse velocità per qualche minuto con un agitatore magnetico.

Per la preparazione di soluzioni a più alta concentrazione di Dicamba, si è dovuto utilizzare una procedura più complessa. La solubilità del Dicamba varia molto in base al pH della soluzione, ma contemporaneamente la sua presenza ne influenza anche il pH rendendolo più acido. La procedura usata per solubilizzare il Dicamba a concentrazioni elevate è la seguente:

- Si è aggiunto Dicamba in acqua fino ad ottenere una soluzione a pH 3;
- Viene aggiunta una quantità di soluzione di NaOH 5 M fino ad ottenere un pH intorno a 4;
- Si procede nello stesso modo finché si ottiene la concentrazione di Dicamba desiderata.

Usando il metodo precedentemente descritto, si è osservato sperimentalmente che si è in grado di solubilizzare concentrazioni di Dicamba che superano anche i 250 g/L. Dopo aver raggiunto la concentrazione di Dicamba desiderata, la soluzione è sottoposta a trattamento con ultrasuoni per circa 30/40 minuti fino a quando non diventa limpida. Durante la sonicazione, si prepara una soluzione di cloruro di calcio 0,4 M. Al termine della sonicazione si prelevano 10 ml di soluzione contenente Dicamba e 10 ml di soluzione contenente $CaCl_2$, ottenendo così una soluzione con concentrazione 0,2 M di cloruro di calcio (stessa concentrazione usata per la formazione dell'idrogelo nei casi precedenti). È impossibile aggiungere il cloruro di calcio alla soluzione di Dicamba e NaOH prima della sonicazione, poiché si è osservato che il $CaCl_2$ reagisce con l'idrossido di sodio portando alla

precipitazione del sale e, di conseguenza, non è più in grado di reagire con l'alginato per formare l'idrogelo.

Per ovviare al problema di formazione dei sali precipitati si è tentato di dissolvere il Dicamba nella soluzione di alginato di sodio, ma ciò è stato impossibile poiché il Dicamba ha reagito direttamente con l'alginato, creando anche in questo caso un precipitato.

2.3.2 Meccanismo di formazione di nano-idrogeli partendo da Alginato di Sodio e Cloruro di Calcio e struttura dell'idrogelo

In questo lavoro di tesi per la formazione dei nano-idrogeli si è utilizzato l'alginato di sodio come monomero e il cloruro di calcio per avere in soluzione cariche opposte a quelle del monomero.

L'alginato è un polisaccaride lineare solubile in acqua, biodegradabile, biocompatibile e non tossico, costituito da due monomeri differenti, l'α-D-mannuronate (M) e il β-L-guluronato (G), che possono essere presenti in proporzioni differenti nella catena. In Figura 2.4 è riportata la struttura dell'alginato e sono messi in evidenza i due differenti monomeri. È presente nelle alghe marroni e può essere trovato anche come prodotto metabolico di alcuni batteri. La composizione chimica e la sequenza degli M e G dipende dalla fonte biologica da cui si ottiene. Gli alginati essendo polisaccaridi sono polidispersi per quanto riguarda la massa molecolare, per questo assomigliano di più a polimeri sintetici più che ad altri polimeri organici come le proteine e gli acidi nucleici. [21] [22]

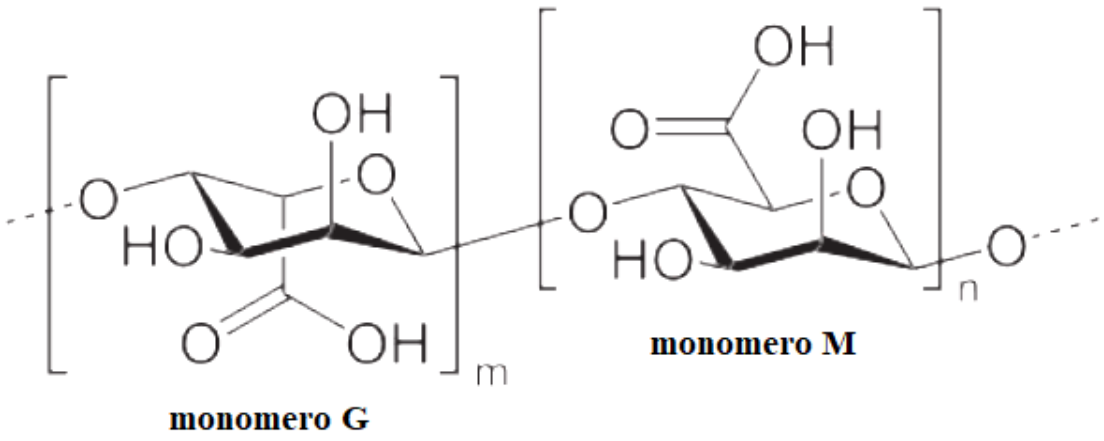

Figura 2.4 *Rappresentazione della struttura dell'alginato in cui viene mostrata la differenza tra il monomero G e il monomero M.*

Dagli alginati si possono formare gel abbassando il pH sotto il pK_a dei residui uronici oppure ponendoli in presenza di ioni divalenti. Gli ioni divalenti interagiscono coi i blocchi di G per creare dei ponti tra due differenti catene. L'abilità di formare questi tipi di legame dipende dalla lunghezza dei blocchi G. Il modello più accreditato per questo tipo di associazione tra le due catene è l'"egg box model" mostrato in Figura 2.5, anche se ancora si stanno facendo studi al riguardo. In questo modello i blocchi G formano delle cavità tridimensionali dove lo ione di Ca è incluso come le uova in un cartone di uova. Gli ioni di Ca derivano ovviamente dal $CaCl_2$. [21]

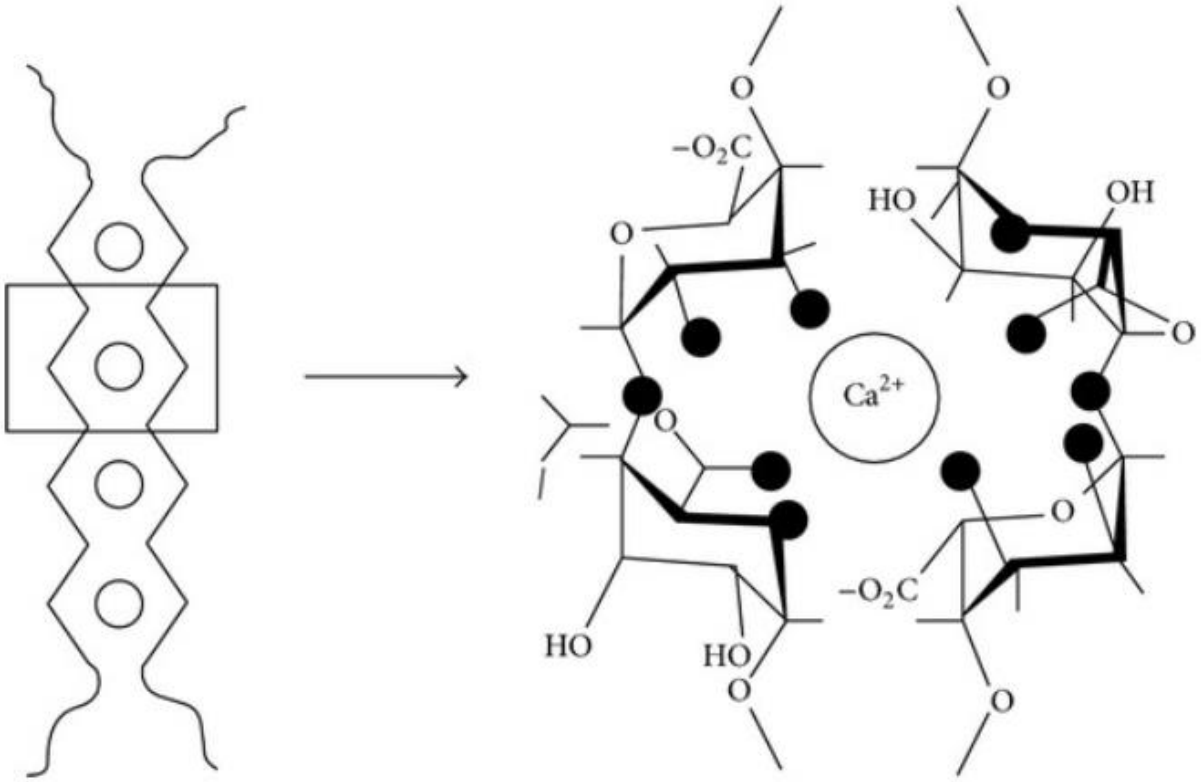

Figura 2.5 *Egg box model*

2.4 Caratterizzazione dimensionale delle nanoparticelle

Per la caratterizzazione dimensionale si è impiegato il **DLS Zetasizer Nano ZS90** (Malvern Instruments, Malvern, Regno Unito), per ricavare le misure del diametro idrodinamico, di PDI e di potenziale Z. DLS sta per Dynamic Light Scattering, è una tecnica non distruttiva in cui il campione viene illuminato da un raggio laser e vengono misurate le variazioni d'intensità della luce diffusa in funzione del tempo, generate dal movimento browniano delle particelle. Nelle stesse condizioni di temperatura e viscosità le particelle piccole si muovono rapidamente creando variazioni rapide dell'intensità di scattering, mentre particelle grosse si muovono lentamente, creando delle variazioni d'intensità lente. Attraverso una funzione di correlazione e in base alla velocità di scattering lo strumento ottiene il coefficiente di diffusione delle particelle che a sua volta, grazie all'equazione di Stokes-Einstein, può essere tradotto nel diametro idrodinamico della particella.

Il DLS è anche in grado di calcolare il potenziale Z, ovvero la carica superficiale delle nanoparticelle. Quest'ultimo è un parametro fondamentale che descrive le interazioni tra le nanoparticelle stesse. Valori di potenziale Z elevati (i.e. <-30[mV] e >+30[mV]) fanno sì che le nanoparticelle si respingano tra loro evitando la formazione di agglomerati, aggregazione e/o flocculazioni.

Un'altro parametro che ricaviamo dal DLS è il PDI o indice di polidispersità, un valore compreso tra 0 e 1 che fornisce indicazioni sulla distribuzione dimensionale delle nanoparticelle. Valori bassi indicano una distribuzione stretta, che si traduce in

nanoparticelle con dimensioni molto simili tra loro. Vengono considerati valori bassi i valori che sono inferiori a 0,3.

In tutte le misurazioni si è impostata una temperatura di 25°C, usando per l'analisi cuvette di polistirene standardizzate DTS 0012 prodotte da Malvern Instruments (Malvern, Regno Unito), dentro le quali si è collocata 1 ml di soluzione non diluita tramite una micropipetta. Per questa analisi cumulativa lo strumento necessita dell'indice di rifrazione e la viscosità della fase continua e dell'indice di rifrazione e l'assorbanza della fase dispersa, che riportiamo nella Tabella 2.1. I valori caratteristici della fase dispersa usati differiscono tra le misurazioni fatte per la miniemulsioni e quelle dei nano-idrogeli. Per lo studio delle miniemulsioni si sono applicati i valori di rifrazione e assorbanza dell'acqua, mentre per lo studio dei nano-idrogeli vengono usati i valori dell'alginato di sodio. L'indice di rifrazione e la viscosità della fase continua sono quelli dell'olio di semi di girasole.

Tabella 2.1 *Parametri operative adoperati per la misurazione al DLS*

	Fase continua (olio)
Indice di rifrazione	1,474
Viscosità (cP)	60,0000
	Fase dispersa miniemulsione (acqua)
Indice di rifrazione	1,330
Assorbanza	0
	Fase dispersa nano-idrogelo (alginato di sodio)
Indice di rifrazione	1,370
Assorbanza	0

2.5 Separazione degli idrogeli per centrifugazione

Durante le prove sperimentali si è ritenuto opportuno lo studio di un adeguato metodo di separazione dell'idrogelo dalla fase continua oleosa. Il metodo scelto per la separazione è l'ultracentrifugazione. Di seguito sono esplicitati i passaggi e i parametri a cui si è svolta questa operazione.

Si sono riempite varie Eppendorf da 1,5 ml con una soluzione oleosa in cui l'idrogelo è stato già formato. Si è fatta una prima centrifugazione a 14000 giri al minuto per 15 minuti. In seguito alla prima centrifugazione è possibile notare un accumulo di idrogelo sul fondo dell'Eppendorf. Con una micropipetta si è cautamente rimosso l'olio e sostituito con acqua

deionizzata. Si sono reinserite le Eppendorf nella centrifuga per un secondo ciclo di centrifugazione alle stesse condizioni operative. Si è rimossa anche quest'acqua per eliminare eventuali impurità e si è reinserita nuovamente altra acqua nelle Eppendorf. Per favorire la separazione dei nano-idrogeli, che tendono a compattarsi durante l'operazione di centrifugazione, le Eppendorf contenenti la sospensione sono trattate in un bagno sonico per circa 10 min.

2.6 *Determinazione delle curve di rilascio di Dicamba*

La velocità di rilascio del Dicamba dai nano-idrogeli è determinata per mezzo di dialisi. A questo scopo si è usata una membrana di cellulosa con un molecular weight cut di 14,000 Dalton, abbastanza grande da essere attraversato dal Dicamba ma da trattenere i nano-idrogeli.

Nello specifico, 40 ml di sospensione di nano-idrogelo in olio sono inseriti nella membrana di dialisi. La membrana è chiusa alle due estremità per mezzo di due pinze formando un sacchetto. Nel sacchetto è inserita una biglia di vetro, in modo da dargli peso e garantire che il sacchetto sia completamente immerso nella soluzione di *buffer*. Quest'ultima è costituita da una soluzione acquosa di NaOH allo 0,17% in volume, in modo tale da bilanciare la pressione osmotica dovuta alla presenza di NaOH nell'idrogelo, utilizzato durante il processo di solubilizzazione del Dicamba. L'intero volume della soluzione acquosa è di circa 750 ml. La soluzione *buffer*, in cui il sacchetto di dialisi si trova immerso, è costantemente miscelata con un agitatore magnetico operante alla velocità minima e ricoperta in carta alluminio per limitare l'esposizione del Dicamba alla luce che potrebbe favorirne la degradazione vista la sua fotosensibilità`.

