



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

# Corso di Laurea magistrale in Scienze Chimiche per la Conservazione e il Restauro

Tesi di Laurea

—

Ca' Foscari  
Dorsoduro 3246  
30123 Venezia

# Sintesi e caratterizzazione di nanocapsule di silice per incorporare sistemi biocidi

## **Relatrice**

Prof.ssa Elisabetta Zendri

## **Correlatrice**

Dott.ssa Laura Crociani

## **Laureanda**

Ludovica Ruggiero

Matricola 850806

## **Anno Accademico**

**2014 / 2015**

# INDICE

OBIETTIVO DELLA RICERCA	1
CAPITOLO I - INTRODUZIONE	
I.1 BIOFOULING NEI BENI CULTURALI	2
I.2 COATING FUNZIONALI CON PROPRIETA' BIOCIDIE	6
I.2.1 BIOCIDI IN USO	8
I.2.2 IL BENZOATO DI SODIO	11
I.2.3 NATURAL PRODUCTS ANTIFOULANTS (NPAS): LO ZOSTERATO DI SODIO	12
I.3 USO DELLE NANOCAPSULE PER IL RILASCIO CONTROLLATO	14
I.3.1 PREPARAZIONE DELLE NANOCAPSULE: IL METODO SOL-GEL	16
BIBLIOGRAFIA	22
CAPITOLO II - PARTE SPERIMENTALE	
II.1 MATERIALI	25
II.2 SINTESI DELLE NANOPARTICELLE DI SILICE	26
II.3 INCAPSULAMENTO DELLO ZOSTERATO DI SODIO	26
II.4 INCAPSULAMENTO DEL BENZOATO DI SODIO	27
II.5 SINTESI DELL'ESTERE METILICO DELLO ZOSTERATO SODIO E INCAPSULAMENTO	28
II.6 CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE	29
II.7 STUDIO DEL RILASCIO DEI BIOCIDI DALLE NANOPARTICELLE	30
BIBLIOGRAFIA	31

## CAPITOLO III- RISULTATI E DISCUSSIONI

III.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA DELLE NANOPARTICELLE VUOTE	32
III.2 INCAPSULAMENTO DELLO ZOSTERATO DI SODIO E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA	37
III.3 INCAPSULAMENTO DEL BENZOATO DI SODIO E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA	39
III.4 INCAPSULAMENTO DELL'ESTERE METILICO DELLO ZOSTERATO E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA	40
III.4.1 ANALISI <sup>1</sup> H-NMR	42
III.5 VALUTAZIONE DELL'INCAPSULAMENTO DEI BIOCIDI	43
III.5.1 ANALISI IR	43
III.5.2 ANALISI TERMOGRAVIMETRICHE	47
III.5.3 PROVE DI RILASCIO	51
BIBLIOGRAFIA	59
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	60
RINGRAZIAMENTI	63

## OBIETTIVO DELLA TESI

L'obiettivo di questa tesi è stato la sintesi e la caratterizzazione di nanoparticelle di silice contenenti biocidi per l'ottenimento di coating, con proprietà biocida a rilascio controllato, da utilizzare nel settore della conservazione delle superfici architettoniche.

Nell'ultima decade molti agenti biocidi sono stati gradualmente proibiti per la loro tossicità; perciò questo progetto di tesi si propone di mettere a punto una strategia di incapsulamento/incorporamento per lo zosterato sodico, un biocida di origine naturale non commerciale, a confronto con il benzoato sodico, biocida commerciale. E' stata seguita una procedura di sintesi ad un solo step denominata dynamic self-assembly (DSA).

Le nanoparticelle così ottenute sono state caratterizzate morfologicamente attraverso analisi di microscopia a scansione elettronica, mentre la verifica dell'incapsulamento è stata condotta con analisi di spettroscopia IR in modalità ATR e con analisi termogravimetriche. In una seconda fase si è scelto di migliorare la lipofilità della molecola di zosterato sodico ottimizzando una procedura di esterificazione. L'estere dello zosterato è stato incapsulato con il metodo DSA. In progetti futuri si auspica di incorporare le nanocapsule contenenti lo zosterato in coating commerciali per testarne le proprietà biocide in campo.

## CAPITOLO I-INTRODUZIONE

### I.1 IL BIOFOULING NEI BENI CULTURALI

Secondo Hueck, il biodeterioramento può essere definito come *"qualsiasi cambiamento indesiderabile nelle proprietà di un materiale causato dalle attività vitali degli organismi"* [1]. Il patrimonio culturale è soggetto alla colonizzazione biologica detta anche "biofouling", osservata su tutti i tipi di materiali (pietra, metallo, vetro, carta, vernici, ecc.) e coinvolge molti organismi (batteri, funghi, alghe, cianobatteri, muschi, felci e piante superiori) [2].

Il fattore principale che determina la crescita di biodeteriogeni sui materiali da costruzione è l'umidità. Superfici umide, infatti, sono prontamente colonizzate da microorganismi presenti nell'aria con formazione di sistemi complessi: i biofilm. In ambienti tropicali o in altre aree a elevata umidità, come ambienti ipogei, la formazione di biofilm è estremamente rapida. Così il modo migliore per ridurre i rischi è quello di adottare una politica conservativa di controllo microclimatico, mantenendo bassa l'umidità ed evitando sbalzi di temperatura con conseguente formazione di condensa; tuttavia, questa pratica è impossibile da applicare su superfici esterne [3].

I microrganismi fotosintetici come alghe e cianobatteri sono considerati pionieri nel processo di colonizzazione, in particolare nel caso di materiali lapidei esposti a condizioni ambientali favorevoli al loro sviluppo (presenza di luce naturale o artificiale e umidità) (Figura 1). La gamma di eventi atmosferici e le condizioni in cui vengono esposte le superfici sono fondamentali nel determinare la crescita di successive generazioni di microrganismi che può essere rallentata, arrestata o arretrata a uno stato più primitivo [4].



Figura 1 Colonizzazione biologica su differenti tipi di materiali lapidei: a) statue di marmo colonizzate da muschi e licheni, b) differenti facciate di edifici con colonizzazione algale; c) biofilm di alghe e cianobatteri su parete in calcare.

Oltre all'acclimatazione metabolica, le alghe sviluppano strategie di colonizzazione per migliorare le loro performance di crescita e protezione. L'organizzazione di alghe in biofilm e la strategia di colonizzazione endolitica (penetrazione dei microrganismi all'interno del supporto, attraverso fessure e porosità) sono meccanismi che favoriscono il successo ecologico di proliferazione delle alghe su superfici lapidee outdoor. Le facciate dei monumenti sono ad esempio un habitat favorevole per la crescita di microrganismi fotosintetici, i quali sono in grado di implementare le strategie di colonizzazione e i meccanismi di protezione per

contrastare lo stress ambientale [5]. Si raggruppano in comunità multi-specie (alghe, cianobatteri, batteri e talvolta funghi filamentosi) e formano una struttura complessa chiamata, come già anticipato, "biofilm", la cui formazione può essere divisa in cinque fasi principali:

- 1) grip o fissaggio dei primi colonizzatori al substrato-superficie, attraverso interazioni deboli di tipo elettrostatico, idrofobico o di Van der Waals
- 2) attaccamento irreversibile e adesione cellula-cellula dovuta alla produzione di un "legante" (molecole proteiche)
- 3) fase di maturazione e crescita cellulare
- 4) produzione di matrice extracellulare (sostanze extracellulari polimeriche, EPS: polisaccaridi, lipopolisaccaridi, proteine, glicoproteine, lipidi, glicolipidi, acidi grassi, ed enzimi). Questa matrice promuove l'adesione e la coesione delle cellule, nonché una migliore concentrazione e la circolazione delle sostanze nutritive all'interno del biofilm. Permette anche ritenzione idrica, al fine di combattere fenomeni di essiccazione e gioca un importante ruolo protettivo contro lo stress ambientale da esposizione UV nonché a metalli pesanti e ad altri inquinanti
- 5) fase di dispersione di alcune cellule con conseguente colonizzazione di nuove superfici [6].

La presenza di alghe e cianobatteri nei biofilm è particolarmente importante perché le prime fissano CO<sub>2</sub>, mentre i cianobatteri fissano l'azoto atmosferico. Oltre ad offrire un grande vantaggio rispetto agli organismi eterotrofi nel colonizzare nuove aree, le alghe e i cianobatteri, attraverso la loro attività metabolica e la produzione di detriti cellulari generano uno strato superficiale ricco di sostanze nutritive che induce la crescita e lo sviluppo di organismi eterotrofi come batteri e funghi [7].

Per comprendere il diverso processo di biodeterioramento e le implicazioni in termini di conservazione del patrimonio culturale, è importante sapere che i microrganismi utilizzano il materiale sia come fonte nutritiva (caso di organismi eterotrofi, batteri, e funghi) o solo come supporto fisico per il loro sviluppo (caso di organismi autotrofi, alghe e cianobatteri) [2].

In generale il biodeterioramento produce delle trasformazioni del supporto che possono essere di tipo estetico, fisico e chimico (Figura 2).

Innanzitutto, la presenza di alghe causerà un cambiamento nell'aspetto e nel colore di una superficie che apparirà "sporca" con una conseguente perdita di valore di punto di vista estetico. Le variazioni di colore sono dovute principalmente alla presenza di pigmenti naturali nelle cellule. Le alghe, infatti, sono ricche di clorofilla (A e B) e carotenoidi che danno un aspetto verdastro e nerastro alla superficie; le alghe rosse (*Rhodophyta*) contengono ficoeritrina dalla colorazione rossastra. Inoltre, quando le alghe sono raggruppate in biofilm, la presenza di EPS favorirà l'accumulo di inquinanti atmosferici (composti azotati e idrocarburi) e di particolato. Così la contaminazione microbica agisce come un precursore nella formazione di dannose croste sulle superfici con conseguente erosione (bioerosione) della struttura del materiale.

Il biodeterioramento fisico include tutti i meccanismi fisici che provocano la perdita di coesione, rottura o disintegrazione del substrato attraverso pressione meccanica dovuta alla crescita dei microrganismi. Uno degli esempi più eclatanti è la penetrazione dei filamenti di specie endolitiche (alghie e cianobatteri filamentosi) entro le fessure del substrato. L'assorbimento d'acqua e la crescita delle cellule esercitano una pressione sulla struttura del substrato stesso provocando la cosiddetta scagliatura degli strati superficiali del materiale [1].

Il biodeterioramento chimico è legato principalmente all'attività metabolica dei microrganismi ed è conosciuto come "biocorrosione", un processo dovuto alla produzione di acidi da parte dei microrganismi stessi. Le alghie producono e rilasciano acidi organici (ossalico, citrico, fumarico, malico, formico, ecc) particolarmente nocivi per i supporti calcarei [8]. Un altro fenomeno di biocorrosione è dovuto alla respirazione dei microrganismi. La  $CO_2$  rilasciata reagisce con acqua per formare acido carbonico che agisce sulla matrice carbonatica, produce bicarbonato di calcio che poi ritorna nella forma di carbonato (reazione reversibile), ma slegato dalla struttura di origine e facilmente dilavabile [9].

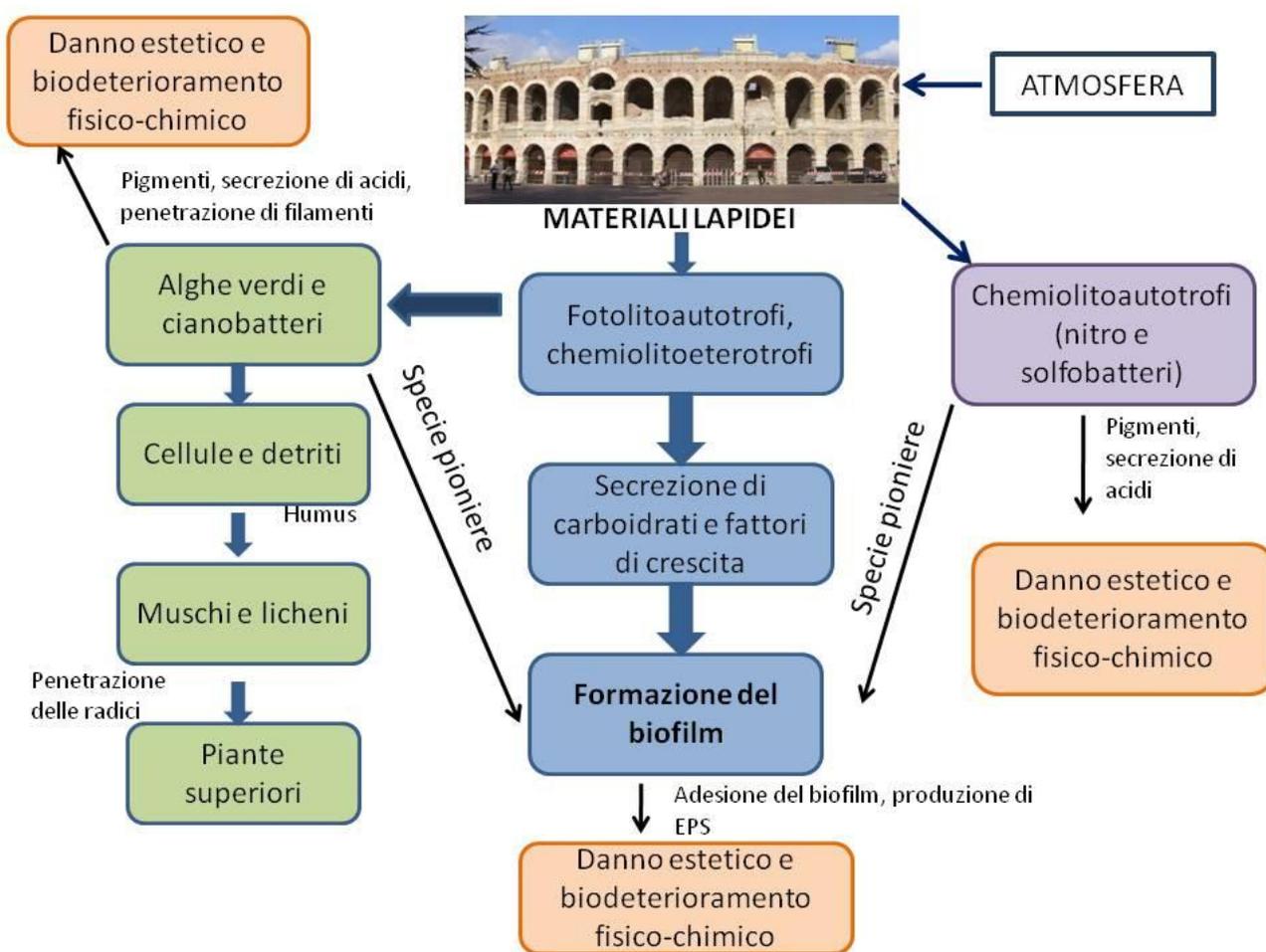


Figura 2 Il processo di colonizzazione di una superficie inizia con gli organismi autotrofi come alghie, cianobatteri, muschi e questi sono seguiti da organismi eterotrofi. Associati ai fototrofi si trovano anche batteri chemiolitoautotrofi che, rilasciando acidi come acido nitrico o acido solforico, cambiano il pH locale peggiorando lo stato conservativo della superficie. I batteri chemoorganotrofici e funghi possono rilasciare composti organici chelanti [5].