Una volta avviata la prova, si effettuano dei prelievi di circa 3 ml di soluzione buffer a tempi prestabiliti. A seguito di ogni prelievo, si reintegra la soluzione con un pari volume di soluzione buffer. Le soluzioni così prelevate sono in seguito analizzate allo spettrofotometro UV/Visibile senza alcuna diluizione. Come bianco si è usata la soluzione *buffer*.

Lo strumento usato è lo spettrofotometro UV/Visibile **SPECORD S 600** (Analytik Jena AG, Germania). Lo Spettrofotometro è uno strumento in grado di effettuare analisi quali-quantitative utilizzando una sorgente luminosa. Con questo strumento si riesce a misurare qual è l'assorbanza di un campione a diverse lunghezze d'onda. Sapendo che un determinato composto assorbe una determinata lunghezza d'onda (ad esempio il Dicamba ha un picco d'assorbanza a 280,5 nm) si può, attraverso questo strumento, rilevarne la presenza e la concentrazione. Infatti, nota l'assorbanza, attraverso la legge di Lambert e Beer, si può ricavare la concentrazione di Dicamba.

2.7 Programmazione delle prove sperimentali

Le condizioni operative utilizzate per le prove di emulsione sono riportate in Tabella 2.2, quelle con nano-idrogelo in Tabella 2.3 e, infine, quelle con nano-idrogelo con Dicamba in Tabella 2.4 e 2.5.

Tabella 2.2 Parametri impiegati per la produzione delle diverse miniemulsioni.

Nome campione	Massa fase continua [g]	Pluronic nella fase continua [g]	Concentrazione in w/w di alginato nella soluzione acquosa	Velocità di rotazione Ultra-Turrax [rpm]
E_01	67,5	0,35	1%	14000
E_02	67,5	0,4	1%	14000
E_03	67,5	0,29	1%	14000
E_04	67,5	0,24	1%	14000
E_05	67,5	0,29	1%	10000
E_06	67,5	0,29	1%	8000
E_07	67,5	0,29	1%	10000

Tabella 2.3 *Parametri impiegati per la produzione dei diversi campioni di nano-idrogelo senza Dicamba.*

Nome campione	Massa fase continua [g]	Pluronic nella fase continua [g]	Concentrazione in w/w di alginato nella I° soluzione acquosa	Concentrazione molare di $CaCl_2$ nella II° soluzione acquosa	Velocità di rotazione Ultra-Turrax [rpm]
I_01	67,5	0,29	1%	0,2	10000
I_02	67,5	0,29	2%	0,2	10000
I_03	67,5	0,29	1%	0,2	8000
I_04	67,5	0,29	1%	0,2	14000
I_05	67,5	0,29	1%	0,2	10000
I_06	67,5	0,29	1%	0,2	10000

Tabella 2.4 *Parametri comuni, applicati per tutte le formulazioni di nano-idrogelo contenenti Dicamba.*

Massa fase continua [g]	Pluronic nella fase continua [g]	Concentrazione in w/w di alginato nella I° soluzione acquosa	Concentrazione molare di $CaCl_2$ nella II° soluzione acquosa	Velocità di rotazione Ultra-Turrax [rpm]
67,5	0,29	1 %	0,2	10000

Tabella 2.5 *Parametri impiegati per la produzione dei diversi campioni di nano-idrogelo contenenti Dicamba*

Nome campione	Concentrazione in g/L di Dicamba nella II° soluzione acquosa	Concentrazione in v/v di NaOH nella II° soluzione acquosa
D_01	1	-
D_02	3	-
D_03	56,6	6,16%
D_04	245	20,88%
D_05	200	19,35%

3 Risultati

In questo capitolo verranno discussi i risultati ottenuti durante le prove sperimentali. Queste prove hanno permesso di determinare la formulazione e le condizioni operative migliori per la produzione di nano-idrogeli contenenti Dicamba. Si discuteranno anche i risultati delle prove di rilascio che danno un'idea del tempo di rilascio e del quantitativo di Dicamba che viene rilasciato dall'idrogelo.

Verranno analizzate in ordine le prove per la produzione della miniemulsione, la produzione del nano-idrogelo, lo studio del loading del principio attivo, la prova di separazione del nano-carrier dalla soluzione oleosa e le prove di rilascio.

Non sono stati fatti studio sulla scelta del tensioattivo, perché tale studio è stato già fatto precedentemente dal lavoro di tesi di laurea svolto da Valeria Gigante presso il Politecnico di Torino. [27]

3.1 Studio preliminare sul processo di produzione dell'emulsione inversa

Come detto nel capitolo precedente la tecnica usata per creare il nano-idrogelo è la polimerizzazione in miniemulsione inversa. Il primo passo quindi è quello di riuscire ad ottenere una miniemulsione è avere un'idea del suo ordine di grandezza, dato che la grandezza della miniemulsione sarà direttamente collegata alla grandezza del nano-idrogelo.

Tutte le prove di produzione della miniemulsione sono state fatte usando l'Ultra Turrax come omogeneizzatore e impiegando come fase continua olio e Pluronic e come fase dispersa una soluzione di acqua e alginato di sodio all'1% in peso. Non si sono fatte prove in cui si è usata solo l'acqua come fase dispersa perché si voleva vedere fin da subito l'eventuale influenza dell'alginato sulla formazione e stabilità della miniemulsione.

Si sono studiati gli effetti che hanno sull'emulsione il numero di giri e la quantità di Pluronic immessa nella fase continua. Tutti i parametri non discussi in questa sezione sono identici a quelli descritti nella sezione §2.3.1.

La prima prova sperimentale (E_01) è stata fatta con i seguenti parametri:

- Omogeneizzazione tramite Turrax a 14000 rpm per 10 min;
- 0,35 g di Pluronic in 67,5 g di olio.

Appena terminata la fase di produzione, il campione è stato analizzato al DLS per ottenerne una caratterizzazione dimensionale. Per lo stesso campione sono state fatte più misurazioni per assicurarsi dell'esattezza della misurazione stessa. Dalle varie prove si è ottenuto un valore medio della dimensione delle nanoparticelle di 73,59 nm, con una deviazione standard

di 19,77 nm e una polidispersità di 0,459. I valori di diametro e deviazione standard sembrerebbero valori plausibili per una miniemulsione; la polidispersità però è troppo elevata (si parla di polidispersità elevata quando si è al di sopra dello 0,3) e ciò potrebbe significare che vi è qualche anomalia nella formazione della miniemulsione con i parametri operativi usati. Si possono comprendere meglio i risultati ottenuti analizzando la curva di distribuzione dimensionale rappresentata in Figura 3.1.

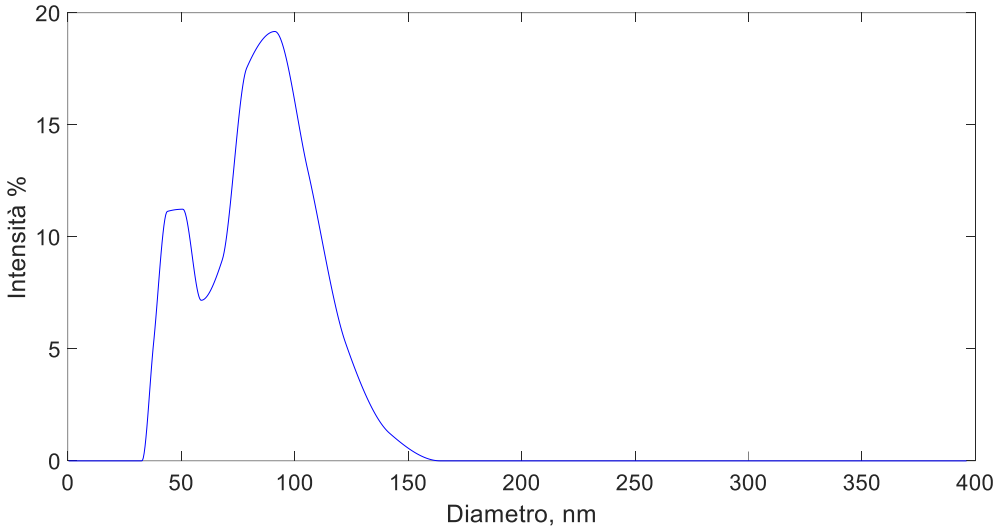

Figura 3.1 *Distribuzione dimensionale dell'emulsione, campione E_01*

Nelle ascisse troviamo la dimensione in nm dei diametri delle nano particelle, nelle ordinate la percentuale di nanoparticelle rilevate con un determinato diametro.

La curva di distribuzione ottenuta è molto larga, ciò è dovuto all'alta polidispersità del campione (la polidispersità viene considerata alta al di sopra di 0,3). Un'altra anomalia nella curva sarebbe la presenza di un doppio picco le cui cause potrebbero essere:

- Una quantità di tensioattivo non sufficiente da stabilizzare l'emulsione;
- Una quantità di tensioattivo superiore alla CMC (concentrazione micellare critica) che causa la formazione di micelle che interferiscono con la misura al DLS.

Per meglio comprendere la causa di questo elevato valore di polidispersità, sono state fatte altre due prove variando la quantità di Pluronic: (E_02) 0,4 g di Pluronic in 67,5 g di Olio e (E_03) 0,29 g di Pluronic in 67,5 g di Olio.

I due campioni ottenuti sono stati analizzati al DLS immediatamente dopo la produzione. Anche in questo caso sono state fatte più misurazioni per ciascun campione. Per la miniemulsione E_02 si è ottenuto un diametro medio delle varie misurazioni di 82,68 nm con una deviazione standard di 13,55 nm e una polidispersità di 0,58, mentre nel campione E_03 si è rilevata una dimensione media di 26,66 nm con deviazione standard di 6,15 nm e una polidispersità di 0,23.

Confrontando i risultati di quest'ultime due prove con la precedente, si evince che il campione E_02 ed E_01 mostrano una dimensione media dell'emulsione simile, mentre il valore della polidispersità è maggiore per la prova E_02 che contiene un quantitativo

maggiore di Pluronic. Al contrario, nel campione E_03, che contiene meno Pluronic, si è osservata una diminuzione della dimensione media dell'emulsione nonché una riduzione della polidispersità. In Figura 3.2 si mettono a confronto le tre prove in termini di curve di distribuzione dimensionale.

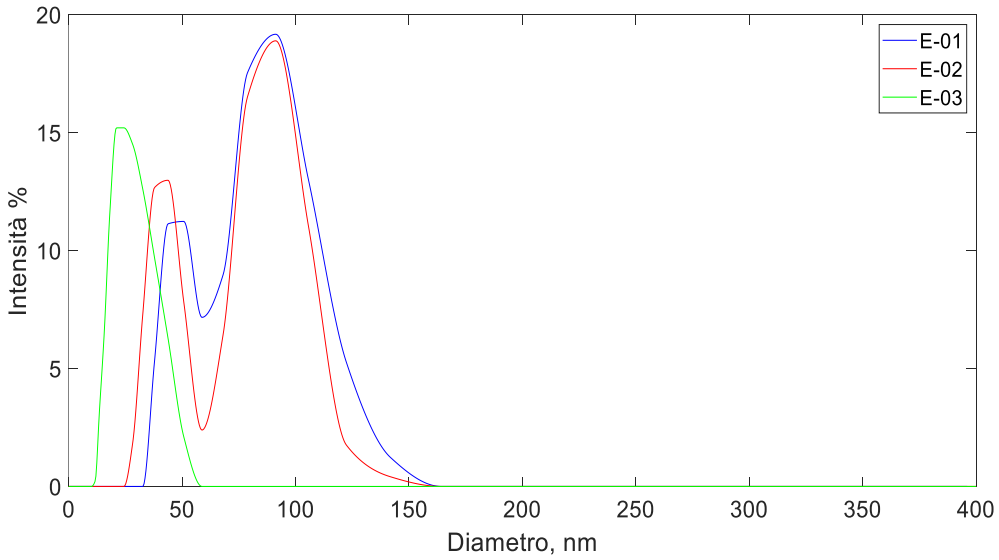

Figura 3.2 *Distribuzione dimensionale dei campioni E_01, E_02 ed E_03 ottenuti a differenti concentrazioni di Pluronic nell'olio.*

Si evince che riducendo la concentrazione di Pluronic (campione E_03) la miniemulsione è pressoché monodispersa, scompare la presenza del doppio picco. Ciò va a confermare l'ipotesi che con quantità superiori a 0,29 g di Pluronic in 67,5 g di olio si vengono a formare micelle.

Usando 0,29 g di Pluronic non otteniamo solamente gocce più uniformi ma anche più piccole, molto probabilmente perché i diametri rilevati nelle altre due misurazioni erano influenzati dalla presenza delle micelle di tensioattivo. Al fine di confermare la riproducibilità dei risultati finora ottenuti, la prova E_03 è stata ripetuta. Per tutte le prove si sono ottenuti valori di diametro e polidispersità molto simili a quelli del campione E_03.

Per studiare meglio il comportamento della miniemulsione al variare della quantità di Pluronic si è deciso di fare un'ulteriore prova riducendo la quantità di Pluronic rispetto al valore utilizzato nella prova E_03. Nello specifico si è condotta una quarta prova, E_04, usando 0,24 g di Pluronic in 67,5 g di olio, la cui distribuzione dimensionale è rappresentata in Figura 3.3. Anche quest'ultimo campione è stato misurato al DLS subito dopo la produzione. Si è ottenuto un diametro medio della miniemulsione di 52,18 nm con deviazione standard di 7,95 nm e una polidispersità di 0,19.

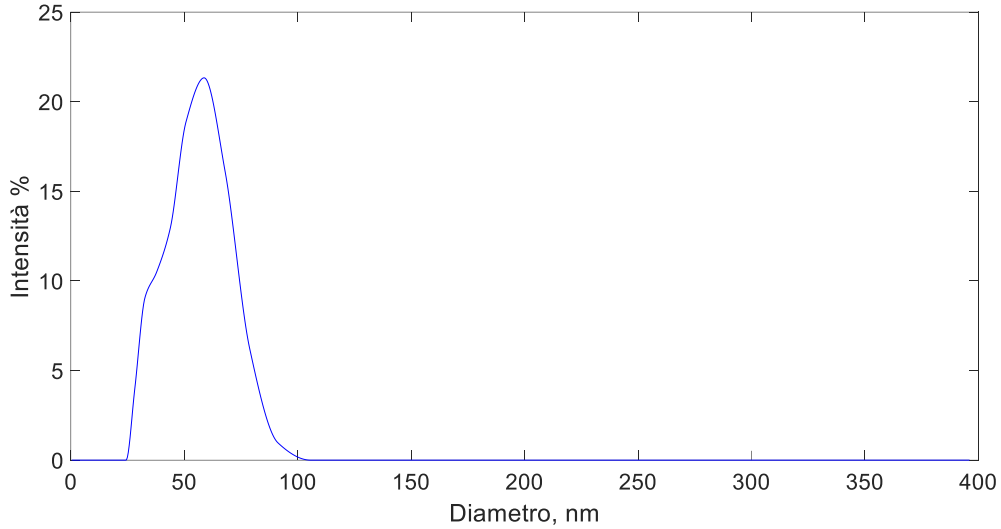

Figura 3.3 *Distribuzione dimensionale campione E_04*

Si nota che anche con una quantità di tensioattivo minore si ottiene comunque una miniemulsione monodispersa; infatti il valore di polidispersità ottenuto è basso e in Figura 3.3 non vi sono doppi picchi presenti. Otteniamo però una grandezza media maggiore rispetto al campione contenente 0,29 g di Pluronic.

L'aumento del diametro è in accordo con la legge di Gibbs (3.1):

$$-d\gamma = RT\Gamma\, dln(c) \tag{3.1}$$

Dove γ è la tensione interfacciale, R è la costante universale dei gas, T è la temperatura assoluta, c l'attività o concentrazione, Γ l'eccesso di superficie (moli assorbite per unità di area di interfaccia). Secondo questa legge quindi un aumento della concentrazione di tensioattivo porta alla formazione di goccioline con dimensioni minori. Da qui risulta ovviamente che una diminuzione della concentrazione di tensioattivo porta alla formazione di gocce più grandi e ciò è in accordo coi risultati trovati nelle prove sperimentali.

In Tabella 3.1, per facilitare il confronto tra le varie prove ottenute variando la quantità di tensioattivo, sono riportati i risultati ottenuti delle prove già viste.

Tabella 3.1 *Diametro e polidispersità ottenuti a diverse quantità di tensioattivo*

Sigla campione	*% in w/w Pluronic*	*Diametro medio [nm]*	*Polidispersità*
E_01	0,59	73,59 ± 19,77	0,459
E_02	0,51	82,68 ± 13,55	0,577
E_03	0,43	26,66 ± 6,15	0,228
E_04	0,36	52,18 ± 7,95	0,184

A causa dell'aumento del diametro dell'ultima prova si è deciso di proseguire nelle prove a venire con la formulazione del campione E_03.

3.1.1 Influenza della velocità di rotazione dell'Ultra Turrax sulla miniemulsione

Dopo aver trovato la quantità ottimale di tensioattivo si è analizzato come la velocità di rotazione del Turrax influisca sulla miniemulsione. Le velocità prese in esame sono 14000 rpm (E_03), di cui si sono già visti nella sezione precedente i risultati, 10000 rpm (E_05) e 8000 rpm (E_06). I risultati di questa analisi sono riportati in Tabella 3.2. Non si sono prese in considerazione velocita di rotazioni superiori ai 14000 rpm per evitare eccessivi sforzi meccanici sul macchinario.

Tabella 3.2 *Diametro e polidispersità delle minismuelsioni ottenute a diverse velocità di rotazione*

Sigla campione	*Velocità di rotazione rpm*	*Diametro medio [nm]*	*Polidispersità*
E_03	14000	26,66 ± 6,15	0,228
E_05	10000	21,43 ± 3,03	0,285
E_06	8000	131,59 ± 77,05	0,92

Si evince che la dimensione dell'emulsione non si modifica diminuendo la velocità rotazionali da 14000 a 10000 rpm. Al contrario, diminuendo ulteriormente la velocità a 8000 rpm la dimensione dell'emulsione aumenta in maniera significativa e soprattutto i risultati sono poco riproducibili e l'indice di polidispersità è molto alto, circa 1. Evidentemente a queste velocità gli sforzi di taglio non sono sufficienti a creare una miniemulsione stabile. Per essere certi di questo risultato si sono fatte altre prove a 8000 rpm, ma i risultati sono stati gli stessi del campione E_06.

Tra i valori ottenuti dal campione E_03 e dal campione E_05 come detto prima non si notano grandi differenze. Tuttavia, visto che un'agitazione intensa porta ad un riscaldamento della soluzione per effetto Joule, è preferibile lavorare alla velocita` minima possibile, compatibilmente con la stabilità della mini-emulsione. Infatti, se l'aumento della temperatura non rappresenta un problema per il processo di formazione dell'emulsione, lo potrebbe diventare nella fase di formazione dell'idrogelo o durante la fase di incorporazione del Dicamba che si deteriora a temperature intorno ai 50 °C.

In Figura 3.4 sono riportate le distribuzioni dimensionali dei tre campioni ottenuti a velocità rotazionali differenti. È evidente come per le velocità di 14000 e 10000 rpm si ottengano miniemulsioni monodisperse, mentre a velocità di 8000 rpm si ottiene un campione molto polidisperso con diversi picchi.

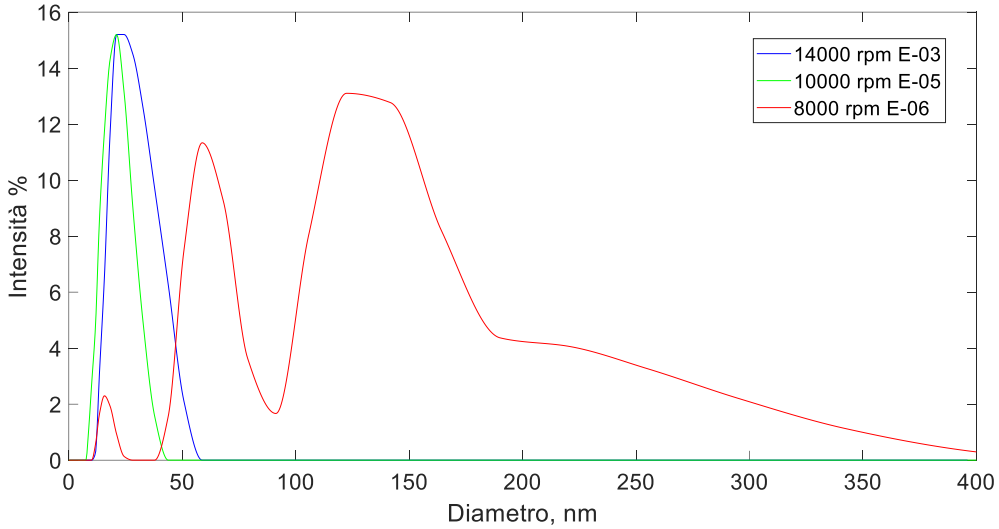

Figura 3.4 *Dispersione dimensionale campione E_03, E_05, E_06 ottenuti a diverse velocità di rotazione.*

3.1.2 Stabilità della miniemulsione

Per vedere quanto è stabile nel tempo la miniemulsione ottenuta si è prodotto un altro campione usando le stesse condizioni adoperate per produrre il campione E_05. La dimensione dell'emulsione è stata monitorata per due giorni. I risultati di questa analisi sono riportati in Tabella 3.3 e in Figura 3.5. Le barre d'errore della Figura 3.5 rappresentano la deviazione standard del diametro delle nanoparticelle.

Tabella 3.3 *Studio della stabilità della miniemulsione*

Sigla campione E_07		
Primo giorno	**Diametro [nm]**	20,27 ± 4,56
	Polidispersità	0,227
Secondo giorno	**Diametro [nm]**	37,44 ± 11,43
	Polidispersità	0,278
Terzo giorno	**Diametro [nm]**	43,54 ± 11,2
	Polidispersità	0,263

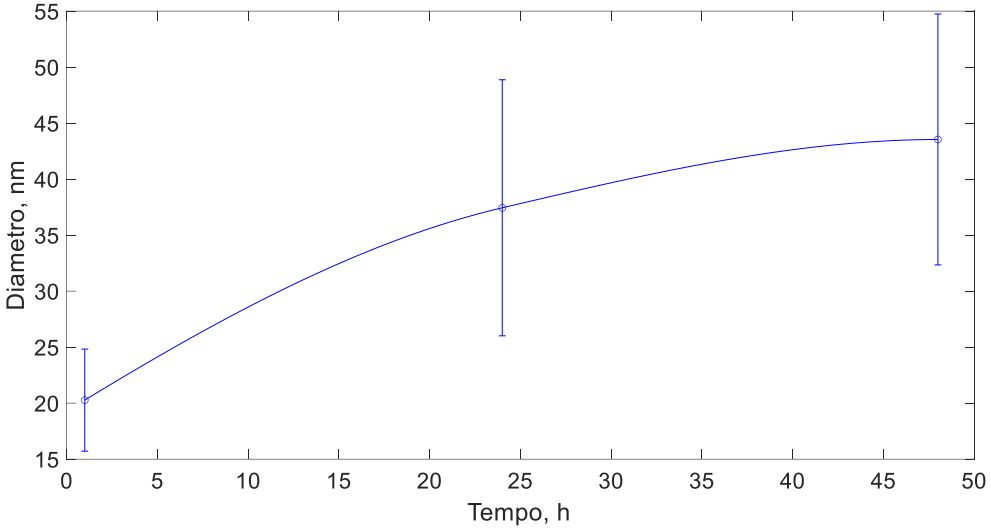

Figura 3.5 *Andamento della dimensione della miniemulsione nel tempo.*

Si può osservare che non sono presenti grandi differenze tra il primo, il secondo e il terzo giorno anche se si nota un leggero e progressivo aumento del diametro, probabilmente dovuto dall'effetto di maturazione di Ostwald dato che nella nostra produzione non è presente un ultraidrofilo stabilizzante. Vi è anche un evidente aumento della deviazione standard già dopo il primo giorno, ulteriore segno della poco elevata stabilità nel tempo della miniemulsione. Queste variazioni si possono comunque considerare ininfluenti per la produzione del nano-idrogelo.

3.2 Sintesi del carrier

In questa fase del progetto si andrà a sintetizzare il nano-idrogelo senza inglobare dentro il principio attivo. Si valuteranno varie configurazioni di processo per vederne gli effetti sulle proprietà dell'idrogelo e poter quindi in seguito scegliere quelle ottimali. Nello specifico si studieranno gli effetti delle condizioni di processo sulla dimensione e stabilità del nano-idrogelo nel tempo. Si valuterà inoltre l'uso della centrifugazione per vedere se è possibile separare l'idrogelo, una volta formato, dalla fase continua oleosa.

La sintesi viene fatta seguendo la procedura indicata nella sezione §2.3.1. Immediatamente dopo alla produzione del campione I_01, si è analizzato al DLS e si è ottenuto un diametro medio di 20,58 nm con deviazione standard di 4,44 e polidispersità 0,14. Si è poi misurato anche il potenziale Z ottenendo un valore di - 157 mV.

Il valore del diametro dell'idrogelo ottenuto è molto simile a quello della miniemulsione di partenza; inoltre, le particelle sono sostanzialmente monodisperse. Come già detto nel Capitolo 2, si possono considerare dei buoni valori di potenziale Z quelli compresi nell'intervallo <-30 mV o >30 mV, poiché a questi valori si hanno meno problemi di coalescenza tra le nanoparticelle, che si respingono grazie alle loro cariche. Il valore del potenziale Z ottenuto ci suggerisce quindi che non dovrebbero esserci problemi di

formazione di agglomerati o flocculazioni. Questo verrà in seguito dimostrato anche dalle prove di stabilità nel tempo fatte su altri campioni.

In Figura 3.6 è rappresentata la curva di distribuzione dimensionale che dimostra l'alta monodispersità del campione.

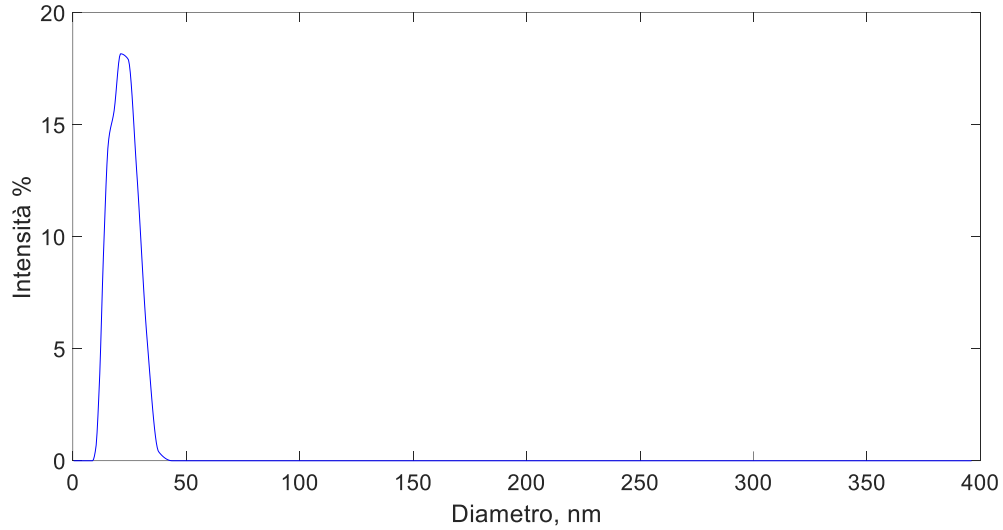

Figura 3.6 *Distribuzione dimensionale delle nanoparticelle di idrogeli del campione I_01.*

3.2.1 Effetto della concentrazione di alginato di sodio

Uno dei parametri che si è modificato per vederne l'influenza nella formazione del nano-idrogelo è la concentrazione di alginato di sodio nella soluzione acquosa di partenza (fase dispersa I). Si è prodotto un idrogelo raddoppiando la quantità di alginato usata, partendo quindi da una soluzione acquosa di alginato al 2% in peso. Le prove sono state condotte sempre per un totale di 15 minuti a 10000 rpm. I risultati sono riportati nella Tabella 3.4 dove vengono anche paragonati a quelli del campione I_01.