L'attività microbica provoca danni di natura diversa a secondo del tipo di materiale scelto come substrato di crescita; in tabella 1 vengono riassunti i principali danni causati da attività microbica sui materiali più predisposti [3].

**Tabella 1** Attività microbica nel deterioramento dei materiali da costruzione

<b>ATTIVITÀ MICROBICA</b>	<b>DANNI CAUSATI</b>	<b>MATERIALI</b>
Crescita sulla superficie	Scolorimento Ritenzione idrica	Piastrelle in ceramica, pietra, calcestruzzo, mattoni, gesso, legno, plastica, vernici, tegole
Crescita microbica	Aumento della permeabilità Danni fisici alla superficie	Pietra, legno, gesso, superfici dipinte, plastica
Produzione di acido	Corrosione Erosione	Metallo, cemento, pietra
Enzimi idrolitici	Aumento della fragilità Erosione	Legno e dipinti
Chelazione	Corrosione	Metalli, cemento, pietra, vetro
Produzione di H <sub>2</sub> S	Corrosione	Metalli
Sviluppo/attività disomogenei	Corrosione dovuta alla concentrazione delle cellule	Superfici dipinte, plastiche e metallo

## I.2 COATING FUNZIONALI CON PROPRIETA' BIOCIDIE

I rivestimenti (coating), come pitture, vernici o lacche, sono applicati principalmente su superfici per scopo decorativo, protettivo o funzionale, e nella maggior parte dei casi si tratta di una combinazione di questi. Il termine "rivestimenti funzionali" descrive sistemi che possiedono, oltre alle proprietà classiche di un rivestimento (cioè decorazione e protezione), una funzionalità aggiuntiva. Queste ulteriori funzionalità possono essere diverse e dipendono dal ruolo effettivo del rivestimento sul substrato. Tipici esempi di rivestimenti funzionali sono gli autopulenti, gli antigraffiti, gli antivegetativi e gli antibatterici [10]. A parte le loro proprietà speciali, i rivestimenti funzionali devono soddisfare i seguenti requisiti:

- durabilità
- facilità di applicazione
- compatibilità con la morfologia superficiale
- rispetto dell'ambiente.

Tra i rivestimenti funzionali quelli con proprietà antivegetative/antimicrobiche sono probabilmente i più diffusi perché il biofouling è un problema enorme in molte applicazioni industriali e nel settore dell'edilizia civile. Gli esempi forse più importanti sono il biofouling sugli scafi delle navi e sulle murature esterne. Per quanto riguarda le pareti esterne come ad esempio le facciate degli edifici, il biofouling causa scolorimento e potenziali danni al substrato. Il problema di solito viene affrontato con l'uso di rivestimenti funzionali, basati sull'incorporamento dell'agente vegetativo direttamente nella formulazione. Tuttavia, il limite principale di questi sistemi tradizionali è lo scarso controllo sul rilascio dei biocidi, nonché la degradazione del rivestimento stesso. I rivestimenti organici possono essere essi stessi suscettibili di attacco microbico: le proprietà del rivestimento, la sua composizione, la presenza di nutrienti sulla superficie e la natura dei substrati rappresentano i parametri principali che determinano i tipi di microrganismi in grado di colonizzare il coating [11].

Il rilascio troppo veloce del biocida si traduce in una perdita della funzione antivegetativa del rivestimento prima del tempo previsto. I tempi di vita desiderati per i rivestimenti di facciata sono di almeno due anni e ottenere profili di rilascio che coprano tempi così lunghi è un compito molto impegnativo. L'azione biocida, infatti, termina molto prima del tempo di vita del rivestimento, a causa del rilascio prematuro o della degradazione della sostanza attiva. La maggior parte dei biocidi sono piccole molecole e quindi soggette a veloce auto-diffusione nella matrice del rivestimento. Un tentativo per raggiungere i tempi di vita richiesti è quello di utilizzare elevate quantità di biocidi nel rivestimento, ma questo si rivela essere non accettabile in termini economici, ambientali e/o legali. L'utilizzo di una quantità eccessiva di biocida, oltre ad essere potenzialmente inquinante per l'ambiente, può portare a problemi tecnici, come ad esempio una separazione in fase macroscopica nella pellicola della vernice se il biocida è incompatibile con il sistema solvente-legante utilizzato. Questa problematica si verifica per la

maggior parte dei biocidi ad eccezione dei biocidi che sono presenti nel rivestimento come pigmenti inorganici<sup>1</sup> (cristalli) come nel caso del CuO o Cu<sub>2</sub>O.

L'incapsulamento dei biocidi in microcapsule/nanocapsule è un promettente approccio che può superare alcuni dei problemi associati ai metodi tradizionali che incorporano l'agente vegetativo nella formulazione stessa del rivestimento [11]. Questa procedura comporta l'incapsulamento del biocida in serbatoi miniaturizzati chiamati microcapsule o particelle core-shell (Figura 3).

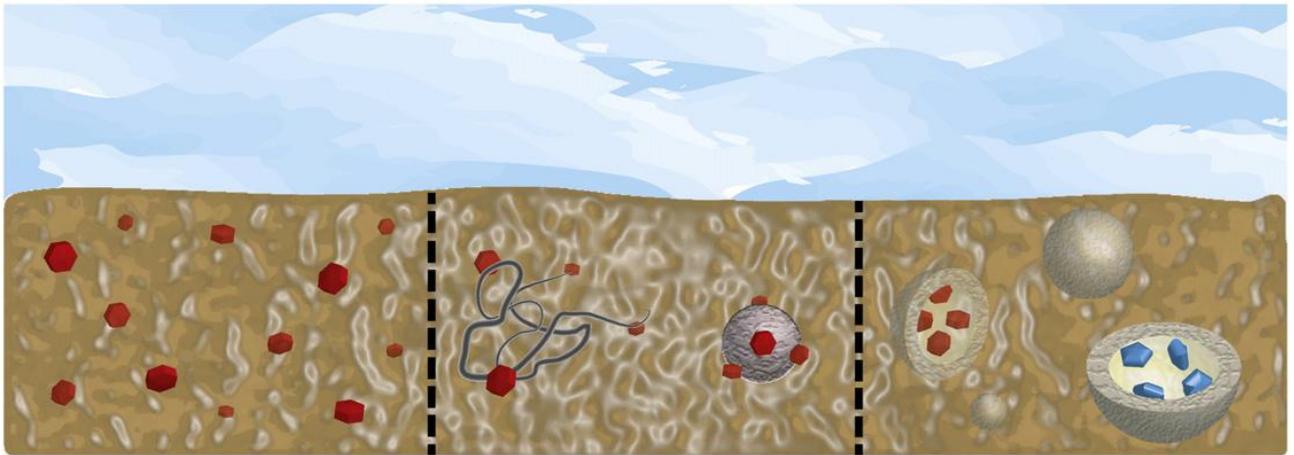


Figura 3 Un biocida può essere introdotto nella formulazione della vernice nella fase di preparazione della dispersione (a sinistra); oppure si usa il biocida come legante (vernici SPC) o lo si aggiunge come pigmento (centrale); oppure si opta per l'incapsulamento (a destra) [11].

<sup>1</sup> Questi biocidi vengono rilasciati molto lentamente; tuttavia, il profilo di rilascio è influenzato significativamente dalla natura della vernice e dal metodo di applicazione.

### I.2.1 BIOCIDI IN USO

I requisiti richiesti affinché un composto sia considerato un valido biocida sono:

- a) azione mirata a una gamma definita di microrganismi
- b) compatibilità chimica con i materiali da proteggere
- c) tossicologia del biocida
- d) costo del prodotto
- e) costi limitati per lo smaltimento sicuro.

Fattori che normalmente incrementano l'efficacia di un trattamento biocida sono le concentrazioni impiegate, la durata dell'applicazione, la stabilità del prodotto e il range di temperatura ambientale in cui si manifesta l'azione. L'efficacia del biocida dipende dal tipo di substrato, nello specifico dal suo contenuto d'acqua, ma anche dall'intensità luminosa e dagli agenti atmosferici cui è normalmente soggetta la superficie [12].

Durante le operazioni di ripristino di elementi architettonici in materiale lapideo naturale o artificiale (ricostruzione o di sostituzione parti danneggiate<sup>2</sup>), i conservatori applicano spesso dei prodotti idrorepellenti che, limitando la bagnabilità del substrato, limitano anche la biorecettività del supporto e quindi la crescita biologica [13]. Un altro metodo consiste nell'applicare direttamente dei biocidi (alghicidi, fungicidi, ecc) sul materiale.

Indipendentemente dall'efficacia, questi prodotti possono essere dannosi sia per l'ambiente che per la superficie trattata. I candeggianti per esempio, contenenti sodio ipoclorito, sono stati spesso utilizzati per rimuovere le alghe da superfici lapidee. Tuttavia, questo tipo di prodotti può reagire con le pietre, in particolare se calcaree e provocare la dissoluzione della matrice minerale [14]. I biocidi applicati in forma liquida sono inoltre facilmente dilavabili, si disperdono nell'ambiente e inducono inquinamento degli ecosistemi acquatici e terrestri.

Nel febbraio 1998, una Direttiva Europea (Direttiva Europea biocidi 1998/8 / CE) ha regolato l'uso e la presenza sul mercato dei biocidi [1]. La direttiva europea divide i biocidi in quattro gruppi principali (disinfestanti e biocidi in generale, conservanti, controllo degli animali nocivi, altri biocidi) e in 23 tipi di prodotti (*Product Type o PT*) secondo la categoria di applicazione: tra questi ci sono i biocidi per l'igiene umana e veterinaria, preservanti, conservanti alimentari, insetticidi, insetto repellenti [15].

In commercio è disponibile un'ampia varietà di biocidi organici e inorganici, che agiscono attraverso differenti meccanismi. Una distinzione deve essere fatta tra i biocidi che danneggiano le componenti cellulari o inibiscono solo una specifica attività metabolica (parete cellulare, acidi nucleici, enzimi legati alla membrana, reazioni nel citoplasma, meccanismi di trasporto, ecc) [2]. In passato, sono stati utilizzati comunemente come agenti antivegetativi

---

<sup>2</sup> Operazioni molto comuni sui monumenti storici e opere d'arte

composti organometallici, come l'ossido di stagno tributile, (TBTO). Questi biocidi erano molto efficaci nel prevenire le incrostazioni, ma si è scoperto che erano molto dannosi per gli ecosistemi locali. Nell'allegato I della direttiva G.U. L. 216/2007 sono state messe al bando molte sostanze chimiche diffuse nel trattamento del biodeterioramento delle superfici come il naftenato di tributil-stagno, il tetraborato di sodio, i derivati dell'arsenico, il Diuron e la formaldeide.

La tabella 2 elenca i principali biocidi utilizzati per combattere la proliferazione di alghe e cianobatteri. Questi biocidi possono essere utilizzati in varie forme (spray, impacchi immersione, spazzolatura, ecc), e agire su organismi in diversi modi. Alcuni, come gli ipocloriti, sono agenti ossidanti; altri agiscono come disinfettanti, come nel caso dei sali di ammonio quaternario.

*Tabella 2 Biocidi comunemente utilizzati, in rosso i prodotti vietati con l'approvazione della direttiva G.U. L. 216/2007 [2]*

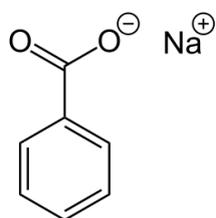
CLASSIFICAZIONE CHIMICA	COMPOSIZIONE CHIMICA	NOME COMMERCIALE
Composti inorganici	Ipoclorito di sodio e potassio	Candeggina
	Perossido di idrogeno	Acqua ossigenata
	Ottoborato di sodio	Polybar
Derivati fenolici	Composti fenolici e clorurati	Panacide, Halophane, Thaltox C
Composti nitroorganici	Diuron	<b>Diuron</b>
Sali di ammonio quaternario	Alkyl-benzyl-dimethyl-ammonium chloride	Preventolo R50, R80 NeoDesogen Hyamine 3500 BAC Catamin AB
	(Diisobutylphenoxyethoxyethyl)dimethyl-benzyl-ammonium chloride	Hyanine 1622
	Dodecyl-benzyl-trimethyl-ammonium chloride Lauryl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride	Gloquat C Cequartyl
Sali di stagno	Tri-n-butyl tin oxide	<b>TBTO</b>
Piridine	2,3,5,6 Tetrachloro-4-methyl sulfonyl pyridine	Algophase
Composti eterociclici	Hexazinone	Velpar, Velpar L

I sali di ammonio quaternario sono i composti più comunemente usati nel settore dei beni culturali e facilmente reperibili in commercio, poichè hanno un ampio spettro d'azione e una tossicità mediamente bassa. Il dodecil-diossietil-benzil-ammonio cloruro è molto attivo contro batteri, funghi e attinomiceti, ma ha scarsa persistenza. In trattamenti contro le alghe il lauril-dimetil-benzil-ammonio cloruro mostra una migliore efficacia e persistenza di azione. Il benzalconio cloruro è uno dei prodotti più comuni nella pratica di cantiere in Italia e all'estero, ma è più efficace come battericida che come fungicida; contro cianobatteri e alghe la sua capacità di azione varia in funzione sia della concentrazione che del tipo di prodotto commerciale.

Lo iodopropinil butilcarbammato (IPBC) è un fungicida utilizzato per proteggere le superfici verniciate. I metalli come rame, zinco e argento hanno effetti ad ampio spettro su microrganismi, piante e animali, e sono utilizzati per la conservazione del legno. Rame e zinco sono utilizzati anche come agenti antifouling con effetti su un largo spettro di organismi. L'isotiazolinone DCOIT idrofobico è un composto antivegetativo efficace contro i batteri e le alghe. Irgarol e la medetomidina sono composti antivegetativi con un profilo di efficacia stretto: il targeting algale, la fotosintesi e l'insediamento delle larve rispettivamente [3].

## I.2.2 IL BENZOATO DI SODIO: CARATTERISTICHE ED EFFICACIA

L'acido benzoico e il suo sale sodico (benzoato di sodio) fanno parte della categoria dei conservanti antimicrobici e sono tra i biocidi più utilizzati nella protezione del biofouling. Grazie alle proprietà batteriostatiche e fungistatiche, il benzoato di sodio è utilizzato come additivo alimentare (E211) in qualità di conservante (azione ottimale a pH inferiore a 3,6).



Formula di struttura	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COONa
Massa molare	144,11 g/mol
Aspetto	solido bianco
CAS	532-32-1

Figura 4 Benzoato di sodio e proprietà.

Gli studi fatti con Microtox<sup>®3</sup> evidenziano che l'EC<sub>50</sub> dell'acido benzoico e del benzoato di sodio sono pari a ~ 7 e ~560 mg / L rispettivamente, cinque ordini di grandezza inferiori rispetto a quelli del TBTO (~0.01-0.02 mg / L) [16]. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione nei pochi studi che hanno seguito i test comportamentali standard, l'acido benzoico dimostra di agire come repellente. Secondo la definizione di Railking sono repellenti quelle sostanze che inviano segnali che inducono le cellule ad allontanarsi dalla fonte del segnale [17].