Tabella 3.4 *Valutazione al DLS di diametro, polidispersità e potenziale Z del campione I_02*

Nome Campione	Diametro [nm]	Polidispersità	Z potential [mV]
I_01	20,58 ± 4,44	0,137	-157
I_02	35,15 ± 13,52	0,362	-191

È evidente un incremento del diametro medio delle particelle di nano-idrogelo, probabilmente a causa dell'uso di un tensioattivo non ionico come il Pluronic, che promuove solo una stabilità sterica data l'assenza di cariche e risulta quindi meno efficace nel mantenere separate le gocce nel processo di polimerizzazione. Si è misurato anche il potenziale Z per vedere se la maggior quantità di alginato influenzasse la carica superficiale del nano-idrogelo e come si vede dalla tabella è leggermente più negativo. Ciò non dovrebbe causare problemi, anzi se non altro la forza di repulsione tra i nano-carriers dovrebbe essere maggiore quindi non è plausibile un aumento della dimensione per aggregazione dei nano-idrogeli. La polidispersità è maggiore, ma comunque in un intervallo accettabile.

Il problema principale riscontrato nell'usare una percentuale di alginato così alta è il processo di solubilizzazione dell'alginato nell'acqua. Infatti, se per solubilizzare una soluzione composta dall'1% di alginato in peso è necessario agitare la soluzione per un'ora, raddoppiando la percentuale di alginato raddoppia il tempo di solubilizzazione se si usa un agitatore magnetico, oppure è necessario l'uso di un bagno ad ultrasuoni. Per questo motivo si è pensato più opportuno continuare la sintesi dei nano-idrogeli con la quantità minore di alginato.

3.2.2 Effetto della velocità di rotazione

Anche per la sintesi del nano-idrogelo si è fatto uno studio per osservare se vi è una correlazione tra la velocità di rotazione e la dimensione dei nano-carrier. Per poter confrontare questa esperienza con quella fatta per la miniemulsione si sono prese in considerazione le stesse 3 velocità. I risultati sono riportati in Tabella 3.5.

Tabella 3.5 *Valutazione al DLS di diametro e polidispersità al variare della velocità di rotazione*

Nome Campione	Velocità di rotazione [rpm]	Diametro [nm]	Polidispersità
I_03	8000	112,3 ± 90,46	0,749
I_01	10000	20,58 ± 4,44	0,137
I_04	14000	19,34 ± 0,3	0,346

Come si nota dalla Tabella 3.5 i risultati ottenuti per quest'esperienza mostrano lo stesso comportamento delle miniemulsioni alla variazione della velocità di rotazione.

In Figura 3.7 si osserva che se si utilizza una velocità di agitazione di 8000 rpm, la distribuzione dimensionale dell'emulsione multimodale. Ciò conferma che a questa velocità gli sforzi di taglio non sono sufficienti per creare una miniemulsione di partenza stabile, causando la formazione di idrogeli molto polidispersi. Le distribuzioni alle velocità più elevate sono invece monomodali.

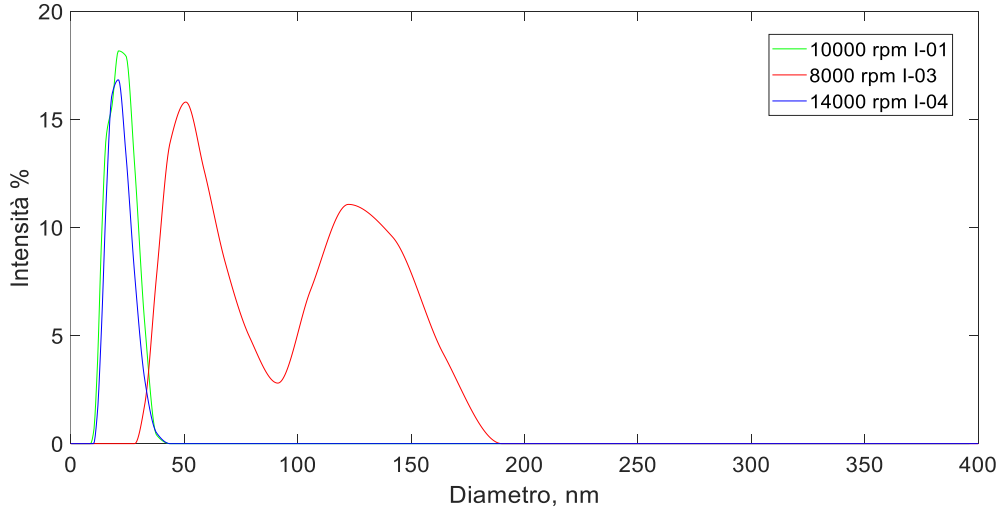

Figura 3.7 *Distribuzione dimensionale idrogeli prodotti a differenti velocità di rotazione*

3.2.3 Stabilità nel tempo del nano-idrogelo

Procediamo con lo studio della stabilità nel tempo dei nano-idrogeli, svolto alla stessa maniera di quello precedentemente fatto per la stabilità della miniemulsione. Dato il potenziale Z così negativo non ci si aspetta la formazione di agglomerati, quindi la dimensione e la polidispersità del campione analizzato dovrebbero rimanere costanti nel tempo.

Questa esperienza potrebbe anche essere una conferma della formazione dei nano-idrogeli. Se non si fosse formato l'idrogelo il DLS potrebbe rilevare solamente delle miniemulsioni con dell'alginato di sodio solubilizzato all'interno. Come abbiamo visto dall'esperienza sulla miniemulsione esse tendono ad ingrandirsi col tempo, mentre con l'idrogelo non si dovrebbe osservare questo fenomeno. I risultati sono riportati in Tabella 3.6 e Figura 3.8, in cui le barre di errore rappresentano sempre la deviazione standard.

Tabella 3.6 *Prova di stabilità nel tempo del nano-idrogelo*

Sigla campione I_05		
Primo giorno	**Diametro [nm]**	20,31 ± 4,54
	Polidispersità	0,264
Secondo giorno	**Diametro [nm]**	20,89 ± 7,02
	Polidispersità	0,172
Terzo giorno	**Diametro [nm]**	21,12 ± 5,89
	Polidispersità	0,173

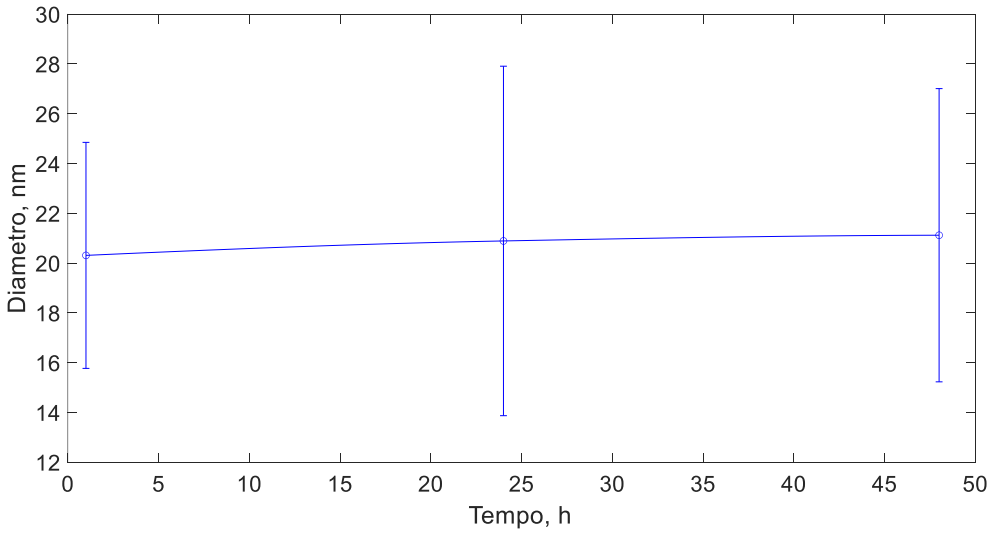

Figura 3.8 *Andamento della dimensione dell'idrogelo nel tempo.*

È evidente dai valori tabulati che la dimensione delle particelle, come ipotizzato, è molto stabile nel tempo. Ciò, come detto prima, è dovuto al potenziale Z dei nano-idrogeli e ne conferma la produzione, dato il diverso comportamento del campione I_05 al campione E_07.

Come è possibile vedere dalla Figura 3.9, non ci sono rilevanti variazioni di diametro e polidispersità, le tre curve di distribuzione sono quasi identiche.

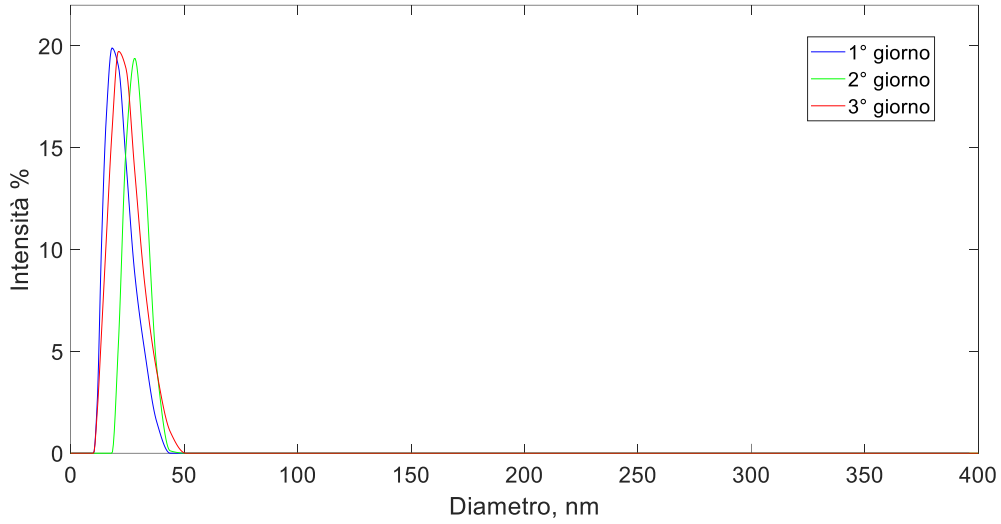

Figura 3.9 *Distribuzione dimensionale del campione I_05 nel tempo.*

3.2.4 Prova di separazione dalla fase continua tramite centrifugazione

Lo scopo di questa prova è vedere se è possibile separare l'idrogelo dalla fase oleosa continua. Il metodo applicato per ottenere questa separazione è la centrifugazione, descritta nella sezione §2.5.

Il processo di centrifugazione è stato fatto anche per eliminare dell'eventuale alginato non reagito, che potrebbe influire con la misurazione fatta al DLS. In seguito alla centrifugazione le molecole di alginato, più leggere dell'idrogelo, dovrebbero rimanere sospese nel solvente che viene rimosso dopo ogni ciclo di centrifugazione. Se le misurazioni fatte in seguito alle centrifugazioni fossero simili a quelle fatte pre-centrifugazione ciò escluderebbe la possibilità che il DLS stia rilevando alginato non reagito e questa potrebbe essere un'ennesima prova della riuscita della sintesi dei nano-idrogeli.

Come si può notare dalla Tabella 3.7 e dalla Figura 3.10 che non vi sono grandi differenze nel diametro e nella polidispersità del campione. Si è quindi riuscito a separare con successo l'idrogelo dalla fase continua oleosa. Vi è tuttavia un leggero aumento nel diametro delle nano particelle; ciò però è facilmente spiegabile considerando la natura degli idrogeli. Come si è visto nell'introduzione, gli idrogeli sono capaci di immagazzinare grandi quantità di acqua. Sostituendo la fase continua da olio ad acqua, le particelle di idrogeli hanno assorbito l'acqua, gonfiandosi e aumentando il proprio volume. Tuttavia, l'ingrandimento dei nano-idrogeli potrebbe anche essere conseguenza della formazione di aggregati durante il processo di centrifugazione, non separati durante il processo di sonicazione.

Tabella 3.7 Misurazione al DLS del campione pre e post centrifugazione

Sigla campione I_06		
Primo giorno	**Diametro [nm]**	21,25 ± 6,67
	Polidispersità	0,191
Secondo giorno	**Diametro [nm]**	29,75 ± 0,24
	Polidispersità	0,223

Si può anche notare in Figura 3.10 un leggero aumento nella larghezza della curva di distribuzione e quindi di polidispersità, ciò è probabilmente dovuto dalle diverse quantità d'acqua assorbite dalle nanoparticelle.

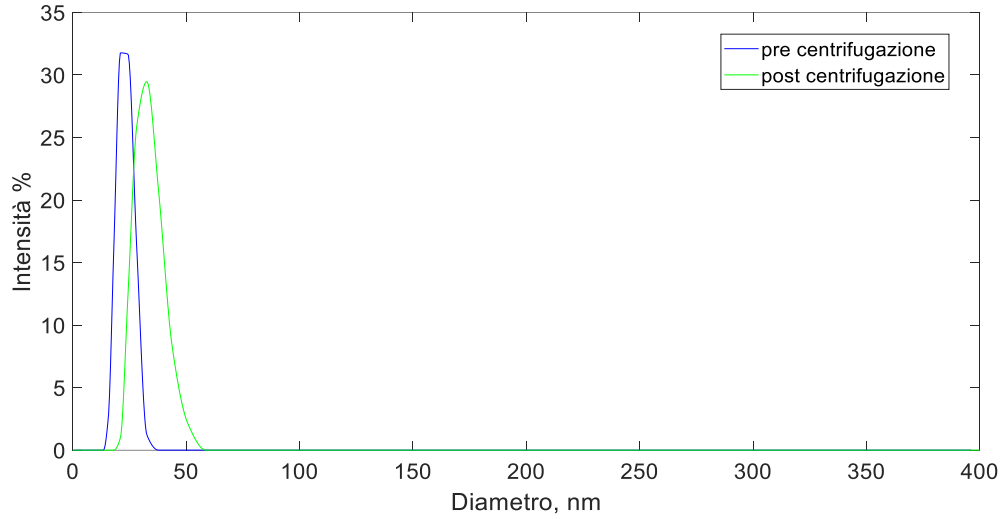

***Figura 3.10** Distribuzione dimensionale campione I_06 pre e post centrifugazione.*

Nella fase oleosa che è stata separata non vi era presente alcuna fase sospesa, ciò esclude la possibilità di grosse quantità di alginato non reagito.

3.3 Incapsulamento del Dicamba

Una volta ottenuto il nano-idrogelo ed avendo la certezza che sia stabile, si procede con la produzione di idrogeli al cui all'interno è incapsulato il Dicamba. Si ricorda che il Dicamba è idrofilo e pertanto verrà disciolto nella fase dispersa.

3.3.1 Studio della solubilità del Dicamba

Il Dicamba è sufficientemente solubile in acqua ma la sua solubilità varia notevolmente al variare del pH della soluzione, più acida è la soluzione e minore è la solubilità del Dicamba in essa. L'aggiunta del Dicamba in acqua però diminuisce il pH, infatti si è osservato dalle

esperienze fatte in laboratorio che una soluzione col solo 0,7% in peso di Dicamba raggiunge un pH di 2.

La solubilità massima di Dicamba ottenuta in laboratorio, senza l'aggiunta di additivi per controllare il pH, è proprio dello 0,7% in w/w o 7 g/L di soluzione. Soluzioni con concentrazioni superiori a quest'ultima presentavano sempre visibili precipitati, indipendentemente dal tempo di miscelazione o di sonicazione. Questa quantità non sarebbe comunque sufficiente da essere rilevata dallo spettrofotometro durante le prove di rilascio, è quindi necessario aumentarne la concentrazione in soluzione. Si è deciso, quindi, di usare come additivo una soluzione di idrossido di sodio 5 M, per innalzare il pH dopo l'aggiunta iniziale di Dicamba. Il processo per ottenere una soluzione di Dicamba ad alte concentrazioni è quello descritto nella sezione §2.3.1.

Nelle esperienze di laboratorio si è riuscito ad ottenere una concentrazione massima di Dicamba di ~ 270 g/L. La soluzione era costituita da:

- 50 ml di acqua deionizzata;
- 13,2 ml di soluzione di NaOH 5M;
- 17 g di Dicamba.

Nel complesso, si hanno 17 g di Dicamba in un totale di 63,2 ml di soluzione, ovvero si ha una concentrazione di 268,99 g/L.

3.3.2 Produzione del nano-idrogelo contenente il Dicamba

Dallo studio sulla solubilità del principio attivo si è convenuto che, per ottenere alte concentrazioni di Dicamba all'interno della soluzione e di conseguenza all'interno dell'idrogelo, è necessario aggiungere l'idrossido di sodio.

I campioni analizzati sono stati sintetizzati a partire dalle soluzioni descritte in Tabella 3.8.

Tabella 3.8 *Composizione delle soluzioni usate per la sintesi dei campioni D_01, D_02, D_03 e D_04*

Campione D_01	*Campione D_02*	*Campione D_03*	*Campione D_04*
0,29 g di Pluronic in 67,5 g di Olio (fase continua) Soluzione acquosa all'1% in w/w di alginato di sodio 50 ml di soluzione acquosa di $CaCl_2$ 0,2 M contenente 0,05 g di Dicamba (conc. 1g/L)	0,29 g di Pluronic in 67,5 g di Olio (fase continua) Soluzione acquosa all'1% in w/w di alginato di sodio 50 ml di soluzione acquosa di $CaCl_2$ 0,2 M contenente 0,15 g di Dicamba (conc. 3g/L)	0,29 g di Pluronic in 67,5 g di Olio (fase continua) Soluzione acquosa all'1% in w/w di alginato di sodio 10 ml di soluzione acquosa di $CaCl_2$ 0,4 M 50 ml di acqua, 3,28 ml di soluzione 5 M di NaOH e 3 g di Dicamba (conc. 56,6 g/L).	0,29 g di Pluronic in 67,5 g di Olio (fase continua) Soluzione acquosa all'1% in w/w di alginato di sodio 10 ml di soluzione acquosa di $CaCl_2$ 0,4 M 50 ml di acqua, 13,2 ml di soluzione 5 M di NaOH e 15,6 g di Dicamba (conc. 245 g/L).

Si è inizialmente deciso di sintetizzare i primi campioni di idrogelo contenenti Dicamba partendo da soluzioni con basse concentrazioni di quest'ultimo (campione D_01 e D_02), per vedere se influisce sulla formazione dei nano-idrogeli.

La procedura per la preparazione dell'idrogelo è descritta nella sezione §2.3. I campioni ottenuti sono stati analizzati al DLS. I risultati vengono riportati in Tabella 3.9.

Tabella 3.9 *Risultati delle misurazioni al DLS dei campioni D_01 e D_02*

Nome Campione	**Diametro [nm]**	**Polidispersità**	**Z potential [mV]**
D_01	14,96 ± 1,92	0,027	-148
D_02	21,32 ± 3,23	0,069	-154,5

Dall'analisi al DLS non si notano differenze rispetto ai casi precedenti.

Avendo confermato che il Dicamba non influenza le caratteristiche dell'idrogelo, procediamo con la produzione di idrogeli contenenti quantità di Dicamba maggiori, ovvero i campioni D_03 e D_04. La procedura con cui si sono ottenuti gli idrogeli partendo dalle soluzioni elencate in Tabella 3.8 è esposta nella sezione §2.3.1. I due campioni sono stati misurati al DLS e i risultati sono riportati in Tabella 3.10.

Tabella 3.10 *Risultati delle misurazioni al DLS dei campioni D_03 e D_04*

Nome Campione	**Diametro [nm]**	**Polidispersità**	**Z potential [mV]**
D_03	23,29 ± 0,23	0,229	-161,5
D_04	27,82 ± 4,62	0,172	-153

Anche in quest'ultimo caso non si notano gradi variazioni dalle precedenti prove.

3.3.3 Analisi spettroscopica preliminare

Per accertare il fatto che il Dicamba sia rimasto incapsulato all'interno dell'idrogelo e per assicurarsi che il segnale del Dicamba non venga coperto da altri composti presenti, si è pensato di fare alcune prove preliminari allo spettrofotometro UV/visibile. Analizzando la soluzione finale allo spettrofotometro, conoscendo il picco di assorbanza del Dicamba, si potrebbe determinare la concentrazione di Dicamba non inglobata nell'idrogelo, dato che lo spettrofotometro sarebbe in grado di vedere solo il Dicamba che non è ricoperto dall'idrogelo di alginato.

Per poter fare quest'analisi si devono però conoscere i picchi d'assorbanza del Dicamba e dell'idrogelo di alginato, per assicurarci che assorbano a lunghezze d'onda differenti. Si sono quindi analizzati allo spettrofotometro UV/Vis una soluzione di Dicamba di 3 g/L e una soluzione di alginato di sodio.

Dalla Figura 3.11, che rappresenta la curva di assorbanza del Dicamba, si può notare un evidente picco compreso in una lunghezza d'onda tra 275 e 300 nm. Ma dalla Figura 3.12 è evidente che anche l'alginato di sodio assorbe la luce per questa lunghezza d'onda. Valori inferiori allo 0,02 per l'assorbanza corrispondono al rumore di macchina.

Sarebbe quindi impossibile determinare attraverso il metodo proposto precedentemente, se il Dicamba è stato inglobato o meno all'interno del nano-idrogelo. Verrà proposto in seguito, durante lo studio del rilascio, un confronto che potrebbe confermare l'inglobamento del Dicamba da parte dell'idrogelo.

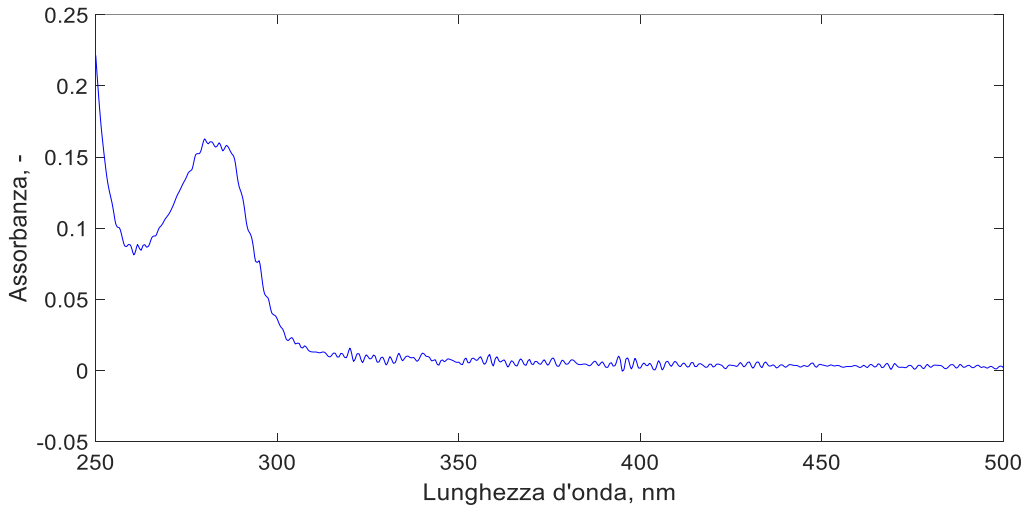

Figura 3.11 *Curva di assorbanza Dicamba*

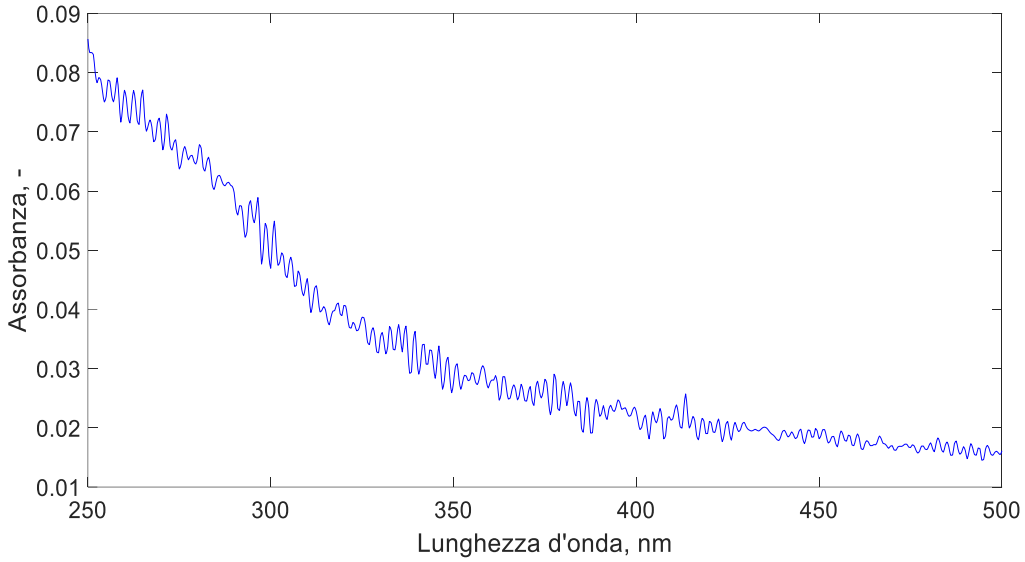

Figura 3.12 *Curva di assorbanza alginato di sodio*

In Tabella 3.4 e 3.5 si osservano più nel dettaglio i valori di assorbanza del Dicamba e dell'alginato compresi tra i 278 e 285 nm. Importante notare che il picco massimo del Dicamba è sui 280,5 nm, questa quindi sarà la lunghezza d'onda a cui si andrà a controllare l'assorbanza della soluzione ricavata dalle prove di rilascio.

Tabella 3.4 *(a sinistra) e* ***Tabella 3.5*** *(a destra) rappresentano rispettivamente I valori di assorbanza del Dicamba e dell'alginato di sodio per le varie lunghezze d'onda.*

Nm	Assorbanza
278	0,152382
278,5	0,152364
279	0,154585
279,5	0,159523
280	0,160663
280,5	0,162769
281	0,159279
281,5	0,160691
282	0,160627
282,5	0,158702
283	0,156972
283,5	0,157905
284	0,159976
284,5	0,157539
285	0,154312

nm	Assorbanza
278	0,065906
278,5	0,066042
279	0,065031
279,5	0,064572
280	0,065681
280,5	0,067843
281	0,067224
281,5	0,06404
282	0,063378
282,5	0,064901
283	0,06572
283,5	0,064118
284	0,061092
284,5	0,060275
285	0,061431

Come si nota dalla Figura 3.11 vi è anche un segnale per lunghezze d'onda inferiori ai 250 nm, tale segnale non è stato però preso in considerazione poiché per queste lunghezze d'onda l'idrossido di sodio ha un'assorbanza molto elevata, come mostra la Figura 3.13, e andrebbe a coprire un eventuale segnale del Dicamba.

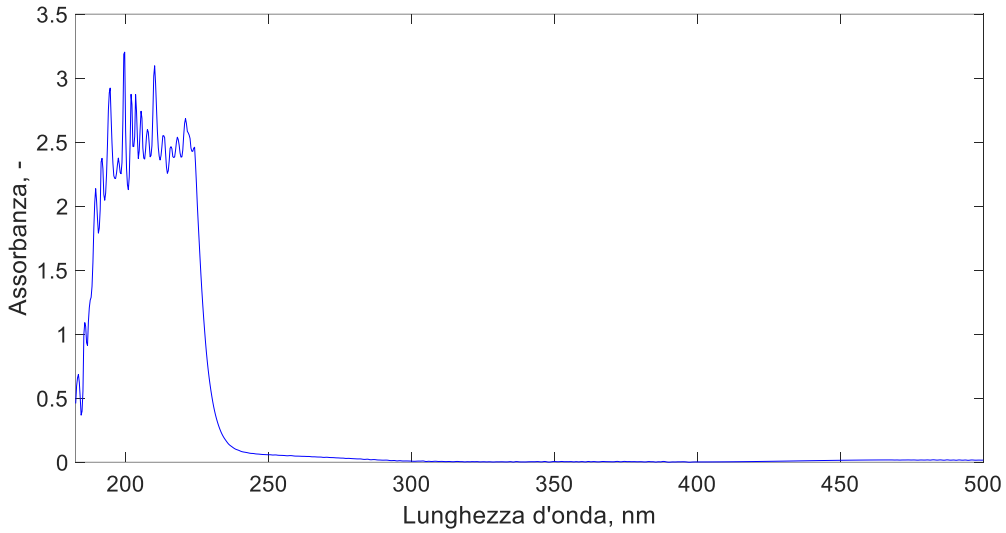

Figura 3.13 *Curva di assorbanza dell'idrossido di sodio*

3.4 Prove di rilascio

Le prove di rilascio del Dicamba dall'idrogelo sono state condotte attraverso dialisi, seguendo il procedimento illustrato nella sezione §2.6. Per accertarsi che il segnale ottenuto dalla misurazione allo spettrofotometro sia solamente relativo al Dicamba e non ad eventuale idrogelo o alginato che attraversano il sacchetto di dialisi, si è fatta una prova di rilascio preliminare in cui si è preparato un idrogelo privo di Dicamba. Come confronto è stata anche fatta una prova di rilascio del Dicamba non incapsulato nell'idrogelo, quindi semplicemente presente nella miniemulsione.