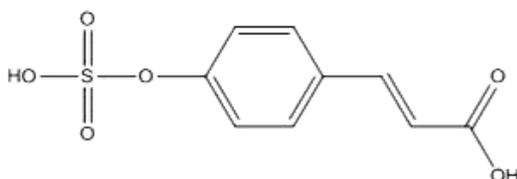
Oltre al meccanismo di repellenza, i composti antivegetativi possono anche mostrare un meccanismo chimico anti-adesivo: agiscono come inibitori catalitici per le reazioni biochimiche coinvolte nell'adesione cellulare. L'acido benzoico ha anche proprietà chimico-antiadesive. Precedenti lavori hanno valutato i comportamenti antibatterici dell'acido benzoico e hanno concluso che disattiva gli enzimi che controllano il metabolismo dell'acido acetico e la fosforilazione ossidativa nei lieviti e batteri. In una recente revisione dei meccanismi antibatterici, è stato evidenziato che l'acido benzoico agisce interferendo con la capacità della membrana cellulare di mantenere un livello di pH adeguato, con conseguente acidificazione della parte interna della cella e interruzione del processo di diffusione del metabolismo. La forma indissociata è solubile nella membrana cellulare e agisce come ionoforo di protoni. Questo facilita l'accumulo di protoni all'interno della cellula e ne aumenta il consumo energetico per mantenere normale il pH. Il benzoato quindi va ad agire sulla forza motrice protonica (PMF). Dopo la diffusione all'interno della membrana la forma indissociata ionizza determinando un abbassamento del pH con conseguente alterazione del gradiente di membrana [17]. Sia l'acido benzoico che il benzoato di sodio possono essere incorporati in rivestimenti per ottenere un effetto sinergico in cui le proprietà antivegetative dell'acido benzoico o del benzoato di sodio sono combinate con le prestazioni del rivestimento. Tuttavia, a causa della lisciviazione estremamente veloce del composto, l'efficacia del rivestimento con acido benzoico incorporato è solo per un breve periodo di tempo (1 mese).

<sup>3</sup> Test di tossicità standardizzato a livello internazionale atto a definire l'EC<sub>50</sub> (*half maximal effective concentration*). EC<sub>50</sub> corrisponde alla concentrazione di sostanza tossica in cui la bioluminescenza è dimezzata: tanto più è alto tanto meno la sostanza è tossica nei confronti dell'organismo.

### I.2.3 NATURAL PRODUCTS ANTIFOULANTS (NPAS): LO ZOSTERATO DI SODIO

I biocidi tradizionali agiscono o inibendo la crescita di batteri o uccidendoli. Tuttavia, le nuove normative, combinate con la crescente pressione da parte degli ambientalisti e la possibilità delle mutazioni batteriche, hanno spinto alla ricerca di nuove alternative. La direttiva Europea 98/8/CE indica come biocidi anche le sostanze che rendono innocui, controllano o inibiscono l'attività di microrganismi. In questa categoria dunque sono inclusi i Natural Products Antifoulants (NPAs). I NPAs sono prodotti da spugne, coralli, molluschi, alghe, piante terrestri, ecc. Questi composti vanno dai terpeni ai composti azotati, dai derivati fenolici agli steroidi e hanno proprietà antisettiche, repellenti o inibitorie nei confronti dei microrganismi senza essere nocivi per l'ambiente; per questo vengono definiti agenti antibiofilm ecocompatibili.

L'acido zosterico o acido p-(sulfoossi) cinnamico fa parte della categoria dei NPAs ed è un metabolita secondario prodotto dalla *Zostera marina*.



Formula di struttura	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S
Massa molare	244,22
Aspetto	solido giallastro
CAS	151481-49-1

Figura 5 Acido zosterico e proprietà.

Questo composto è stato oggetto di interesse per le sue proprietà antivegetative, nello specifico per la capacità di prevenire la formazione/adesione di biofilm sulla superficie di oggetti di diversa natura. A concentrazioni subletali, l'acido zosterico è in grado di ridurre sia l'adesione batterica che fungina e svolge un ruolo fondamentale nel condizionare l'architettura del biofilm, riducendone la biomassa e lo spessore. Uno studio proteomico comparativo sulle cellule di *E. coli* esposte a ZA ha dimostrato che, nelle cellule batteriche, ZA promuove l'espressione di diverse proteine di protezione e la sintesi di flagelli per l'allontanamento dalle condizioni avverse. Per quanto riguarda l'architettura della molecola, la capacità antivegetativa dell'acido zosterico è stata attribuita al gruppo estere solfato [19].

Gli esperimenti fatti con Microtox® evidenziano una bassa ecotossicità dell'acido zosterico con EC<sub>50</sub>= 442mg/L. L'acido zosterico mostra una buona efficacia verso ceppi batterici biofilmogeni a concentrazioni inferiori all'EC<sub>50</sub> Microtox: *P. putida*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*.

Inizialmente il principio attivo era estratto direttamente dalla pianta acquatica appartenente alle Zoosterace. Successivamente è stato proposto un processo di sintesi che si basava sulla solfonazione dell'acido p-cumarico con l'acido cloro solfonico in piridina. Quest'ultima strategia prevedeva processi di separazione e purificazione tramite HPLC. Attualmente si utilizza un processo di sintesi che si basa sulla solfonazione dell'acido p-cumarico con un complesso piridina•SO<sub>3</sub> in N,N-Dimetilformammide [20].

In letteratura sono presenti alcuni studi che riguardano le applicazioni dello zosterato di sodio come antibiofouling. Boopalan et al. [21] propongono un confronto tra le proprietà di un particolare formulato di natura epossidica da applicare su un acciaio dolce zinco-fosfato contenente il biocida tal quale e caricato in zeoliti. In questo lavoro l'acido zosterico non viene incapsulato, ma adsorbito nelle zeoliti che fungono da materiale di supporto [21].

Geinger et al propongono di inserire nel formulato di un poliestere biocompatibile (PHA<sup>4</sup>) lo zosterato tal quale e lo zosterato caricato in microcapsule di polistirene. Questo sistema di incapsulamento rilascia una quantità di biocida estremamente bassa ( $10 \mu\text{g cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ ), per questo gli autori auspicano di mettere appunto un sistema di incapsulamento che garantisca capsule di dimensioni nanometriche in modo da aumentare la superficie di scambio e conseguentemente il tasso di rilascio [22].

---

<sup>4</sup> poly3 - hydroxyalkanoate - Co - 3 - hydroxyalkenoate

### 1.3 USO DELLE NANOCAPSULE PER IL RILASCIO CONTROLLATO

Lo sviluppo del processo di microincapsulamento è iniziato con la preparazione di capsule contenenti coloranti. L'industria farmaceutica ha a lungo utilizzato il microincapsulamento per la preparazione di capsule contenenti principi attivi, ma col passare del tempo una serie di nuove tecnologie sono emerse e sono in fase di sviluppo in molti campi della ricerca. Negli ultimi 10 anni questo approccio è stato esplorato ampiamente dal settore agricolo, alimentare, cosmetico e tessile. Il microincapsulamento, infatti, fornisce la possibilità di combinare le proprietà di diversi tipi di materiale (ad esempio, organico e inorganico), cosa difficilmente ottenibile con altre tecniche.

Questa tecnologia viene utilizzata principalmente con lo scopo di garantire protezione, rilascio controllato e la compatibilità del materiale incapsulato con il rivestimento.

Il microincapsulamento è un processo che permette di racchiudere particelle di solidi di dimensioni micrometriche o goccioline di liquidi o gas inerte in un guscio, che a sua volta le isola e le protegge dall'ambiente esterno. L'inerzia è legata alla reattività della parte esterna della capsula con il materiale del nucleo. Le microcapsule (particelle colloidali) possono avere diverse dimensioni, morfologie e composizioni chimiche (vedi Figura 6).

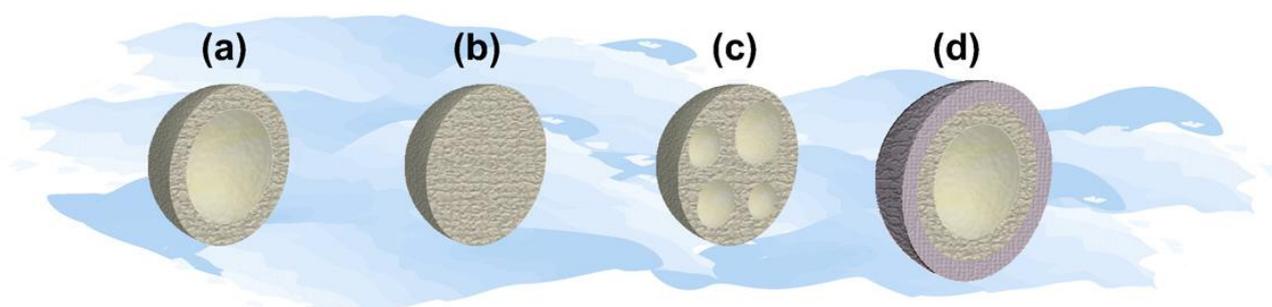


Figura 6 Morfologia delle microcapsule; a) core-shell, b) microsfera, c) multicore-shell e d) core-multishell [11].

Le microcapsule possono essere divise in due parti, vale a dire il nucleo (core) e il guscio (shell). Il nucleo contiene il principio attivo (ad esempio, un biocida), mentre il guscio protegge il nucleo in modo permanente o temporaneo dall'ambiente esterno. Quando le dimensioni delle particelle diventano sub-micrometriche si parla di nanoparticelle e il processo di incapsulamento è definito nanoincapsulamento. Sebbene il microincapsulamento offra un grande potenziale nel settore dei rivestimenti funzionali, gli articoli in letteratura che affrontano questa tematica non sono molti [11].

I materiali costituenti il nucleo possono essere allo stato solido, liquido o gassoso. La compatibilità del materiale del nucleo con il guscio è un criterio importante per migliorare l'efficienza del microincapsulamento; per migliorare tale compatibilità si può effettuare un pretrattamento del materiale del nucleo, la cui dimensione svolge anche un ruolo importante per la diffusione, la permeabilità o il rilascio controllato. A seconda delle applicazioni, una vasta

gamma di materiali può essere incapsulata, compresi i pigmenti, coloranti, monomeri, catalizzatori, agenti d'indurimento, plastificanti e nanoparticelle solide.

L'abbondanza di polimeri naturali e artificiali offre un'ampia scelta per il materiale del guscio, che, a secondo delle caratteristiche del polimero, può essere permeabile, semi-permeabile o impermeabile.

I gusci permeabili sono utilizzati per applicazioni di rilascio: il rilascio del materiale del nucleo è controllato principalmente dallo spessore delle pareti del serbatoio e dalla dimensione dei pori.

Le capsule semipermeabili sono di solito impermeabili al materiale del nucleo, ma permeabili a liquidi a basso peso molecolare. Così, queste capsule possono essere utilizzate per assorbire sostanze dall'ambiente e per liberarle di nuovo quando entrano in un altro mezzo.

Si scelgono shell impermeabili quando si vuole racchiudere il materiale del nucleo e proteggerlo dall'ambiente esterno. In questo caso, affinché sia rilasciato il contenuto del nucleo, il guscio deve essere rotto attraverso diverse tipologie di interventi dall'esterno, come un aumento di pressione o di temperatura, l'aggiunta di un solvente o reazioni di fotodegradazione.

### I.3.1 PREPARAZIONE DELLE NANOCAPSULE: IL METODO SOL-GEL

In generale, le tecniche di incapsulamento sono divise in due gruppi: tecniche chimiche e tecniche fisiche. Queste ultime vengono ulteriormente suddivise in tecniche fisico-chimiche e fisico-meccaniche. Alcuni dei più importanti processi utilizzati per l'incapsulamento sono riassunti nella Tabella 3.

Tabella 3 *Tecniche di incapsulamento*

PROCESSI CHIMICI	PROCESSI FISICI	
	FISICO-CHIMICI	FISICO-MECCANICI
Sospensione, dispersione ed emulsione	Atomizzazione	Tecniche di centrifugazione
Policondensazione	Assemblaggio Layer-by-layer(LBL)	Incapsulamento sotto vuoto
	Coacervazione	Microincapsulamento elettrostatico
	Incapsulamento mediante sol-gel	Spray-drying
	Microincapsulamento assistito con CO <sub>2</sub> supercritica	

La scelta del metodo di incapsulamento dipende:

- a) dal profilo di rilascio desiderato
- b) dalla granulometria desiderata
- c) dalla permeabilità della parete del serbatoio
- d) dalle proprietà fisico-chimiche del principio attivo (la polarità, le dimensioni, la carica, l'attività di superficie ecc).

In questa sede verrà descritto il metodo sol-gel che può essere utilizzato in due diverse modalità:

- 1) l'impregnazione prevede l'aggiunta del principio attivo nella fase di sol. Mediante appropriata modificazione chimica dei precursori, è possibile controllare il tasso di idrolisi e condensazione e di conseguenza la granulometria colloidale e la porosità del materiale finale che adsorbirà il principio attivo
- 2) l'incapsulamento prevede che, durante la fase di gel, quest'ultimo vada a circondare la molecola di principio attivo da incapsulare [23].

Il trattamento sol-gel può fare riferimento a numerosi processi di reazione che impiegano una varietà di precursori chimici. Secondo Kakihana, ci sono essenzialmente tre diversi tipi di sol-gel: (i) sol-gel colloidale; (ii) sol-gel inorganici; e (iii) sol-gel polimerici (Tabella 4) [24].

Tabella 4 Tre tipologie di metodi sol-gel

	STRUTTURA DI SUPPORTO	TIPO DI LEGAME	SORGENTE
<b>Sol-gel colloidali</b>	Colloide	Le particelle sono interconnesse o tramite legami di Van der Waals o tramite legami ad H	Per lo più da sol di ossidi o idrossidi
<b>Sol-gel inorganici</b>	Polimeri metossilici	Polimeri inorganici interconnessi tramite legami di Van der Waals	Idrolisi e condensazione di alcossidi
	Complessi metallici	Associati debolmente interconnessi tramite legami di Van der Waals	Soluzione concentrata di complessi metallici
<b>Sol-gel polimerici</b>	Complessi polimerizzabili <i>in situ</i>	Polimeri organici	Polimerizzazione tra l'acido $\alpha$ -idrossi carbossilico e un polidrossialcol in presenza di un complesso metallico
	Soluzione di complessi polimerici	Polimeri organici	Polimeri di coordinazione

I precursori per la preparazione del sol-gel inorganici più utilizzati sono gli alcossidi ( $M(OR)_4$  con  $M=Si, Zr, Ti$ , ecc), composti in cui un atomo di metallo o metalloide è legato ad uno o più gruppi organici ( $R$ =radicale alchilico o arilico) attraverso un atomo di ossigeno. Il tetrametossisilano ( $(Si(OCH_3)_4)$ TMOS) e tetraetossisilano ( $(Si(OC_2H_5)_4)$ , TEOS) sono gli alcossisilani più diffusi. Al TEOS spesso vengono mescolati alcossidi di altri elementi quali alluminio, titanio e boro [25]. La reattività di questi composti è legata al carattere elettronegativo del gruppo alcossidico che rende il metallo sensibile ad attacchi di tipo nucleofilo.

Le reazioni coinvolte nella formazione del sol sono l'idrolisi e la condensazione e avvengono in maniera competitiva all'interno del sistema (Tabella 5).