3.4.1 Prove di rilascio idrogeli in assenza di Dicamba

La prima prova di rilascio fatta, come detto nel paragrafo precedente, prevede la dialisi di un idrogelo al cui interno non è stato incapsulato alcun principio attivo. La procedura per la preparazione della prova è la medesima di quella descritta nella sezione §2.6. Si è lasciato il sacchetto di Dialisi contenente l'olio con l'idrogelo formato in acqua deionizzata per 48 h. I primi prelievi sono stati fatti a distanza di 15 minuti l'uno dall'altro, dopo la prima ora sono stati fatti ogni ora e durante il secondo giorno ogni 2 ore. Non si sono potuti fare prelievi durante la notte, quindi non vi sono misurazioni nelle ore notturne.

I campioni sono stati analizzati allo spettrofotometro usando come bianco acqua deionizzata. Dei campioni prelevati è stata analizzata solamente l'assorbanza ai 280,5 nm, poiché sarà questa la lunghezza d'onda presa in considerazione per la misurazione del rilascio di Dicamba e quindi basta accertarsi che per questa lunghezza d'onda non vi siano interferenze. Le misure di assorbanza ottenute sono abbastanza costanti nel tempo con un valore medio di 0,002882 e una deviazione standard di 0,001317. I valori per i vari campioni prelevati sono riportati in Tabella 3.6. Questi valori sono molto bassi e corrispondono all'errore di macchina, quindi si può affermare che l'idrogelo non filtra attraverso il sacchetto di Dialisi e non si avranno interferenze di segnale per il Dicamba rilasciato.

Tabella 3.6 *Misura dell'assorbanza nel tempo della prova di dialisi per l'idrogel senza Dicamba*

Tempo	**15 [min]**	**30 [min]**	**45 [min]**	**1 [h]**	**2 [h]**	**4 [h]**	**20 [h]**	**28 [h]**	**48 [h]**
Assorbanza a 280,5 nm	0,002	0,002	0,003	0,006	0,002	0,003	0,004	0,003	0,002

3.4.2 Rilascio del Dicamba dall'idrogelo

Dopo aver accertato che l'idrogelo non interferisce con la misurazione, si è proseguito il lavoro con la prova di rilascio di Dicamba incapsulato all'interno dell'idrogelo di alginato. La prova di rilascio è durata un totale di 16 giorni. Durante le prime due ore dall'inizio della prova si sono prelevati campioni ogni 15 minuti, per le seguenti due ore ogni 30 minuti e per il resto della prima giornata ogni ora. Nella seguente giornata si sono fatti prelievi ogni 2 ore, mentre i prelievi fatti in seguito sono stati fatti con minore frequenza. Anche in questo caso è stato impossibile fare prelievi durante le ore notturne.

Il Dicamba viene rilasciato poiché la membrana della Dialisi diventa idrofila e attira l'idrogelo. Una volta a contatto con la membrana l'idrogelo si gonfia e rilascia così il Dicamba attraverso la *interstitial water*. Si presume che il meccanismo di rilascio controllante sia quello diffusivo e quindi il processo può essere descritto dalla legge di Fick, come già discusso nella sezione §1.6.1.

Tutti i campioni prelevati sono stati in seguito analizzati allo spettrofotometro UV/visibile, senza alcuna diluizione, alla lunghezza d'onda 280,5 nm per ottenerne l'assorbanza e, usando la legge di Lambert Bear (3.1), la relativa concentrazione.

$$A = \varepsilon_\lambda l\, M \tag{3.1}$$

Dove A è l'assorbanza, ε_λ è detto coefficiente di assorbimento molare, l è il cammino ottico e M è la molarità. Denominiamo il prodotto tra ε_λ e l come coefficiente di correlazione tra l'assorbanza e la molarità. Tale coefficiente di correlazione si è ricavando facendo una retta di taratura a varie concentrazioni di Dicamba note e misurandone l'assorbanza. In Figura 3.14 viene rappresentata la retta di taratura con l'equazione che la descrive.

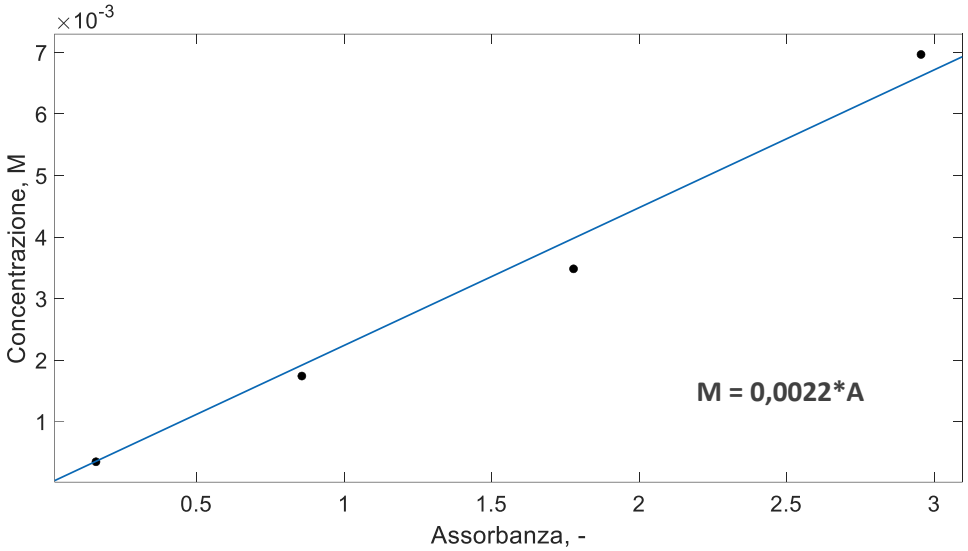

Figura 3.14 *Retta di taratura a 280,5 nm per il Dicamba*

Il coefficiente di correlazione ottenuto è quindi di 0,0022 M. Moltiplicandolo per il peso molecolare del Dicamba 221,4 g/mol, ci dà 0,486288 g/L, che è il coefficiente di correlazione tra l'assorbanza e la concentrazione di Dicamba espressa in g/L.

Per tenere conto della quantità di Dicamba rimosso da ogni prelievo si effettua il calcolo della massa cumulativa (3.2)

$$m(t) = C_t V_{BS} + V \sum_{t=0}^{t-1} C_i \qquad (3.2)$$

dove $m(t)$ è la massa ad un tempo generico, C_t la concentrazione a tale tempo, V_{BS} il volume del *buffer* (750 ml), V il volume prelevato per ogni misura (3 ml) e C_i le concentrazioni ai tempi precedenti.

Si riporta in Figura 3.15 l'andamento della percentuale di Dicamba rilasciato in funzione del tempo. La percentuale rilasciata è stata calcolata mettendo a rapporto la massa cumulativa di Dicamba rispetto alla massa totale presente nell'olio. Le barre d'errore corrispondono all'errore della macchina e sono posizionate agli orari in cui sono stati prelevati i campioni misurati.

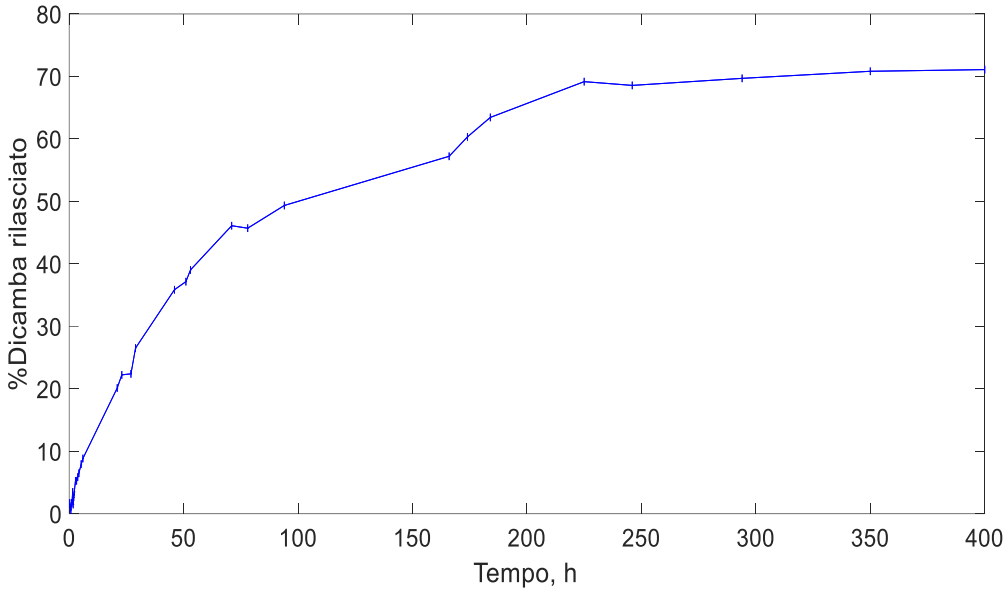

Figura 3.15 *Curva di rilascio per il Dicamba dal nano-idrogelo ottenuto utilizzando i rapporti della formulazione D_05, con Ultra Turrax a 10000 rpm per 15 minuti.*

Nelle prime due ore dall'inizio del test il segnale ottenuto è pari a quello dell'errore di macchina. Nel restante tempo delle prime 24 ore si ha un rilascio medio per ora dello 0,9% rispetto a tutto il Dicamba rilasciato. Nelle seguenti 24 ore, ovvero dalle 48 alle 72 ore, il rilascio medio per ora scende allo 0,6%, dalle 72 alle 96 ore è dello 0,2%, dalle 96 fino alle 166 ore è dello 0,15% e dalle 166 ore fino alle 250 ore, tempo in cui si raggiunge l'asintoto, si ha un rilascio medio per ora dello 0,1%. L'asintoto è raggiunto quando si ottiene un rilascio del 71,1% del totale del Dicamba presente nell'olio.

Il mancato raggiungimento del rilascio totale del Dicamba potrebbe essere dovuto alla sua foto sensitività, oppure parte del Dicamba potrebbe aver reagito con l'idrossido di sodio. Si è notato infatti che la soluzione di Dicamba e NaOH è stabile solo per cinque/sei giorni, dopo di che si vengono a formare degli aggregati in soluzione. Altra spiegazione potrebbe essere anche il raggiungimento dell'equilibrio, ovvero la concentrazione di Dicamba presente nel *buffer* ha raggiunto la concentrazione di Dicamba nell'olio e quindi il gradiente della concentrazione è zero, ottenendo così dalla legge di Fick un flusso pari a zero.

Si è deciso di paragonare l'andamento del rilascio ottenuto fino all'asintoto, ovvero 250 ore, con dei modelli cinetici, per vedere quale potrebbe approssimare meglio il caso del rilascio di Dicamba da idrogelo di alginato di sodio. I modelli cinetici presi in considerazione, con il relativo coefficiente di determinazione (R^2), sono riportati in Tabella 3.7. Il coefficiente di determinazione è una misura di quanto il modello approssimi accuratamente i valori sperimentali, ed è il quadrato della correlazione tra i valori ottenuti sperimentalmente e i valori ottenuti dal modello. R^2 può avere valori compresi tra lo 0 e 1, più si è vicini ad 1 più il modello è accurato. [28]

Tabella 3.7 Modelli matematici per l'approssimazione della curva di rilascio

Modello matematico	Equazione del modello	R^2
Cinetica ordine zero	$F = k_o t$	0,775
Cinetica primo ordine	$\ln(1 - F) = -k_f t$	0,9026
Higuchi	$F = k_H t^{1/2}$	0,9785
Hixson-Crowell	$1 - (1 - F)^{1/3} = k_{1/3} t$	0,8651
Baker-Lonsdale	$^3/_2 \left[1 - (1 - F)^{2/3}\right] - F = k_{3/2} t$	0,9887

Nelle equazioni in Tabella 3.7 si ha che F è la frazione di principio attivo rilasciato, t è il tempo e $k_o, k_f, k_H, k_{1/3}, k_{3/2}$ sono le costanti cinetiche dei vari modelli.

Il modello matematico di rilascio con cinetica di ordine zero è usato per descrivere il comportamento dei principi attivi posti direttamente nel buffer, che si rilasciano lentamente ad una velocità costante, non tenendo conto della progressiva diminuzione dell'area superficiale. In Figura 3.16 si vede la regressione lineare di questo modello rispetto ai valori sperimentali ottenuti. k_o= 0,003737 è il valore che meglio approssima i dati ottenuti dalla prova di rilascio.

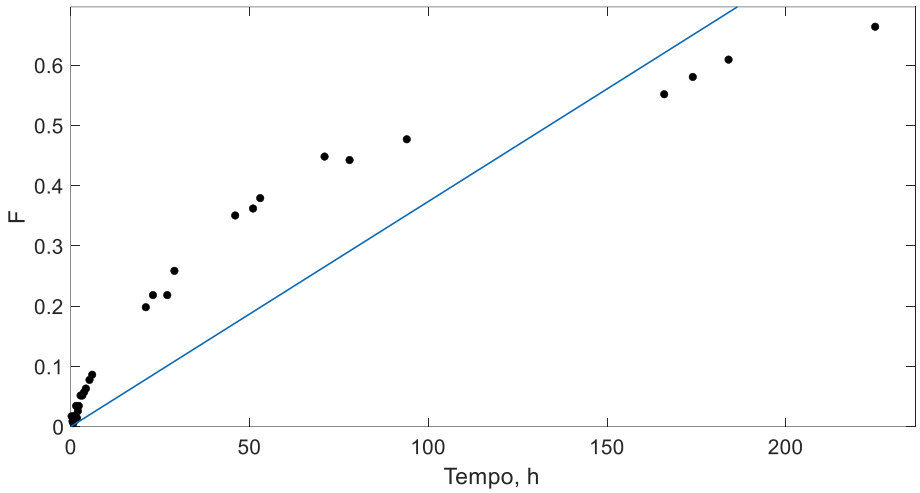

Figura 3.16 Regressione lineare del rilascio con la cinetica di ordine zero

In Figura 3.17 è rappresentata la regressione lineare del modello di rilascio con cinetica di primo ordine rispetto ai valori sperimentali ottenuti. Questo modello è usato sia per descrivere il rilascio, ma anche per descrivere processi di adsorbimento o eliminazione di alcuni principi attivi. Il k_f che meglio approssima i dati sperimentai è 0,00549.

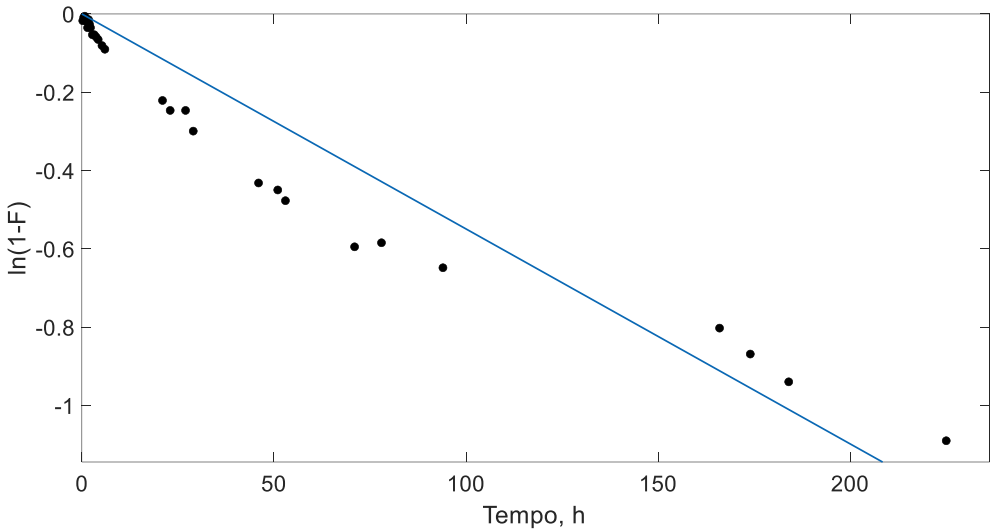

Figura 3.17 *Regressione lineare del rilascio con cinetica di primo ordine*

Il modello Higuchi viene usato per descrivere il rilascio in acqua di composti solubili e poco solubili incorporati in semi-solidi o matrici solide. Questo modello rispecchia molto il caso studiato in questo progetto di tesi, di fatto con questo modello si ottiene un coefficiente di determinazione molto prossimo ad 1 con un k_H=0,04577. La regressione lineare del modello Higucci è rappresentata in Figura 3.18.

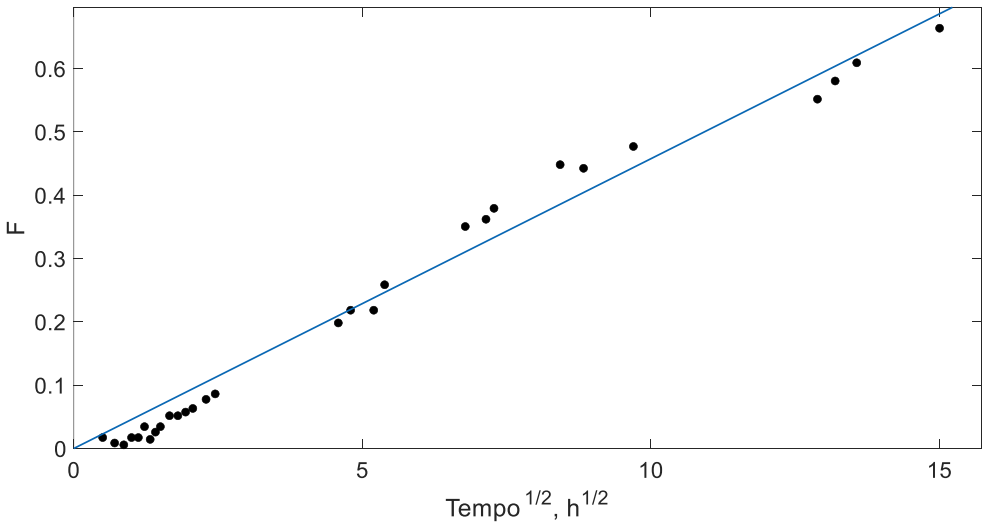

Figura 3.18 *Regressione lineare del rilascio con il modello di Higuchi*

Il modello Hixson-Crowell viene solitamente usato per descrivere il rilascio di un principio attivo che si dissolve perché direttamente immerso nel buffer, tenendo in considerazione la diminuzione della sua area superficiale. Il $k_{1/3}$ ottimale ottenuto è di 0,001597. La regressione lineare di tale modello rispetto ai valori sperimentali è rappresentata in Figura 3.19.

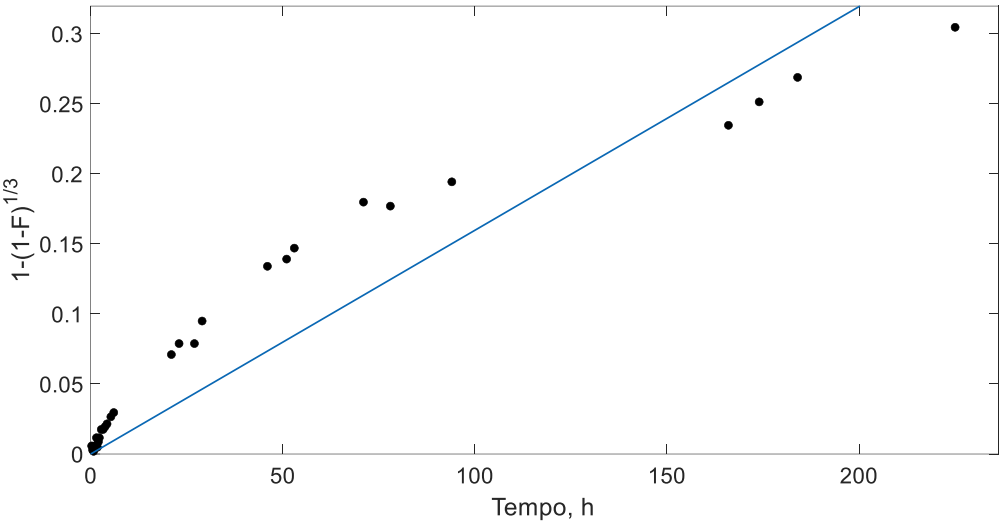

Figura 3.19 *Regressione lineare del rilascio con il modello di Hixson-Crowell*

Il modello Baker- Lonsdale deriva dal modello Higuchi e descrive il rilascio di principi attivi da matrici sferiche. Questo modello è quello che approssima meglio di tutti il nostro caso sperimentale, si ottiene infatti, con un $k_{3/2}$=0,0004785, un R^2 di 0,9887, che come si può notare dalla Tabella 3.6 è il più alto tra tutti i modelli presi in considerazione. La regressione lineare di tale modello rispetto ai valori ottenuti è rappresentata in Figura 3.20.

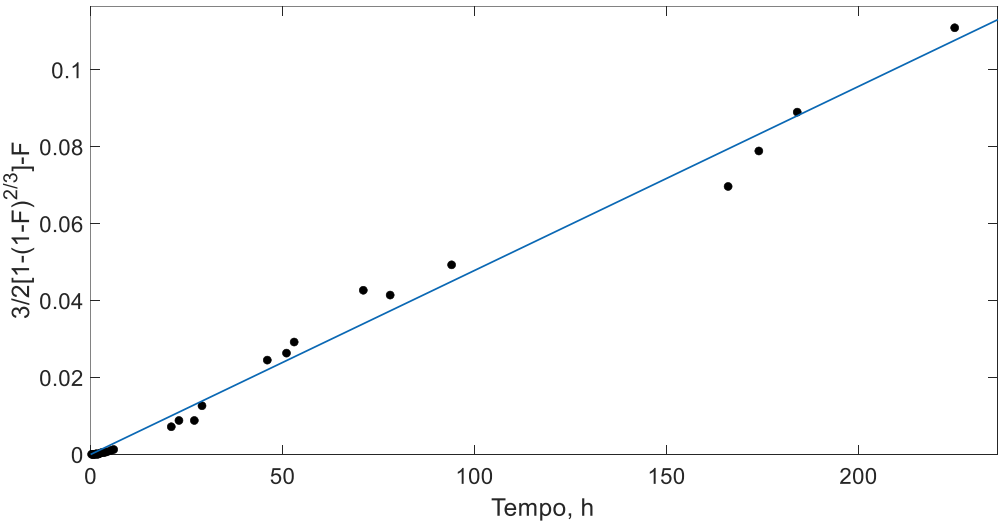

Figura 3.20 *Regressione lineare del rilascio con il modello di Baker-Lonsdale*

3.4.3 Confronto con il rilascio da miniemulsione

A scopo di confronto si è fatta un'altra prova di rilascio in cui il Dicamba però non è incapsulato nel nano-idrogelo, ma è presente direttamente nella miniemulsione. La sintesi di questo campione è stata fatta seguendo le medesime condizioni operative del campione incapsulato, in modo da avere nella miniemulsione la stessa quantità di Dicamba presente nell'idrogelo, con l'unica differenza che nelle soluzioni acquose di partenza non si è aggiunto l'alginato di sodio e il cloruro di calcio.

Anche in questo caso, prodotta la miniemulsione sono stati collocati 40 ml di olio in un sacchetto di dialisi e il sacchetto è stato immesso in 750 ml di *buffer*. La composizione del *buffer* è identica a quella usata per lo studio del rilascio del Dicamba da idrogelo.

In Figura 3.21 sono messe a confronto le curve di rilascio percentuale di Dicamba incapsulato e in miniemulsione, in funzione del tempo. Le percentuali sono state nuovamente calcolate come il rapporto tra la massa cumulativa rilasciata e la quantità totale di Dicamba presente nella miniemulsione. Le barre di errore corrispondono all'errore della macchina e sono posizionate nelle ore in cui si sono effettuati i prelievi.

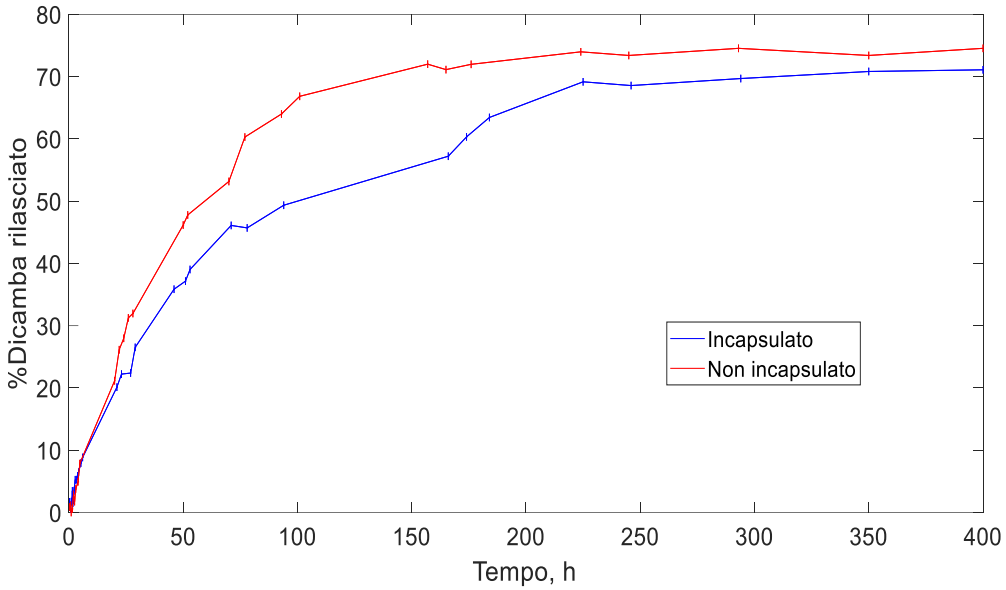

Figura 3.21 *Curva di rilascio percentuale di Dicamba nel tempo da miniemulsione*

Semplicemente osservando il tempo a cui si raggiunge l'asintoto si può affermare che nella prova in cui il Dicamba non è stato incapsulato il rilascio è molto più rapido. Si nota che nel caso del Dicamba in miniemulsione l'asintoto viene raggiunto intorno alle 120 ore, ovvero 100 ore prima del caso in cui il Dicamba è incapsulato. Questa quindi è la conferma definitiva del fatto che si è riusciti ad incapsulare il Dicamba con successo.

Andando invece ad osservare la percentuale di Dicamba totale rilasciato si è ottenuto all'asintoto un 73,1% di rilascio, valore molto simile a quello ottenuto dal Dicamba incapsulato. Ciò dimostra che la quantità totale di Dicamba rilasciata non è influenzata dal fatto che esso sia incapsulato, quindi non vi dovrebbe essere alcuna perdita di efficienza dovuta dal nano-idrogelo. I possibili motivi per cui non si è raggiunto il totale rilascio sono i medesimi del caso precedente.

4 Conclusioni

In questo progetto di tesi si è studiata la sintesi di un nano-idrogelo costituito da alginato di sodio per l'incapsulamento dell'erbicida Dicamba. Lo scopo del progetto era quello di ottenere un rilascio controllato del Dicamba, per trovare una soluzione ai problemi di contaminazione della flora e della fauna circostante ai raccolti trattati, dovuti alla sua alta volatilità. Il nano-idrogelo ha quindi lo scopo di evitare l'evaporazione di Dicamba durante l'applicazione per nebulizzazione sulle culture da bonificare.