Tabella 5 Reazioni di formazione del sol

REAZIONI DI FORMAZIONE DEL SOL	
IDROLISI	$M(OR)_n + H_2O \rightleftharpoons M(OR)_{n-1}(OH) + ROH$
CONDENSAZIONE	$M-OH + M-OX \rightleftharpoons M-O-M + X-OH$ con $X=H$ o $R$

La reazione di idrolisi porta alla formazione di unità idrolizzate che in seguito subiranno reazione di condensazione. Secondo la quantità di acqua e di catalizzatore presenti, l'idrolisi può essere completa con la sostituzione di tutti i gruppi alcossido ( $-OR$ ) con gruppi ossidrilici ( $-OH$ ), oppure può arrestarsi quando il metallo-alcossido è solo parzialmente idrolizzato. Nella

reazione di condensazione i gruppi silanolo (Si-OH) o silanoalcoossidi (Si-OR) subiscono un attacco nucleofilo con l'eliminazione di molecole di acqua o alcol e formazione di legami silossanici (Si-O-Si).

La reazione di formazione del sol dipende dal precursore, dalle condizioni di pH, dalla scelta del catalizzatore, dal rapporto molare  $H_2O/Si(OR)$ : in condizioni acide la reazione avviene principalmente sulle unità terminali delle catene alcoossidiche, mentre in ambiente basico sono favorite le reazioni sulle unità centrali. Durante la gelificazione i cluster, specie oligomeriche formatesi durante la condensazione, evolvono nella fase gel, fungono da nuclei di aggregazione e portano alla formazione di reticoli<sup>5</sup> microporosi o mesoporosi a secondo del catalizzatore. La crescita del reticolo conduce ad un aumento della viscosità della soluzione colloidale fino al raggiungimento del punto di transizione sol-gel o punto di gelificazione<sup>6</sup>. La fase successiva, definita di invecchiamento, comporta la riorganizzazione strutturale del reticolo, la variazione del diametro dei pori e la formazione di altri cross-link. L'ultima fase del processo, nota come essiccazione, implica l'eliminazione del solvente (sineresi), la contrazione del gel e l'ottenimento di un sistema rigido [26].

Le reazioni di idrolisi e condensazione sono catalizzate da acidi e basi. La scelta del catalizzatore e quindi del pH dell'ambiente di reazione determina il tipo di particelle silicee, condizionando le proprietà di incapsulamento (Tabella 6).

Tabella 6 Confronto tra la catalisi acida e la catalisi basica

CATALISI ACIDA	CATALISI BASICA
Idrolisi veloce	Idrolisi lenta
Idrolisi reversibile e incompleta (riesterificazione)	Idrolisi irreversibile e completa
Condensazione procede per reazione di specie neutre con gruppi Si-OH protonati	Condensazione procede per addizione di monomeri ai gruppi Si-O- del cluster
Catene poco ramificate	Particelle sferiche e strutture fortemente reticolate

La reazione di idrolisi in catalisi acida prevede che l'atomo di ossigeno di un gruppo alcoossido (-OR) venga protonato con la formazione di un buon gruppo uscente (R-OH). L'atomo di silicio centrale, essendo stato privato di una parte della densità elettronica, è più elettrofilo e subisce un attacco di tipo nucleofilo da parte dell'acqua (Figura 7) con conseguente formazione di uno stato di transizione penta-coordinato carico positivamente. Questo stato di transizione diventa sempre meno stabile quanti più gruppi OH sostituiscono i gruppi alcoossido sul monomero e decade in seguito all'eliminazione di una molecola di alcol. La velocità di idrolisi diminuisce nel tempo ed è favorita da sostituenti con limitato ingombro sterico e con carattere elettron-donatore in grado di stabilizzare le cariche positive.

<sup>5</sup> Grazie alla presenza di gruppi Si-OH nella parte esterna

<sup>6</sup> Il tempo di gel è definito come il punto in cui il gel assume un valore di viscosità e di elasticità tale da poter essere tagliato

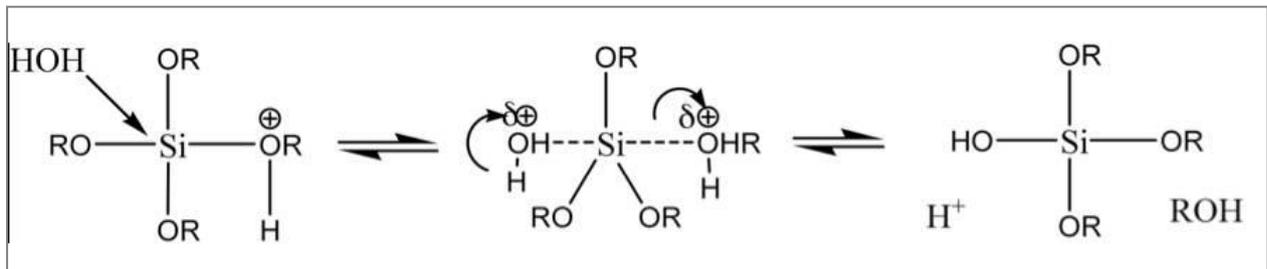


Figura 7 Idrolisi in catalisi acida.

In tali condizioni, la fase di condensazione può iniziare prima che l'idrolisi sia completata. Un gruppo  $-OH$  di una specie idrolizzata viene attaccato da una specie protonata con la formazione di un legame di tipo silossanico ( $Si-O-Si$ ) e l'eliminazione di una molecola d'acqua. La cinetica di condensazione progressivamente rallenta poichè la sostituzione dei gruppi  $-OR$  (elettron-donatori) con gruppi  $-OH$  e  $-OSi$  (elettron-attrattori) destabilizza lo stato di transizione [26].

Poiché la condensazione coinvolge silanoli protonati posti all'estremità di catene e monomeri, si ha la formazione di un reticolo caratterizzato da catene lineari debolmente ramificate. Dopo la fase di essiccamento del reticolo si otterrà un gel ad alta densità non particellato (Figura 8).

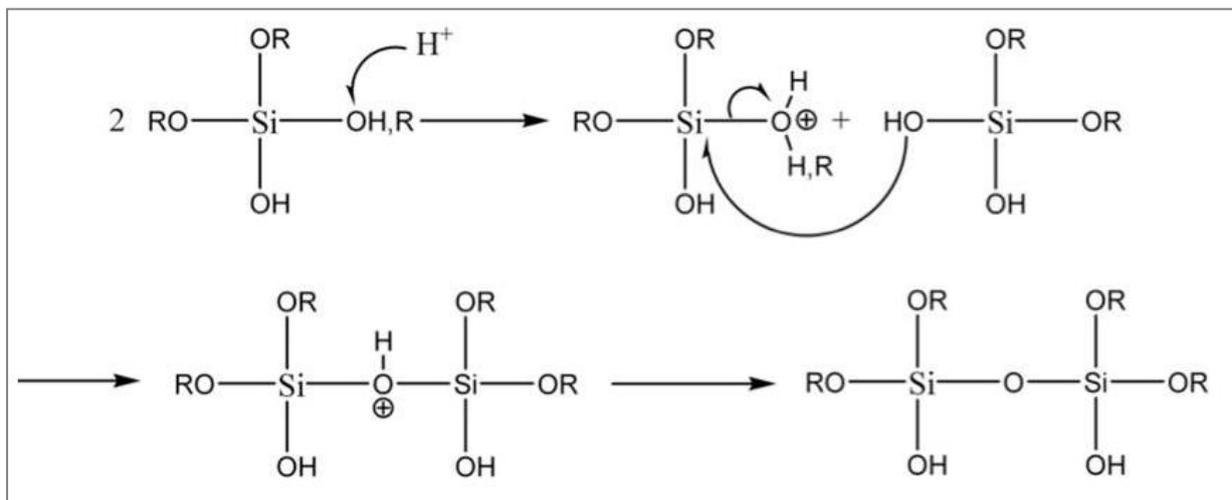


Figura 8 Condensazione in catalisi acida.

La reazione di idrolisi, in condizioni basiche invece, coinvolge l'atomo di silicio che, per attacco nucleofilo di un gruppo  $OH^-$ , forma uno stato di transizione penta-coordinato carico negativamente. La sostituzione del primo gruppo alcossido avviene lentamente, ma l'aumentare dei gruppi sostituiti sul monomero facilita l'attacco, determinando un progressivo aumento della velocità di idrolisi. Per questo motivo la reazione di idrolisi è completa prima dell'inizio della condensazione (Figura 9).

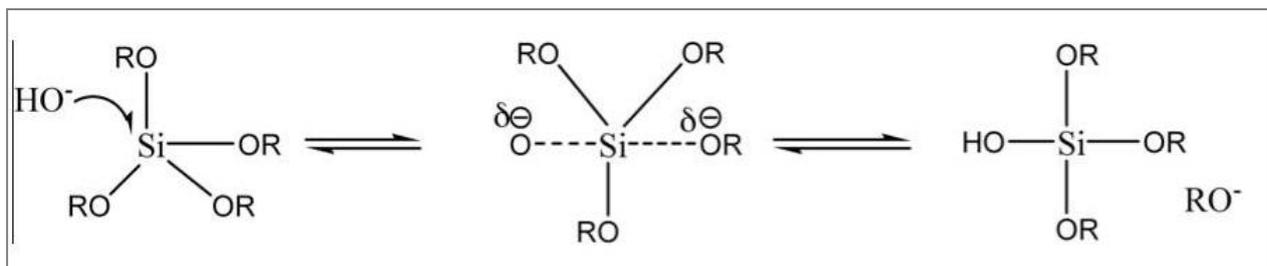


Figura 9 Idrolisi in catalisi basica.

Nella condensazione basica, un gruppo silicico neutro subisce attacco nucleofilo da parte di una specie idrolizzata deprotonata con la conseguente formazione del legame silossanico (Si-O-Si) [27]. Le condizioni basiche portano alla formazione di strutture fortemente ramificate e gel ad elevata porosità (Figura 10).

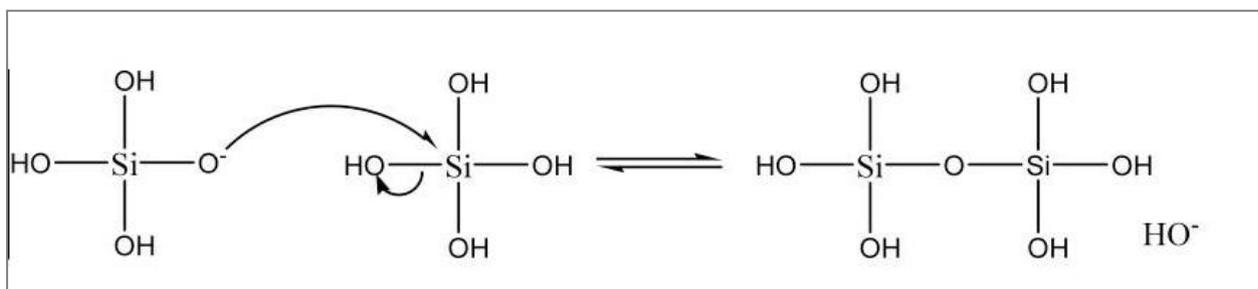


Figura 10 Condensazione in catalisi basica.

Per questi motivi per la sintesi di nanoparticelle a dimensione controllata si utilizza la catalisi basica e il catalizzatore più comune è l'ammoniaca.

Per ottenere nanocapsule di silice genericamente si utilizzano reazioni sol-gel di polimerizzazione all'interfaccia:

- si emulsiona la soluzione idrofoba comprendente il precursore sol-gel (TEOS) e la sostanza da incapsulare in soluzione acquosa sotto elevate forze di taglio
- l'emulsione ottenuta viene miscelata con una seconda soluzione acquosa a pH selezionato per ottenere le microcapsule sol-gel [28].

Chen et al. in un articolo del 2008 propongono un metodo innovativo per la realizzazione di nanocapsule in silice con nucleo vuoto e un guscio con mesoporosità graduale. La procedura di sintesi prevede la realizzazione di una microemulsione oil in water (O/W) con un singolo processo di polimerizzazione del precursore (TEOS) grazie ad un'interazione dinamica all'interfaccia oil-water (Figura 11) [29].

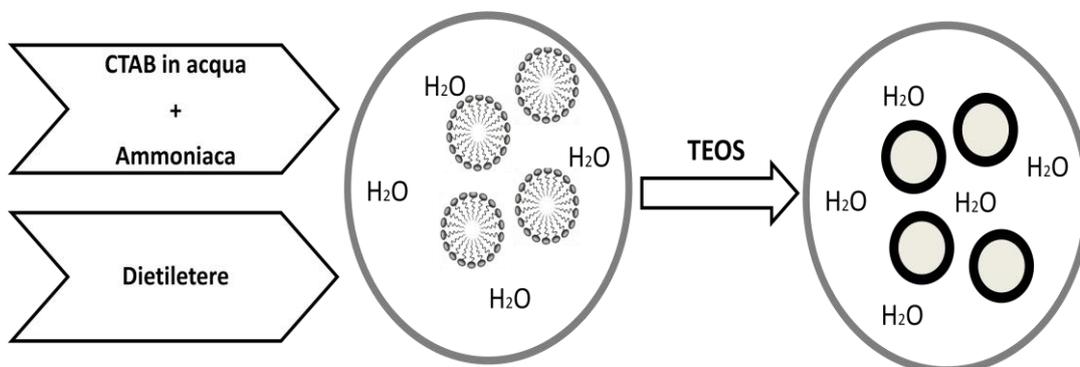


Figura 11 Meccanismo di sintesi delle nanocapsule di silice.

Questo metodo utilizza come cosolvente e template il dietiletere che avendo un basso punto di ebollizione non richiede complessi step, come la calcinazione o il lavaggio con solventi organici, per essere eliminato. Con questa procedura è possibile sintetizzare e caricare le nanocapsule di silice in un processo ad un solo stadio denominato *dynamic self-assembly at the oil-water-interface*. Per questo motivo nel 2012 Maia et al. sperimentano l'efficacia del metodo incapsulando il 2-mercabenzotiazolo (MBT), un comune inibitore di corrosione [30].

## BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Caneva, *La biologia vegetale per i beni culturali*, Nardini editore (2005).
- [2] G. Caneva, M.P. Nugari, O. Salvadori, *Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation*, Getty Conservation Institute (2008) Los Angeles.
- [3] C. C. Gaylarde, L H G. Morton, *Deteriogenic biofilms on buildings and their control: A review*, *Biofouling* (1999), 14 (1), 59-74.
- [4] F. Cappitelli, F. Villa, C. Sorlini, *New enviromentally friendly approaches against biodeterioration of outdoor cultural heritage*, in *Biocolonization of stone: control and preventive methods* (2011), 51-58.
- [5] F. Borderie, B. Alaoui-Sossé, L. Aleya, *Heritage materials and biofouling mitigation through UV-C irradiation in show caves: state-of-the-art practices and future challenges*, *Environ Sci Pollut Res* (2015), 22 (6), 4144-72.
- [6] M. E. Shirtliff, J. T. Mader, A. K. Camper, *Molecular interactions in biofilms*, *Chem. Biol.* (2002), 9(8), 859-871.
- [7] C. A. Crispim, C. C. Gaylarde, *Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review*, *Microbial ecology* (2005), 49(1), 1-9.
- [8] S. Scheerer, O. O. Morales, C. Gaylarde, *Chapter 5: microbial deterioration of stone monuments—an updated overview*. In: *Advances in applied microbiology*, Academic Washington, DC, (2009), 97–139.
- [9] A. Webster, E. May, *Bioremediation of weathered-building stone surfaces*, *TRENDS in Biotechnology* (2006), 24 (6), 255-260.
- [10] S.K. Ghosh, *Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective in Functional Coatings by Polymer Microencapsulation*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2006), 1-25.
- [11] M.A. Trojer, L. Nordstierna, J. Bergek, H. Blanck, K Holmberg, M. Nydéna, *Use of microcapsules as controlled release devices for coatings*, *Advances in Colloid and Interface Science* (2015), 222, 18–43.
- [12] H. Barberousse, G. Tell, C. Yéprémian, A. Couté, *Diversity of algae and cyanobacteria growing on building facades in France*, *Algol Stud Archiv für Hydrobiol Suppl* (2006), 120, 81–105.
- [13] C. Moreau, V. Vergès-Belmin, L. Leroux, G. Orial, G. Fronteau, V. Barbin, *Water-repellent and biocide treatments: assessment of the potential combinations*, *J Cult Herit* (2008), 9, 394–400.

- [14] J. Faimon, J. Stelcl, S. Kubesová, J. Zimák, *Environmentally acceptable effect of hydrogen peroxide on cave "lamp-flora", calcite speleothems and limestones*, *Environ Pollut* (2003), 122, 417–422.
- [15] European parliament, *Directive of the European Parliament and of the council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market*. European Union: Official Journal of the European Communities, 24 th April 1998 (1998), 61.
- [16] A.A. Al-Juhni, B.Z. Newby, *Incorporation of benzoic acid and sodium benzoate into silicone coatings and subsequent leaching of the compound from the incorporated coatings*, *Progress in Organic Coatings* (2006), 56, 135–145.
- [17] A. Railkin, *Marine Biofouling: Colonization Processes and Defenses*, CRC Press, Boca Raton (2004), 194–225.
- [18] J.S. Chapman, *Biocide resistance mechanisms*, *Int. Biodet. Biodeg.* (2003), 51, 133–138.
- [19] B.Z. Newby, T. Cutright, C.A. Barrios, Q. Xu, *Zosteric Acid—An Effective Antifoulant For Reducing Fresh Water Bacterial Attachment On Coatings*, *JCT Research* (2006), 3(1), 69–78.
- [20] D. Barsotti, *Nuovi sistemi a base di silice con potenziali proprietà antivegetative*, Università Ca' Foscari di Venezia, Relatore Prof.ssa Elisabetta Zendri, Tesi di Laurea Magistrale in Scienze chimiche per la conservazione e il restauro, A.A. 2012-2013.
- [21] M. Boopalan, A. Sasikumar, *Studies on Biocide Free and Biocide Loaded Zeolite Hybrid Polymer Coatings on Zinc Phosphated Mild Steel for the Protection of Ships Hulls from Biofouling and Corrosion*, *Silicon* (2011), 3, 207–214.
- [22] T. Geiger, P. Delavy, R. Hany, J. Schleuniger, M. Zinn, *Encapsulated Zosteric Acid Embedded in Poly[3-hydroxyalkanoate] Coatings - Protection against Biofouling*, *Polymer Bulletin* (2004), 52, 65-72.
- [23] I. van Driessche, S. Hoste, *Encapsulations Through the Sol-Gel Technique and their Applications in Functional Coatings*, in *Functional Coatings by Polymer Microencapsulation*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2006), 259-292.
- [24] M. Kakihana, M. Yoshimura, *Synthesis and Characteristics of Complex Multicomponent Oxides Prepared by Polymer Complex Method*, *Bull. Chem. Soc. Japan* (1999), 72, 1427–1443.
- [25] J. Livage, *Sol-gel synthesis of solids*, in: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley Publications (2000), 3836–3851.
- [26] B.D. Fabes, B.J.J. Zelinski, D.R. Uhlmann, *Sol-gel-derived ceramic coatings*, in: J.B. Wachtman, R.A. Haber (Eds.), *Ceramic Coatings and Films*. Noyes Publications, New Jersey (1993).

- [27] C.J. Brinker, G.W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, Inc.: New York (1990).
- [28] N. Lapidot, S. Magdassi, D. Avnir, C. Rottman, O. Gans, A. Seri-Levy, *Sunscreen composition containing sol-gel microcapsules*, US6238650 B1 (2001).
- [29] H. Chen, J. He, H. Tang, C. Yan, *Porous Silica Nanocapsules and Nanospheres: Dynamic Self-Assembly Synthesis and Application in Controlled Release*, *Chem. Mater.* (2008), 20, 5894–5900.
- [30] F. Maia, J. Tedim, A.D. Lisenkov, A.N. Salak, M. L. Zheludkevich, M. G. Ferreira, *Silica nanocontainers for active corrosion protection*, *Nanoscale* (2012), 4, 1287–1298.

## CAPITOLO II-PARTE SPERIMENTALE

### II.1 MATERIALI

I materiali usati in questo lavoro di tesi sono riportati nella seguente tabella:

MATERIALE		PRODUTTORE	TITOLO
Bromuro di cetil-trimetilammonio	CTAB	Sigma-Aldrich	95%
Orto silicato tetraetile	TEOS	Sigma-Aldrich	98%
Ammoniaca	NH <sub>3</sub>	Anala <sup>®</sup>	91%
Dietiletere	Et <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich	99%
Metanolo	MeOH	Sigma-Aldrich	99.9%
Acido solforico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fluka	95-97%
Acetato di etile	EtOAc	Baker Analyzed <sup>®</sup>	99%
Bicarbonato di sodio	NaHCO <sub>3</sub>	Fluka	98%
Benzoato di sodio	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COONa	Sigma-Aldrich	99.5%

Tutti i prodotti sono stati utilizzati tal quali senza ulteriore purificazione.

Lo zosterato di sodio [1] e l'estere metilico dello zosterato di sodio sono stati sintetizzati direttamente nei laboratori del CNR-IENI (Padova).

## II.2 SINTESI DELLE NANOPARTICELLE DI SILICE

0,25 g di CTAB (tensioattivo cationico e agente porogeno) sono stati solubilizzati in 35 ml di acqua distillata sotto agitazione, scaldando a 55°C per 15 minuti. Una volta avvenuta la completa dissoluzione del CTAB, evidenziata dalla trasparenza della soluzione, 0,25 ml di ammoniaca (25-28%) (catalizzatore) sono stati aggiunti sotto agitazione. Dopo aver portato a temperatura ambiente la soluzione, sono stati aggiunti 25 ml di dietiletere (cosolvente). Dopo 30 minuti, tempo necessario alla formazione delle micelle, sono stati gocciolati 1,25 ml di TEOS (precursore della silice). La soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h, durante le quali la soluzione gradualmente è diventata una sospensione. Il materiale risultante è stato filtrato sotto vuoto e lavato ripetutamente prima con acqua distillata (5 lavaggi con 20 ml) per eliminare l'eccesso di ammoniaca e poi con etanolo per eliminare il CTAB (2 lavaggi con 10 ml) (LR9A 0,2295 g). Una parte del prodotto così ottenuto è stata calcinata in aria per 5 h a 550°C per rimuovere le componenti organiche [2] (LR9 0,1257 g).

## II.3 INCAPSULAMENTO DELLO ZOSTERATO DI SODIO

E' stata realizzata una soluzione contenente 0,25 g di CTAB disciolti in 35 ml di acqua e posta in agitazione per 15 minuti a 55°C. Una volta raggiunta la trasparenza della soluzione sono stati aggiunti 0,25 ml di ammoniaca (25-28%). Parallelamente una soluzione di zosterato di sodio in metanolo all'1,3% in peso (0,0514 g di zosterato di sodio in 3,955 g di MeOH) è stata diluita in 25 ml di dietiletere e aggiunta alla soluzione acquosa sotto costante agitazione. Dopo 30 minuti alla soluzione ormai torbida, indice della formazione dell'emulsione O/W, sono stati aggiunti 1,25 ml di TEOS gocciolandoli lentamente[2]. La reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Le nanocapsule risultanti sono state filtrate sotto vuoto e sottoposte a 5 lavaggi da 20 ml con acqua distillata e 2 lavaggi da 20 ml con una soluzione 1:1 di acqua ed etanolo. Il materiale così ottenuto è stato posto in essiccatore sotto vuoto fino a peso costante (LR11 0,4281 g).

Per aumentare la quantità di biocida caricato nelle nanoparticelle, una soluzione di zosterato di sodio in metanolo all'1,3 % in peso (0,1028 g di zosterato di sodio in 7,91 g di MeOH) sono stati aggiunti a 50 ml di dietiletere e lasciati in agitazione per 10 minuti. Successivamente la soluzione organica è stata aggiunta alla soluzione acquosa contenente 0,25 g di CTAB in 35 ml di acqua e 0,25 ml di ammoniaca (25-28%). Dopo 30 minuti è stato gocciolato lentamente il TEOS (1,25 ml). La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Il materiale risultante è stato filtrato sotto vuoto e sottoposto a 5 lavaggi con 20 ml di acqua distillata e 2 lavaggi con 20 ml di una soluzione 1:1 acqua ed etanolo. Il materiale così ottenuto è stato posto in essiccatore sotto vuoto fino a peso costante (LR15 0,3179 g).

## II.4 INCAPSULAMENTO DEL BENZOATO DI SODIO

Al fine di confrontare il comportamento dello zosterato di sodio con un biocida commerciale, si è scelto di incapsulare il benzoato di sodio seguendo la stessa procedura utilizzata per lo zosterato di sodio.

0,25 g di CTAB è stato solubilizzato in 35 ml di acqua distillata sotto agitazione, scaldando a 55°C per 15 minuti. Una volta avvenuta la completa dissoluzione del CTAB, 0,25 ml di ammoniaca (25-28%) sono stati aggiunti sotto agitazione. Parallelamente una soluzione di benzoato di sodio in metanolo all'1,3% in peso (0,51415 g di benzoato di sodio in 3,955 g di MeOH) è stata diluita in 25 ml di dietilere e aggiunta alla soluzione acquosa sotto costante agitazione. Dopo 30 minuti, sono stati aggiunti 1,25 ml di TEOS gocciolandoli lentamente [2]. La reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Il materiale risultante è stato filtrato sotto vuoto e sottoposto a 5 lavaggi con 20 ml di acqua distillata e 2 lavaggi con 20 ml di una soluzione 1:1 acqua ed etanolo. Il materiale così ottenuto è stato posto in essiccatore sotto vuoto fino a peso costante (LR16 0,3864 g).

Come nel caso dell'incapsulamento dello zosterato di sodio per aumentare la quantità di biocida caricato nelle nanoparticelle, una soluzione di benzoato di sodio in metanolo all'1,3 % in peso (0,1028 g di benzoato di sodio in 7,91 g di MeOH) sono stati aggiunti a 50 ml di dietilere e lasciati in agitazione per 10 minuti. Successivamente la soluzione organica è stata aggiunta alla soluzione acquosa contenente 0,25 g di CTAB in 35 ml di acqua e 0,25 ml di ammoniaca (25-28%). Dopo 30 minuti è stato gocciolato lentamente il TEOS (1,25 ml). La reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Il materiale risultante è stato filtrato sotto vuoto e sottoposto a 5 lavaggi con 20 ml di acqua distillata e 2 lavaggi con 20 ml di una soluzione 1:1 acqua e etanolo. Il materiale così ottenuto è stato posto in essiccatore sotto vuoto fino a peso costante (LR18 0,224 g).

## II.5 SINTESI DELL'ESTERE METILICO DELLO ZOSTERATO SODICO E INCAPSULAMENTO

Il processo di esterificazione dello zosterato di sodio è stato ottenuto seguendo le linee guida riportate in letteratura relative al processo di esterificazione dell'acido 4-idrossicinnamico (precursore dell'acido zosterico) [3].

0,4779 g di zosterato di sodio sono stati disciolti in 35 ml di metanolo con l'aggiunta di 0,1 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato. Lo zosterato di sodio è stato fatto reagire con un eccesso di alcool, in presenza di un catalizzatore acido; trattandosi di una reazione di equilibrio, infatti, l'eccesso di alcool serve a spostare l'equilibrio di reazione verso i prodotti finali (Figura 12).

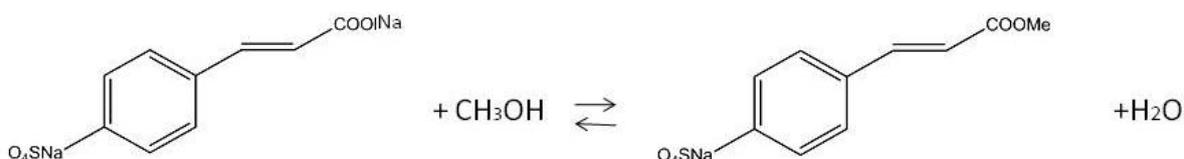


Figura 12 Esterificazione dello zosterato di sodio.

La reazione è stata lasciata a riflusso per 16 h a 80 °C sotto costante agitazione, dopodiché il solvente è stato rimosso sotto vuoto. Il residuo risultante è stato disciolto in 10 ml di acetato di etile. La soluzione è stata filtrata, trattata in imbuto separatore prima con 10 ml di soluzione 1M di NaHCO<sub>3</sub> e poi con 20 ml di H<sub>2</sub>O [3]. La rimozione del solvente dalla fase organica ha permesso di ottenere una polvere giallastra (0,23 g). In tabella 7 sono riportate le prove di solubilità effettuate sull'estere metilico dello zosterato (EZA).

Tabella 7 Prove di solubilità dell'estere metilico in diversi solventi con indici di polarità crescente

COMPOSTO 1mg	SOLVENTE 1ml	INDICE DI POLARITÀ	SOLUBILE
EZA (LR10)	Acqua	9	NO
	Metanolo	5.1	SI
	Cloroformio	4,1	SI
	Dietiletere	2.8	SI
	Toluene	2.4	SI

L'estere metilico è stato incapsulato applicando una procedura simile a quella riportata nel paragrafo II.3. Nel dettaglio 0,25 g di CTAB è stato solubilizzato in 35 ml di acqua distillata sotto agitazione, scaldando a 55°C per 15 minuti. Una volta avvenuta la completa dissoluzione del CTAB, 0,25 ml di ammoniaca (25-28%) sono stati aggiunti sotto agitazione. Dopo aver riportato a temperatura ambiente la soluzione, sono stati aggiunti 25 ml di dietiletere contenuti 0,1 g di EZA. Dopo 30 minuti sono stati gocciolati 1,25 ml di TEOS. Il prodotto ottenuto è stato filtrato sottovuoto, lavato prima con 20 ml di acqua distillata (5 lavaggi) e poi con soluzione 1:1 acqua ed etanolo (2 lavaggi). Il materiale ottenuto è stato posto in essiccatore sottovuoto fino a peso costante (LR12 0,4742 g).