Il metodo scelto per la sintesi del nano-idrogelo è la miniemulsione inversa, ottenuta attraverso un agitatore meccanico ad alta intensità, l'Ultra-Turrax. I primi test sperimentali sono stati fatti sullo studio dei parametri per la formazione di una miniemulsione stabile. Si è osservato l'influenza della variazione della velocità di rotazione dell'agitatore sulla grandezza della miniemulsione e la quantità di tensioattivo necessaria per ottenere una miniemulsione stabile. Il macchinario adoperato per la caratterizzazione dimensionale è stato il DLS. Si sono rivelati ottimali una velocità di rotazione di 10000 rpm e una quantità di tensioattivo (Pluronic PE 6100) pari allo 0,43% in peso rispetto alla massa di olio. Usando tali parametri operativi si è ottenuta una miniemulsione con una grandezza ≈ 25 [nm] e una polidispersità inferiore a 0,3.

Dopo aver identificato i parametri ottimali per la formazione della miniemulsione si è proceduto creando i primi campioni di idrogelo, senza all'interno alcun principio attivo. L'idrogelo si viene a formare con un cross-linking ionico grazie allo ione divalente di Ca^{2+}, che è stato ricavato dalla dissoluzione in acqua cloruro di calcio. Anche in questo caso si sono modificati alcuni parametri operativi per osservarne l'effetto sul nano-idrogelo. Sono stati fatti nuovamente dei test sull'influenza della velocità di rotazione sulla formazione del nano-idrogelo, da cui si sono ottenuti risultati simili a quelli ottenuti per la sola miniemulsione. Altro parametro modificato è stata la quantità di alginato di sodio usata per la sintesi. Da questa analisi si è visto che con quantità di alginato di sodio maggiore si ottengono nano-carrier più grandi ma anche leggermente più polidispersi.

Si è passati in fine all'incapsulamento del principio attivo e alle prove di rilascio. Facendo più prove a diverse quantità di Dicamba incapsulate, si è osservato che l'erbicida non influisce nel processo di formazione del nano-idrogelo. In seguito, sono state fatte le prove di rilascio del Dicamba attraverso dialisi. Per misurare la concentrazione del Dicamba rilasciato si è fatto uso dello Spettrofotometro UV/visibile, dopo aver fatto alcuni studi preliminari sull'assorbanza dei vari composti usati per la sintesi del nano-carrier. Dalle prove di rilascio dall'idrogelo si è ottenuto un rilascio lento, con una progressiva diminuzione della velocità ogni 24 ore e uno stop del rilasciato dopo 9 giorni, con il 71,1% del Dicamba totale rilasciato. I risultati ottenuti sono stati confrontati con diversi modelli cinetici e si è osservato che il modello Baker-Lonsdale approssima meglio di tutti i dati che si sono ricavati. In fine, la prova di rilascio svolta è stata messa a confronto con una prova di rilascio senza formazione del nano-carrier, perciò direttamente dalla miniemulsione. Per questa prova si ha avuto un rilascio decisamente più rapido e una quantità di Dicamba totale rilasciato pari

al caso con il nano-idrogelo, confermando la corretta incapsulazione del Dicamba e l'applicabilità del metodo studiato.

Si potrebbe proseguire questo studio osservando come la modifica di altri parametri possa influenzare il nano-idrogelo prodotto, ad esempio variando la quantità di cloruro di calcio usato, oppure variando il tipo di tensioattivo in modo da ottenere miniemulsioni più stabili. Uno dei principali problemi in questo studio è stata la scarsa solubilità del Dicamba. Come detto nei capitoli precedenti, aumentando il pH della soluzione si aumenta anche la solubilità dell'erbicida. In questo progetto di tesi il pH della soluzione di Dicamba è stato innalzato facendo uso dell'idrossido di sodio, ma quest'ultimo dopo un periodo di qualche giorno tende a reagire con il principio attivo creando fiocchi nella soluzione e probabilmente consumando parte dell'erbicida. Sarebbe quindi interessante andare a ricercare un'altra sostanza basica che possa risolvere il problema della solubilità del Dicamba senza però interferire con la sua attività.

Per potersi assicurare definitivamente del funzionamento di questo metodo, dovrebbe essere svolta una prova in cui si spruzza il nano-carrier, contenente l'erbicida, direttamente sulle piante e se ne confrontano gli effetti con quelli ottenuti spruzzando direttamente il Dicamba non incapsulato.

In fine, essendo l'alginato di sodio una molecola innocua alla salute umana, se ne potrebbe testare l'incapsulamento e il rilascio di altri principi attivi, quali ad esempio alcuni farmaci.

Abbreviazioni

DLS	Dinamic light scattering
EPA	Enviromental protection agency
ESD	Emulsificazione/diffusione solvente
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
O/W	Oil in water
PEG	Glicole polietilenico
PGA	Poliglicolidi
PLA	Polilactidi
PLGA	Poli L-lactide-co-glicolide
PVA	Alcool polivinilico
RESOLV	Espansione rigida di soluzioni supercritiche in solventi liquidi
RESS	Espansione rigida di soluzioni supercritiche
UV	Ultraviolet
W/O	Water in oil

Lista simboli

A	assorbanza
c	attività o concentrazione
cP	viscosità
C_A	concentrazione principio attivo
C_t	concentrazione del principio attivo ad un dato tempo
d	diametro nano-particelle
D	coefficiente di diffusione
F	frazione di principio attivo rilasciato
J_A	flusso della molecola di principio attivo
k_f	costante del modello di primo ordine
k_H	costante del modello di Higuchi
k_o	costante del modello di ordine zero
$k_{1/3}$	costante del modello di Hixson-Crowell
$k_{3/2}$	costante del modello di Baker-Lonsdale
l	cammino ottico
$m(t)$	massa ad un tempo generico
mV	millivolt
M	molarità
M_t	numero di molecole rilasciate al tempo t
M_∞	quantità finale di molecole rilasciate
Q	l'inverso della quantità di liquido che può essere assorbita dall'idrogelo
$\bar{r}_o$	distanza media tra due cross-link adiacenti di un idrogelo
rpm	giri al minuto
R	costante universale dei gas
R^2	coefficiente di determinazione
T	temperatura assoluta
$v_{2,s}$	quantità di liquido che può essere assorbita nell'idrogelo

V_{BS}	volume del *buffer*
t	tempo
γ	tensione interfacciale
Γ	eccesso di superficie
ε_{λ}	coefficiente di assorbimento molare
ξ	mesh size

Bibliografia

[1] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, 2010. "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **75**, 1, 1-18.

[2] B. V. N. Nagavarma, H. K. S. Yadav, A. Ayaz, L. S. Vasudha, and H. G. Shivakumar, 2012. "Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **5**, 3, 16-23.

[3] S. Kumar, G. Bhanjana, A. Sharma, M. C. Sidhu, and N. Dilbaghi, 2014 ."Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles," *Carbohydr. Polym.*, **5**, 1, 113-142.

[4] B. Jeong and A. Gutowska, 2002. "Lessons from nature: Stimuli-responsive polymers and their biomedical applications," *Trends in Biotechnology*, **20**, 1, 305-311.

[5] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, and H. M. Akil, 2015. "Classification, processing and application of hydrogels: A review," *Materials Science and Engineering C*, **57**, 3, 414-433.

[6] M. Hamidi, K. Rostamizadeh, and M. A. Shahbazi, 2012."Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery," in *Intelligent Nanomaterials: Processes, Properties, and Applications*, **60**, 1, 1638-1649.

[7] A. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu, and S. Kankane, 2008. "Responsive polymers in controlled drug delivery," *Progress in Polymer Science (Oxford)*. **33**, 1, 1088-1118.

[8] R. Deshmukh, P. Wagh, and J. Naik, 2016."Solvent evaporation and spray drying technique for micro- and nanospheres/particles preparation: A review," *Drying Technology*, **34**, 1, 887-913.

[9] J. P. Rao and K. E. Geckeler, 2011."Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters," *Progress in Polymer Science (Oxford)*, **36**, 1, 887-913.

[10] M. Mahalingam and K. Krishnamoorthy, 2015. "Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: Multi-criteria decision making approach," *Adv. Pharm. Bull.*, **12**, 1, 57-67.

[11] M. Mirzataheria, A. H. Mahtabanib, and M. Lotfalieic, 2014. "Emulsion Polymerization and Encapsulation of Micro and Nanoparticles within Polymer Droplets," *Jordan J. Chem.*, **9**, 4, 229-266.

[12] Y. Deng, L. Wang, W. Yang, S. Fu, and A. Elaïssari, 2003. "Preparation of magnetic polymeric particles via inverse microemulsion polymerization process," *J. Magn. Magn. Mater.*, **257**, 1, 69-78.

[13] M. Bazzano *et al.*, 2016. "Synthesis of polymeric nanocapsules by radical UV-activated interface-emulsion polymerization," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **54**, 20, 3357-3369.

[14] S. Gross, 2011. "Miniemulsioni come nanoreattori per la chimica organica," *Chimica & Tecnologia*.

[15] Jim W. Goodwin, 2004. "Colloids and interfaces with surfactants and polymers--an introduction," *Choice Rev. Online*, **251**, 1, 53-58.

[16] I. Capek, “On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers,” *Advances in Colloid and Interface Science*. 2010.

[17] I. Capek, 2010.“On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers,” *Advances in Colloid and Interface Science*, **156**, 1, 35-61.

[18] M. Antonietti and K. Landfester, 2002. “Polyreactions in miniemulsions,” *Progress in Polymer Science (Oxford)*, **22**, 1, 896-936.

[19] S. Raut, S. S. Bhadoriya, V. Uplanchiwar, V. Mishra, A. Gahane, and S. K. Jain, 2012.“Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging,” *Acta Pharm. Sin. B*, **2**, 1, 8-15.

[20] R. Parhi, 2017. “Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: A review,” *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **7**, 4, 515-530.

[21] R. Russo, M. Malinconico, and G. Santagata, 2007. “Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films,” *Biomacromolecules*, **8**,1, 3193-3197.

[22] A. H. E. MacHado *et al.*, 2012. “Preparation of calcium alginate nanoparticles using water-in-oil (W/O) nanoemulsions,” *Langmuir*, **28**, 9, 4131-4141.

[23] C. C. Lin and A. T. Metters, 2006. “Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**, 1, 1379-1408.

[24] T. Canal and N. A. Peppas, 1989. “Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks,” *J. Biomed. Mater. Res.*, pp. 1183-1193.

[25] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, 2000. “Hydrogels in pharmaceutical formulations,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 1, 27-46.

[26] A. P. Appleby e F. Muller, 2011. “Weed Control,” Ullmann's Encyclopedi of Industrial Chemistry, Wiley-VCH.

[27] V. Gigante e R. Pisano, 2018. “*Produzione di nanoparticelle polimeriche per il rilascio controllato di caffeina per via transdermica*, ” Politecnico di Torino, Torino.

[28] P. Costa and J. M. Sousa Lobo, 2001. “Modeling and comparison of dissolution profiles,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **13**, 1, 123-133.

[29] C. R. Maruyama *et al.*, 2016. “Nanoparticles Based on Chitosan as Carriers for the Combined Herbicides Imazapic and Imazapyr,” *Sci. Rep.* 6:23854. doi: 10.1038/srep23854.

Ringraziamenti

Si giunge dunque alla parte più attesa della Tesi, la fine. Questa ultima pagina non rappresenta solamente la conclusione di un progetto di studio sperimentale, ma bensì la conclusione di un enorme capitolo della mia vita, poiché insieme a questo progetto si conclude qui anche la mia carriera da studente e inizia (si spera) una prosperosa carriera, da qualsiasi cosa finirò per fare nella vita. Il percorso alle mie spalle non è stato di sicuro uno semplice e senza intoppi, tutt'altro, è stato colmo di sconfitte, notti insonni, disperazione e il costante pensiero:" ma chi me l'ha fatto fare?". Tuttavia, questo percorso non l'ho affrontato da solo, ma ho avuto al mio fianco parenti e amici, che non solo mi hanno aiutato nel superare i più bui momenti della vita di un Politecnichiano attraversandoli insieme a me, ma hanno anche creato, nel mezzo di queste tenebre, molteplici ricordi luminosi, positivi ed indelebili. Ecco perché questo ultimo capitolo va a loro.

Il primo ringraziamento, ovviamente, va ai miei genitori, che hanno fatto in modo che io non abbia mai avuto la necessità di lavorare per un attimo della mia vita, per potermi concentrare pienamente sugli studi e senza mai farmi mancare nulla. Mia madre, previdente e sempre preparata e mio padre, più pacato e distratto, ma non per questo meno pedante. Senza di loro non sarei qui, ma probabilmente mi ritroverei a vendere arance a Giardina o a fare il cameriere a Joppolo.

Il secondo va ai miei amici e colleghi, con i quali ho attraversato a braccetto questo turbine di sessioni e nottate passate sui libri. Gruppi studio a casa di Leo, appunti scambiati con Alessio, difficilissimi concetti teorici di chi sa quale processo fluidodinamico compresi aiutandoci a vicenda. Senza tutto questo penso che sarei ancora al secondo anno, provando per l'ennesima volta a passare l'esame della Bongiovanni. Ma in questi anni non ho trascorso solo questo con loro, ci sono state anche feste, viaggi, kebbab, notti in bianco e storie (tra cui alcune anche non totalmente vere) che porterò con me per il resto della mia vita, ed è per questo soprattutto che vi ringrazio.

Un ultimo ringraziamento, ma non meno importante, va ai miei professori (non proprio tutti però) e ad alcuni dottorandi, che mi hanno seguito sia nel mio percorso didattico, che in questi mesi di lavoro sulla Tesi. Un ringraziamento particolare va al mio relatore, Roberto Pisano, il quale è stato sempre paziente e disponibile, mi ha sempre seguito attentamente ed è sempre stato comprensivo, anche quando ho rotto qualche apparecchiatura. Infine, vorrei ringraziare i dottorandi Luca Spigarelli, Fiora Artusio, Andrea Arsiccio e la stagista Monica Granetto. In questi mesi di lavoro sulla tesi sono sempre riusciti a darmi una mano quando ho chiesto a loro aiuto.

Ringraziamenti speciali: i miei nonni, la Raffy Paffy (che si è dovuta sorbire qualche lunga ripetizione sul come fare il vino o qualche cosa sui reattori biologico) e la famiglia Termini.

Grazie per aver creduto in me.