## II.5 CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE

Da un punto di vista morfologico le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate tramite microscopia a scansione elettronica (SEM). Per migliorare la qualità delle immagini è stato necessario metallizzare i campioni depositando un film di grafite spesso pochi nanometri. Per confermare l'incapsulamento dei biocidi sono state condotte:

- analisi termogravimetriche (TG/DTA) in atmosfera di aria dalla temperatura ambiente fino a 800°C (strumento NETZSCH STA 449C). Queste analisi hanno permesso di stimare la quantità di materiale incapsulato in relazione alla perdita di peso registrata.
- analisi di spettroscopia infrarossa in modalità ATR. Gli spettri sono stati raccolti utilizzando lo spettrometro Nicolet Nexus 670 1890 dotato di ATR con cella di diamante. Gli interferogrammi sono stati raccolti tra 4000  $\text{cm}^{-1}$  e 400  $\text{cm}^{-1}$ , con una risoluzione di 4 $\text{cm}^{-1}$  con totale di 32 scansioni per campione.

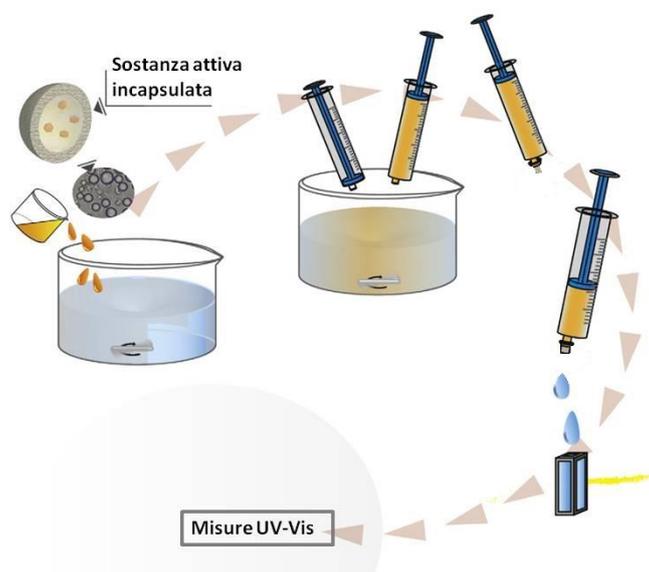
Prima di procedere con l'incapsulamento dell'estere metilico il prodotto di sintesi è stato analizzato tramite spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  in cloroformio deuterato (spettrometro Bruker AM300 con probe 5 mm, operante a una frequenza di 300,13 MHz per  $^1\text{H}$ ).

## II.7 STUDIO DEL RILASCIO DEI BIOCIDI DALLE NANOPARTICELLE

Il profilo di rilascio dello zosterato di sodio, dell'estere metilico dello zosterato e del benzoato di sodio è stato monitorato con uno spettrofotometro UV-VIS (strumento Unicam UV500) tra 200 e 650 nm.

15 mg (campione LR11) di nanoparticelle contenenti zosterato di sodio e 21,2 mg (campione LR16) di nanoparticelle caricate con benzoato di sodio sono state disperse in 5 ml di etanolo. Per quanto riguarda il campione LR12 contenente lo zosterato esterificato 7 mg, sono stati dispersi in 50 ml di etanolo. Circa 3 ml delle rispettive dispersioni sono stati prelevati con una pipetta senza ricorrere all'utilizzo di uno specifico filtro perché le dispersioni non si presentavano torbide.

Le misure sono state fatte in continuo campionando ogni 10 minuti per i primi 100 minuti e poi ogni 20 minuti per i 200 minuti successivi. L'ultima misura è stata effettuata dopo 17 ore (Figura 13). Dopo ogni misura il contenuto della cuvetta è stato raggiunto alla dispersione di partenza.



**Figura 13** Metodologia sperimentale per le misurazioni del rilascio di una sostanza attiva in nanocapsule in soluzione. Il rilascio del biocida inizia immediatamente. I campioni vengono raccolti nel tempo utilizzando una siringa. La concentrazione si valuta quantitativamente con spettrofotometria UV-VIS [4].

Durante le misure di rilascio le dispersioni sono state mantenute in debole agitazione magnetica a 93 rpm per garantirne l'omogeneità senza forzare la diffusione del biocida dalle nanoparticelle al mezzo. In accordo con quanto riportato in letteratura, le misure di rilascio sono state condotte in etanolo, perché in acqua le nanoparticelle galleggiavano.

Per determinare la concentrazione di sostanza rilasciata è stato necessario costruire una retta di calibrazione che permettesse di associare l'assorbanza dei picchi caratteristici di ogni sostanza alla quantità di biocida rilasciato. Ogni curva di calibrazione è stata costruita utilizzando 5 standard di concentrazione a partire da una soluzione madre con concentrazione di sostanza attiva pari a 50mg/l. Il coefficiente di correlazione delle curve di calibrazione è maggiore di 0,98 per tutti e tre i composti.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Barsotti, *Nuovi sistemi a base di silice con potenziali proprietà antivegetative*, Università Ca' Foscari di Venezia, Relatore Prof.ssa Elisabetta Zendri, Tesi di Laurea Magistrale in Scienze chimiche per la conservazione e il restauro, A.A. 2012-2013.
- [2] H. Chen, J. He, H. Tang, C. Yan, *Porous Silica Nanocapsules and Nanospheres: Dynamic Self-Assembly Synthesis and Application in Controlled Release*, *Chem. Mater.* (2008), 20, 5894–5900.
- [3] V. Percec, M. Peterca, M.J. Sienkowska, M.A. Ilies, E. Aqad, J. Smidrkal, P. A. Heiney, *Synthesis and Retrostructural Analysis of Libraries of AB<sub>3</sub> and Constitutional Isomeric AB<sub>2</sub> Phenylpropyl Ether Based Supramolecular Dendrimers*, *J. Am. Chem. Soc.* (2006), 128, 3324-3334.
- [4] M.A. Trojer, L. Nordstierna, J. Bergek, H. Blanck, K Holmberg, M. Nydén, *Use of microcapsules as controlled release devices for coatings*, *Advances in Colloid and Interface Science* (2015), 222, 18–43.

## CAPITOLO III- DISCUSSIONE DEI RISULTATI

### III.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA DELLE NANOPARTICELLE

#### VUOTE

Le nanoparticelle sono state ottenute dalla condensazione del TEOS all'interfaccia di una miniemulsione O/W, usando il CTAB come tensioattivo per la formazione del guscio in silice e il dietilere come cosolvente. La polimerizzazione del TEOS è un processo esotermico che aumenta la temperatura nel mezzo di reazione, causando la volatilizzazione del cosolvente dal centro verso l'esterno delle nanocapsule (il dietilere ha un punto di ebollizione pari a circa 35°C). Questo crea una porosità differenziale tra il nucleo e il guscio che permette di usare questa procedura per incapsulare sostanze attive il cui rilascio deve essere controllato. La formazione delle nanoparticelle, dunque, è il risultato dell'accoppiamento dinamico e trasversale di due processi auto-assemblati controllati dalla presenza del CTAB: la volatilizzazione dinamica del cosolvente e la stabilizzazione del processo di condensazione. Questa strategia risulta estremamente vantaggiosa perché non richiede la calcinazione o il lavaggio con solventi organici (acetone o toluene) per la rimozione del dietilere che oltre a svolgere il ruolo di cosolvente è anche template, insieme al CTAB, della miniemulsione [1].

Inizialmente, è stata seguita la procedura proposta nel lavoro di Maia et al (2015) [2].

Sono state condotte 6 sintesi, riportate in tabella 8, prima di constatare che la procedura riportata presentava delle imprecisioni in termini di concentrazioni dei reagenti, nelle modalità e nelle tempistiche di aggiunta. Queste sintesi, però, hanno permesso di vagliare l'importanza del rapporto molare tra il dietilere e il CTAB nella formazione della nanoparticelle di silice.

*Tabella 8 Sintesi condotte secondo le indicazioni dell'articolo "Incorporation of biocides in nanocapsules for protective coatings used in maritime applications"[2]*

	<b>CTAB</b>	<b>AMMONIACA</b>	<b>DIETILETERE/ BIOCIDA</b>	<b>TEOS</b>	<b>NOTE</b>
<b>LR1</b>	0,1 g in 35 ml di acqua	0,25 ml al 25-28%	20 ml+5ml di PREVENTOL	2 ml	Preventol è un biocida a base acquosa
<b>LR2</b>	0,1 g in 35 ml di acqua	0,25 ml al 25-28%	-	2 ml	Assenza del template per emulsione
<b>LR3</b>	0,1 g in 35 ml di acqua	0,25 ml al 25-28%	-soluzione acquosa al 18% di ZA -successiva aggiunta del dietilere	2 ml	Aggiunta del dietilere dopo la soluzione con il biocida
<b>LR4</b>	0,1g in 35 ml di acqua	0,25 ml al 25-28%	20 ml	2 ml	-

<b>LR5</b>	0,1 g in 35 ml di acqua	0,25 ml al 25-28%	10 ml di dietiletere + 5 ml soluzione acquosa di ZA al 18%	2 ml	-
------------	-------------------------	-------------------	--	------	---

In assenza del dietiletere (LR2) mantenendo costanti tutte le altre condizioni al contorno, le immagini SEM, riportate in figura 14, evidenziano che il materiale ottenuto è costituito da aggregati irregolari di silice.

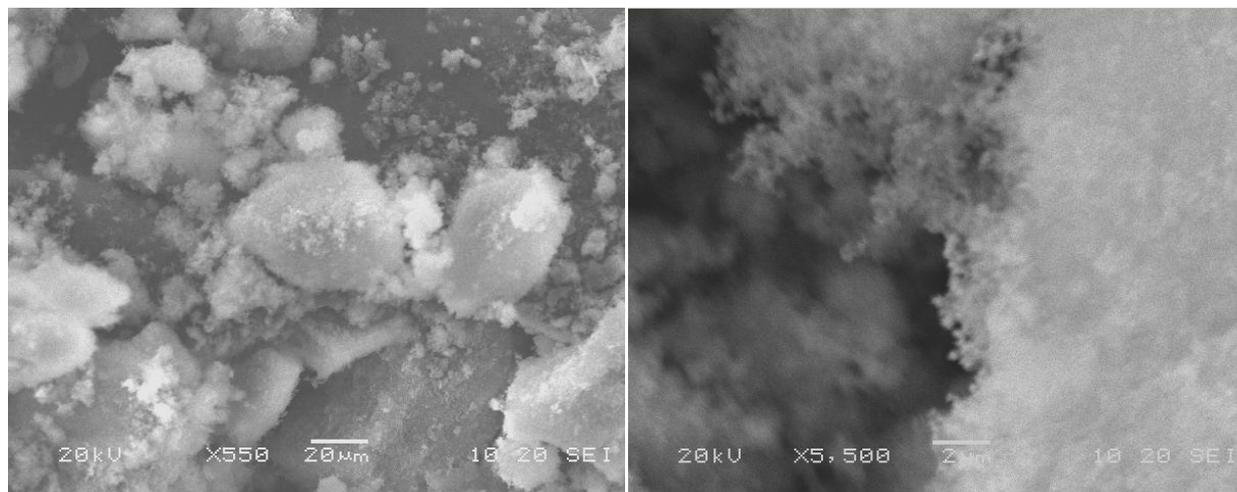


Figura 14 Immagini SEM a diversi ingrandimenti del campione LR2.

In figura 15 sono riportate le immagini al SEM del materiale ottenuto nella sintesi LR3. Nella sintesi LR3 l'aggiunta del cosolvente dell'emulsione dopo la soluzione contenente il biocida ha impedito la formazione delle micelle e la condensazione del TEOS ha dato luogo a cristalli in silice.

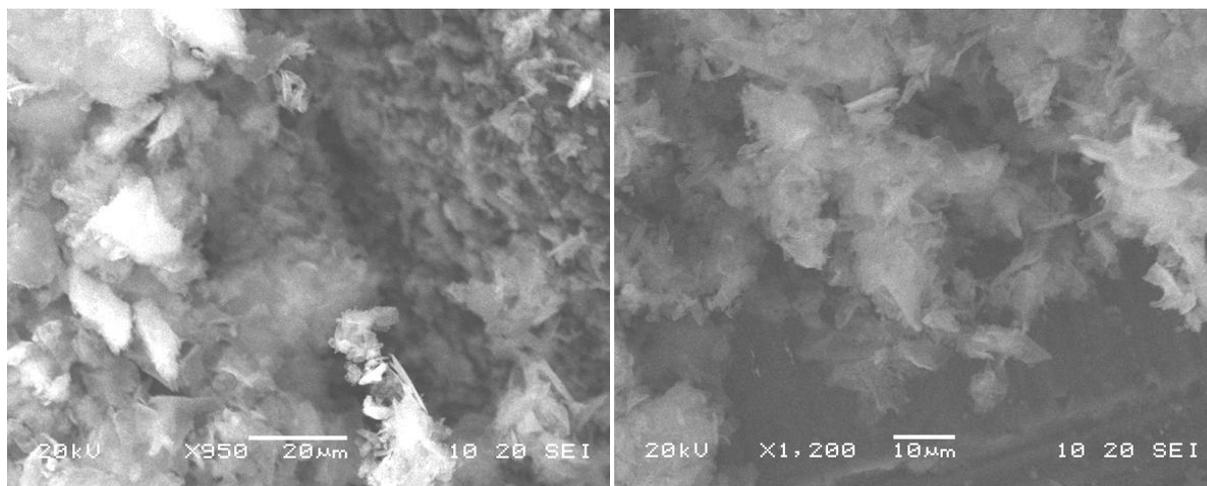


Figura15 Immagini SEM a diversi ingrandimenti del campione LR3.

Nella sintesi LR4, la concentrazione del dietiletere e del CTAB non è stata sufficiente per la formazione delle micelle della miniemulsione e conseguentemente delle nanocapsule. In figura 16, infatti, sono ben visibili cristalli di silice aggregati.

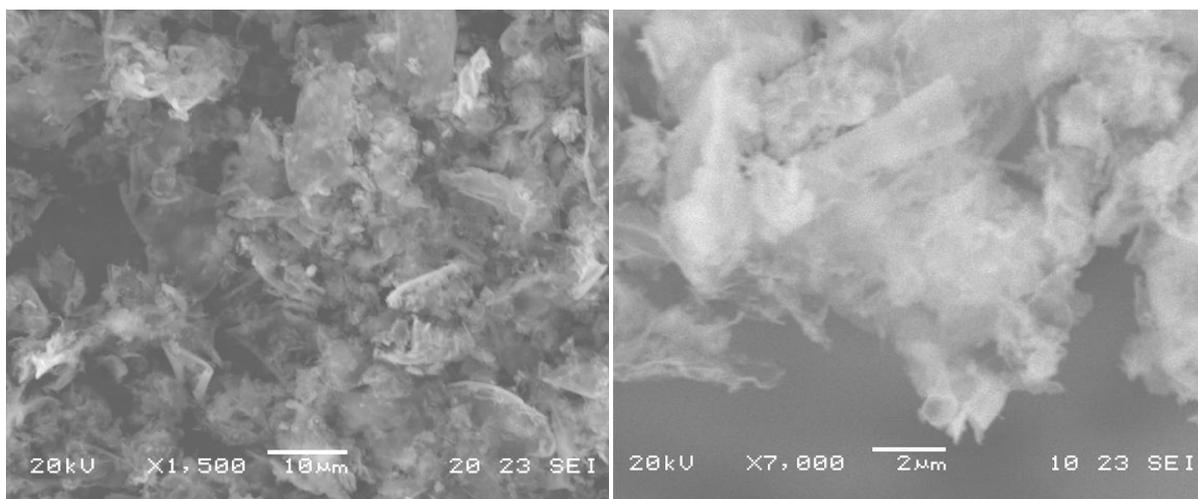


Figura 16 Immagini SEM a diversi ingrandimenti del campione LR4.

Viste le difficoltà operative, si è scelto di confrontare i dati riportati nell'articolo di Maia et al. con il lavoro di Chen et al. (2008) [3]. Questo lavoro propone un rapporto diverso in termini di concentrazioni tra i reagenti, modalità e ordine diversi di aggiunta dei reagenti stessi.

Per verificare quanto l'ordine di aggiunta dell'ammoniaca e il ruolo dell'agitazione magnetica influenzassero la formazione dell'emulsione sono state realizzate le sintesi riportate in tabella 9.

Tabella 9 Sintesi eseguite secondo le indicazioni riportate nell'articolo "Porous Silica Nanocapsules and Nanospheres: dynamic self-assembly synthesis and application in controlled release"[3]

	CTAB	AMMONIACA	DIETILETERE	TEOS	ORDINE DI AGGIUNTA E AGITAZIONE MAGNETICA
<b>LR6</b>	0,25 g in 35 ml di acqua	0,25 ml	25 ml	1,25 ml	(CTAB + acqua) + ammoniaca + dietiletere Aggiunti in sequenza senza agitazione magnetica
<b>LR7</b>	0,25 g in 35 ml di acqua	0,25 ml	25 ml	1,25 ml	(ammoniaca + acqua)+ CTAB + dietiletere Aggiunti in sequenza sotto costante agitazione magnetica
<b>LR8</b>	0,5 g in 35 ml di acqua	0,50 ml	50 ml	2,5 ml	(CTAB + acqua)+ ammoniaca + dietiletere Aggiunti in sequenza sotto costante agitazione magnetica

Utilizzando questa procedura si è arrivati all'ottimizzazione del processo di sintesi. E' stato, dunque, possibile ottenere nanoparticelle di morfologia uniforme sferica. Per analizzarne la morfologia (dimensione e forma) il solido ottenuto è stato osservato al SEM.

Dalle immagini al microscopio a scansione elettronica, riportate in figura 17 e 18, è possibile confrontare il materiale ottenuto dalla sintesi LR9 prima (sulla sinistra) e dopo processo di calcinazione durato 5 ore a 550°C (sulla destra).

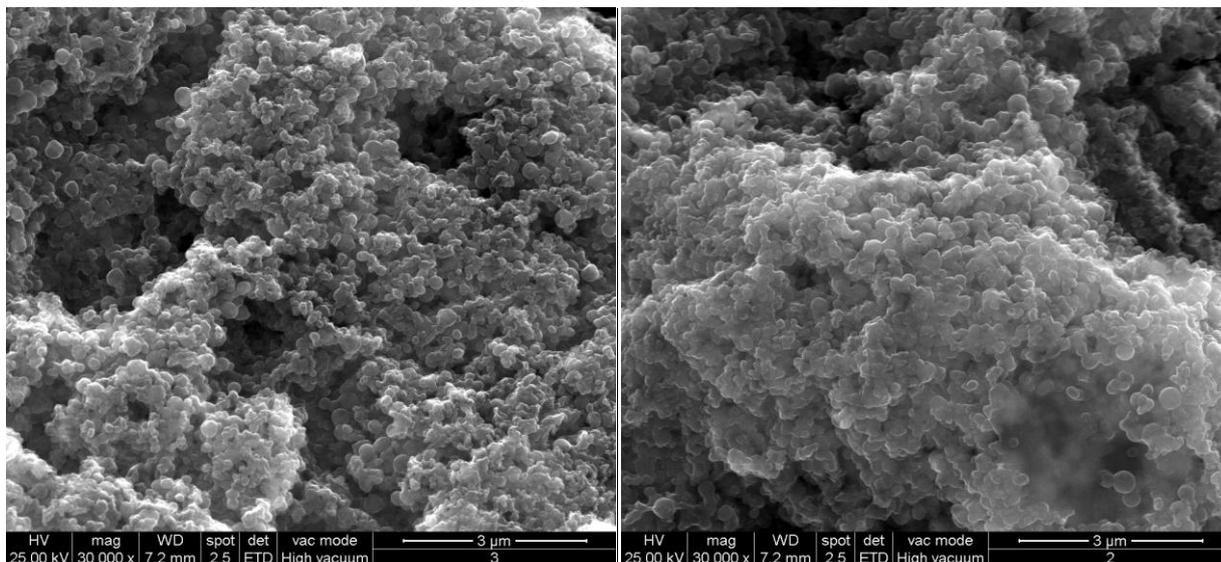


Figura 17 Sulla sinistra campione LR9 calcinato; sulla destra campione LR9 non calcinato.

Nelle immagini relative al campione non calcinato si notano dei residui di materiale polimerico che ricopre le nanoparticelle, derivanti dagli step di sintesi, e che contribuiscono alla loro aggregazione; questo fenomeno è documentato in letteratura [2].

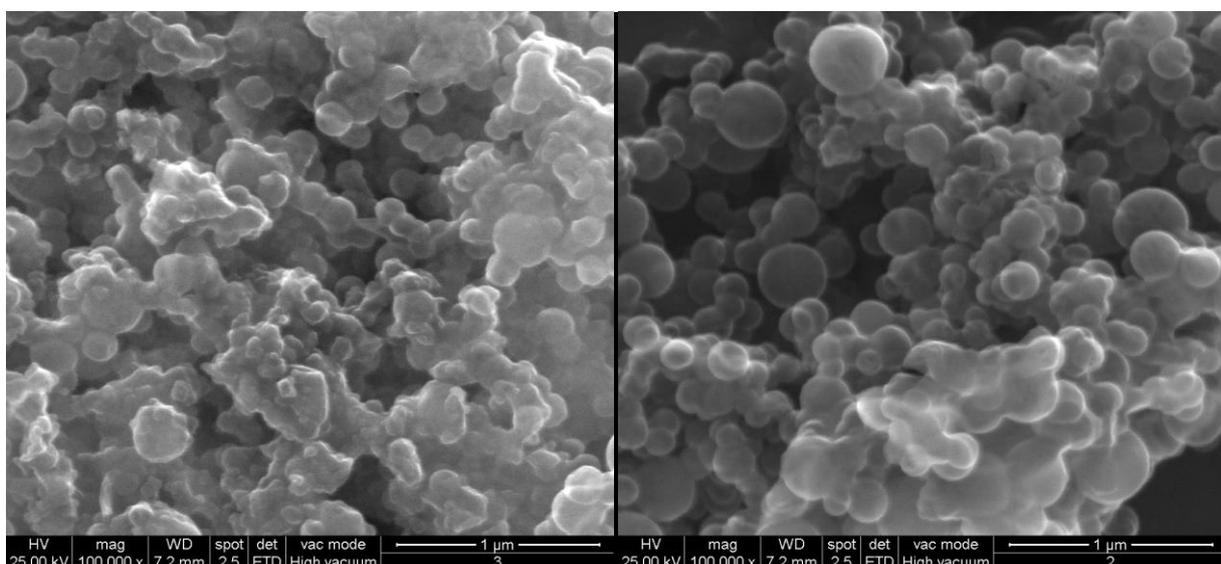


Figura 18 Sulla sinistra campione LR9 calcinato; sulla destra campione LR9 non calcinato.

Le nanoparticelle presentano un diametro variabile tra circa 90 e 350 nm e sono cave; quest'ultima caratteristica è evidente dal contrasto tra il bordo scuro e il centro chiaro e dall'osservazione di alcune particelle aperte.

Nonostante l'apparente semplicità della procedura di sintesi, in fase operativa sono state evidenziate una serie di criticità che sono state superate con successo applicando i seguenti accorgimenti:

- favorire la solubilizzazione del CTAB in acqua riscaldando a 55°C [4]

- raffreddare a temperatura ambiente prima di aggiungere il dietiletere (cosolvente volatile)
- mantenere l'agitazione per tutta la durata della sintesi elevata e costante
- aggiungere lentamente il TEOS, gocciolandolo, per non perturbare in alcun modo la stabilità della miniemulsione O/W.

### III.2 INCAPSULAMENTO DELLO ZOSTERATO DI SODIO E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA

In letteratura non è presente alcuno studio relativo all'incapsulamento dello zosterato di sodio in nanocontenitori di silice. In questo progetto di ricerca si è utilizzata una procedura ad un solo step che sfrutta la condensazione del TEOS all'interfaccia di una miniemulsione O/W e l'uso di un tensioattivo cationico (CTAB) come template per la formazione del guscio delle nanoparticelle.

Essendo lo zosterato di sodio un composto solubile nella fase acquosa, è stato necessario apportare degli aggiustamenti nella procedura di sintesi per rendere possibile l'incapsulamento. Lo zosterato di sodio non è solubile nel dietilere, cosolvente a basso punto di ebollizione fondamentale per la formazione delle nanocapsule. Per questo è stato necessario solubilizzare lo zosterato in un altro solvente organico miscibile in dietilere (Tabella 10); è stato scelto il metanolo perché lo zosterato di sodio ha una solubilità dell'1.3% in questo solvente.

Tabella 10 Miscibilità dei solventi

SOLVENT MISCIBILITY TABLE						
Solvent	Polarity Index	Refractive Index @20°C	UV(nm) @1AU	Boiling Point(°C)	Viscosity (cPoise)	Solubility in water (%w/w)
Acetic Acid	6.2	1.372	230	118	1.26	100
Acetone	5.1	1.359	330	56	0.32	100
Acetonitrile	5.8	1.344	190	82	0.37	100
Benzene	2.7	1.501	280	80	0.65	0.18
n-Butanol	4.0	1.394	254	125	0.73	0.43
Butyl Acetate	3.9	1.399	215	118	2.98	7.81
Carbon Tetrachloride	1.6	1.466	263	77	0.97	0.08
Chloroform	4.1	1.446	245	61	0.57	0.815
Cyclohexane	0.2	1.426	200	81	1.00	0.01
1,2-Dichloroethane <sup>1</sup>	3.5	1.444	225	84	0.79	0.81
Dichloromethane <sup>2</sup>	3.1	1.424	235	41	0.44	1.6
Dimethylformamide	6.4	1.431	268	155	0.92	100
Dimethyl Sulfoxide <sup>3</sup>	7.2	1.478	268	189	2.00	100
Dioxane	4.8	1.422	215	101	1.54	100
Ethanol	5.2	1.360	210	78	1.20	100
Ethyl Acetate	4.4	1.372	260	77	0.45	8.7
Di-Ethyl Ether	2.8	1.353	220	35	0.32	6.89
Heptane	0.0	1.387	200	98	0.39	0.0003
Hexane	0.0	1.375	200	69	0.33	0.001
Methanol	5.1	1.329	205	65	0.60	100
Methyl-t-Butyl Ether <sup>4</sup>	2.5	1.369	210	55	0.27	4.8
Methyl Ethyl Ketone <sup>5</sup>	4.7	1.379	329	80	0.45	24
Pentane	0.0	1.358	200	36	0.23	0.004
n-Propanol	4.0	1.384	210	97	2.27	100
Iso-Propanol <sup>6</sup>	3.9	1.377	210	82	2.30	100
Di-Iso-Propyl Ether	2.2	1.368	220	68	0.37	
Tetrahydrofuran	4.0	1.407	215	65	0.55	100
Toluene	2.4	1.496	285	111	0.59	0.051
Tichloroethylene	1.0	1.477	273	87	0.57	0.11
Water	9.0	1.333	200	100	1.00	100
Xylene	2.5	1.500	290	139	0.61	0.018

■ Immiscible  
 ■ Miscible

Immiscible means that in some proportions two phases will be produced

**Synonym Table**  
<sup>1</sup> Ethylene Chloride  
<sup>2</sup> Methylene Chloride  
<sup>3</sup> Methyl Sulfoxide  
<sup>4</sup> tert-Butyl Methyl Ether  
<sup>5</sup> 2-Butanone  
<sup>6</sup> n-Propanol

Le nanocapsule caricate con lo zosterato di sodio sono di colore bianco. Le osservazioni al microscopio a scansione elettronico evidenziano che le nanoparticelle caricate con zosterato di sodio sono sferiche e di dimensioni omogenee ma maggiori rispetto alle nanoparticelle vuote che, inoltre, avevano dimensioni variabili. La costanza dimensionale, riscontrabile in figura 19, è

una prova dell'avvenuto incapsulamento del biocida che occupando un certo volume all'interno della micella garantisce una costanza dimensionale alle nanoparticelle finali.

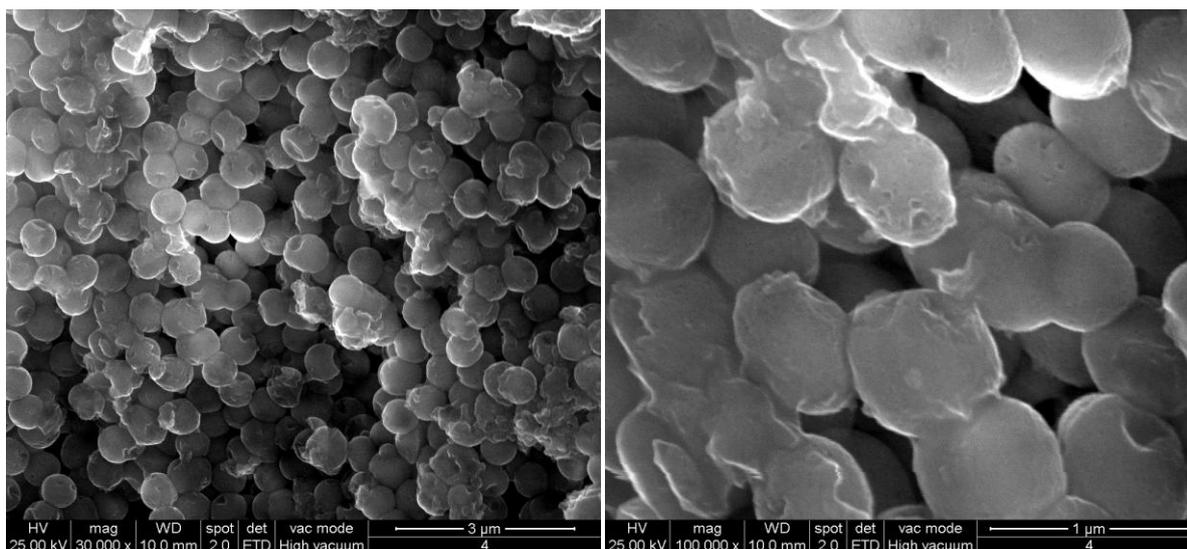


Figura 19 Immagini al SEM a diversi ingrandimenti del campione LR11.

Per aumentare la percentuale di biocida incapsulato si è scelto di aggiungere al dietiletere 10 ml di una soluzione all'1.3% di zosterato di sodio in metanolo. Durante la fase di filtraggio, lasciando riposare la soluzione si è riscontrata una separazione tra fase acquosa e fase organica contenente filamenti biancastri. Questo dato evidenzia che è stato aggiunto cosolvente in eccesso rispetto al volume necessario alla micellazione. Le osservazioni al SEM hanno evidenziato che la polvere ottenuta non è costituita da nanoparticelle sferiche, ma da materiale variamente cristallino (Figura 20). Si può concludere che l'eccesso di dietiletere ha perturbato l'equilibrio della miniemulsione O/W impedendo la formazione del template alla cui interfaccia reagisce il TEOS per formare il guscio di silice.

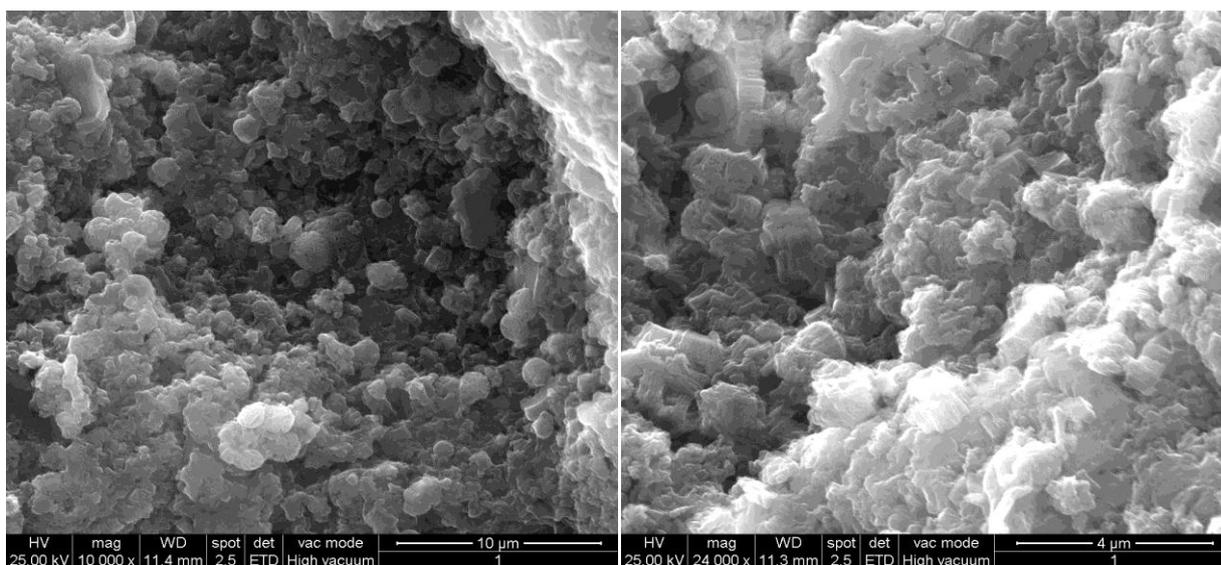


Figura 20 Immagini SEM del campione LR18 a diversi ingrandimenti.

### III.3 INCAPSULAMENTO DEL BENZOATO DI SODIO E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA

Per confrontare il comportamento dello zosterato di sodio con un prodotto commerciale di natura analoga, si è scelto di incapsulare con la medesima procedura di sintesi il benzoato di sodio. In modo del tutto simile a quanto descritto nel paragrafo III.2, è stata preparata una soluzione di benzoato di sodio in metanolo che è stata successivamente aggiunta al dietiletere.

La sintesi ha permesso di ottenere una polvere bianca che è stata osservata al SEM. Le immagini SEM evidenziano che il campione è costituito da nanoparticelle sferiche omogenee in termini dimensionali (Figura 21). Questi nanocontenitori hanno un diametro di circa 200 nm e sono più piccoli rispetto alle nanocapsule contenenti zosterato di sodio. Questa differenza dimensionale è probabilmente riconducibile alla differenza nelle dimensioni e nell'arrangiamento spaziale delle due molecole.

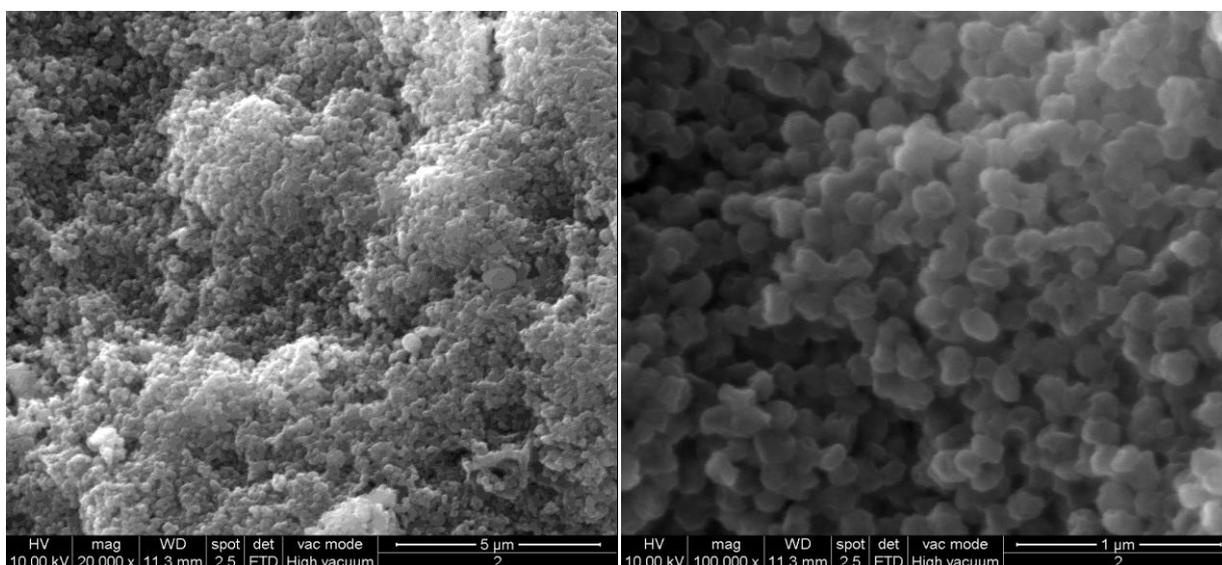


Figura 21 Immagini al SEM a diversi ingrandimenti del campione LR16

Per aumentare la percentuale di benzoato incapsulato si è scelto di aggiungere al dietiletere 10 ml di una soluzione all'1.3% di benzoato di sodio in metanolo seguendo la medesima procedura riportata nel paragrafo precedente per la sintesi LR15 relativo allo zosterato di sodio. Anche in questo caso l'eccesso di dietiletere ha perturbato l'equilibrio della miniemulsione O/W impedendo la formazione del template alla cui interfaccia reagisce il TEOS per la formazione del guscio siliceo.

### III.4 INCAPSULAMENTO DELL'ESTERE METILICO DELLO ZOSTERATO DI SODIO E CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA

Si è scelto di modificare la molecola dello zosterato di sodio per renderla più lipofila e più affine al cosolvente dell'emulsione O/W. La modifica ha riguardato il gruppo carbossilico dello zosterato di sodio perché le proprietà anti-biofouling dello zosterato di sodio, secondo quanto riportato in letteratura, dipendono dal gruppo estereo solfonato.

L'estere metilico dello zosterato di sodio è stato sciolto direttamente in dietiletere (soluzione incolore); questa soluzione è stata aggiunta alla soluzione acquosa contenente il CTAB e l'ammoniaca. La miscela, a differenza delle sintesi contenenti altri biocidi, ha acquisito una colorazione giallastra. Per comprendere il motivo di questo cambiamento cromatico, sono stati fatti dei test per valutare la stabilità dell'estere metilico al variare del pH. A pH fortemente basici ( $\geq 10$ ), come quelli che si instaurano durante la sintesi delle nanoparticelle, le soluzioni contenenti l'estere metilico virano verso il giallo. Probabilmente si verifica un effetto di coniugazione tra l'anello benzenico e la carica negativa del gruppo carbossilato formatosi per aggiunta della base.

La polvere giallastra, prodotto di questa procedura di sintesi (LR12), è stata osservata al microscopio a scansione elettronico per la caratterizzazione morfologica. L'osservazione di questo campione, malgrado la metallizzazione, è stata particolarmente difficoltosa perché si presentava fortemente impaccato (Figura 22).

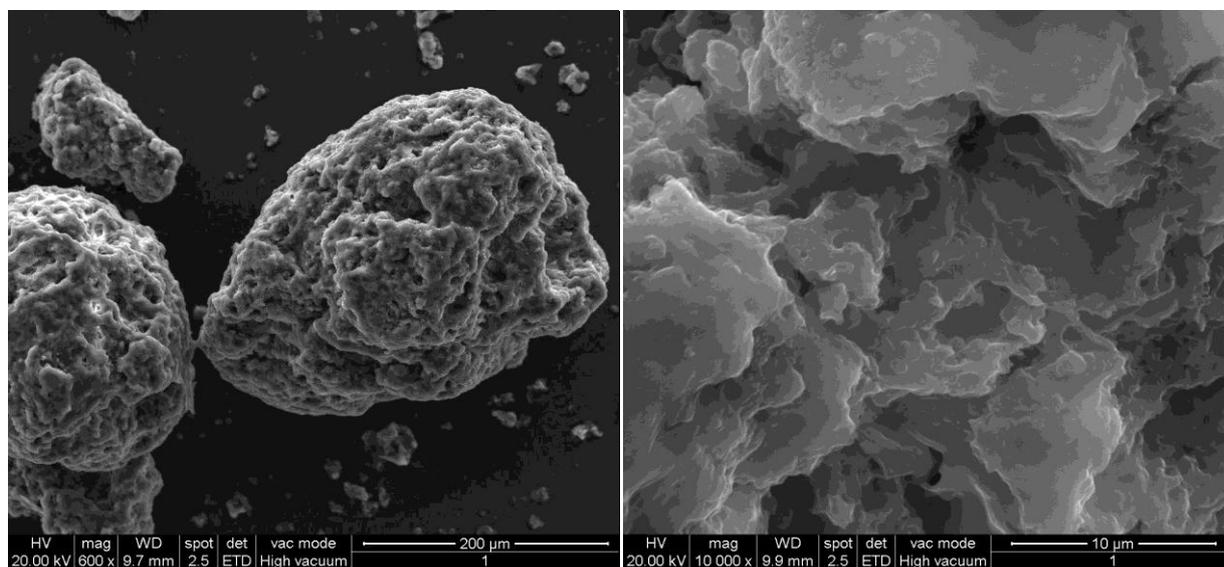


Figura 22 Immagini al SEM del campione LR12.

Per facilitare l'osservazione si è deciso preparare una sospensione del campione in acetone e di sottoporla a sonicazione per 30 minuti. Le successive osservazioni hanno permesso di sondare meglio la natura del campione: in figura 23 è possibile notare, infatti, che sono presenti nanoparticelle miste a cristalli di silice. Probabilmente questo fenomeno è dovuto al fatto che parte dell'ammoniaca, catalizzatore nella reazione di condensazione del TEOS, ha reagito con l'estere metilico dello zosterato inducendo la colorazione giallastra del prodotto finale.

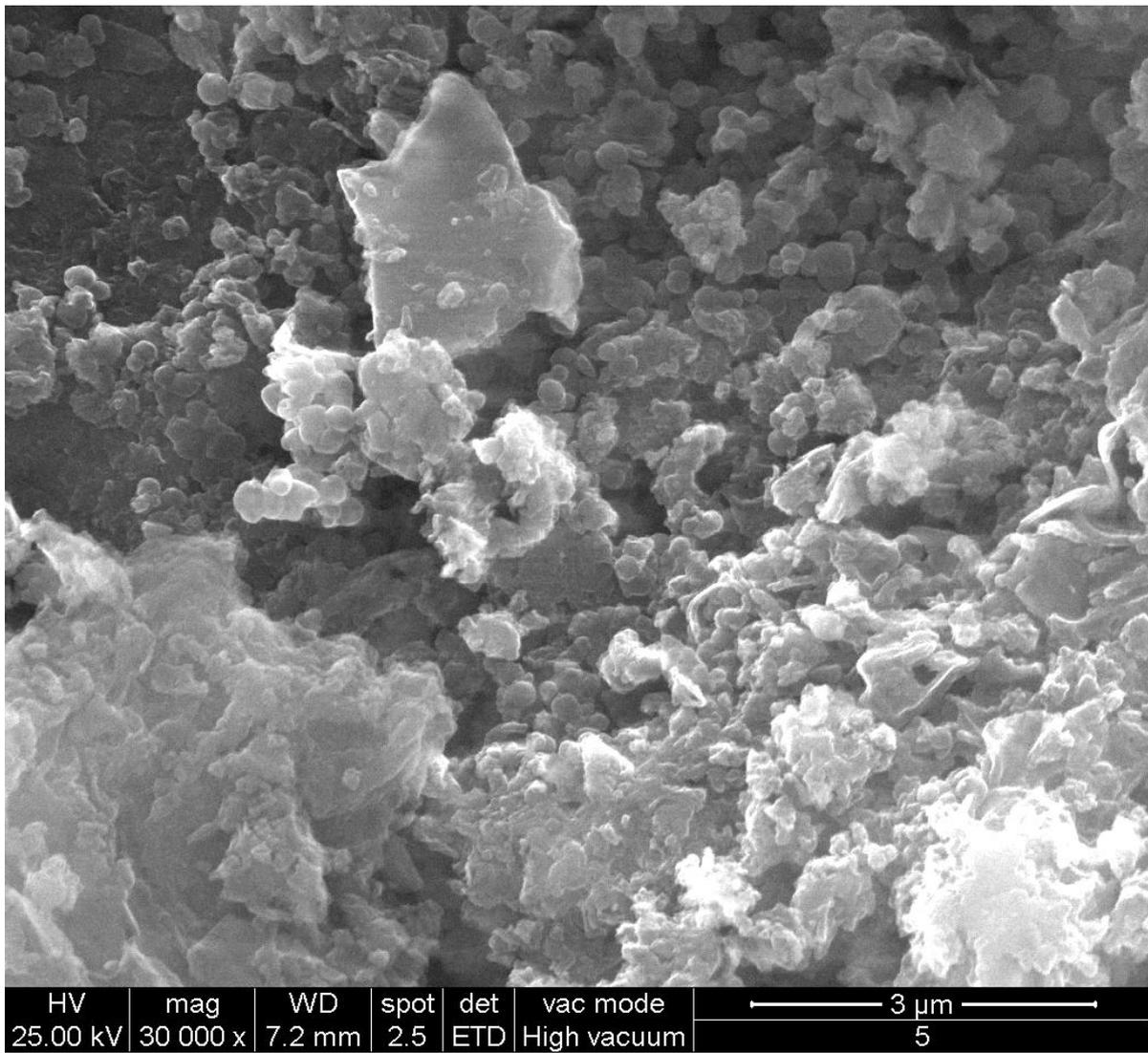


Figura 23 Immagine al SEM del campione LR12 in sospensione.

### III.4.1 ANALISI $^1\text{H-NMR}$

Il prodotto della reazione di esterificazione dello zosterato di sodio (Figura 24) descritta nel paragrafo II.6 è stato caratterizzato mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  in cloroformio deuterato (Figura 25).

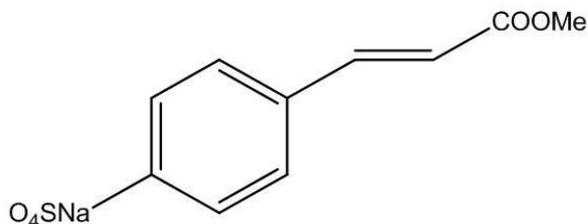


Figura 24 Estere metilico dello zosterato di sodio.

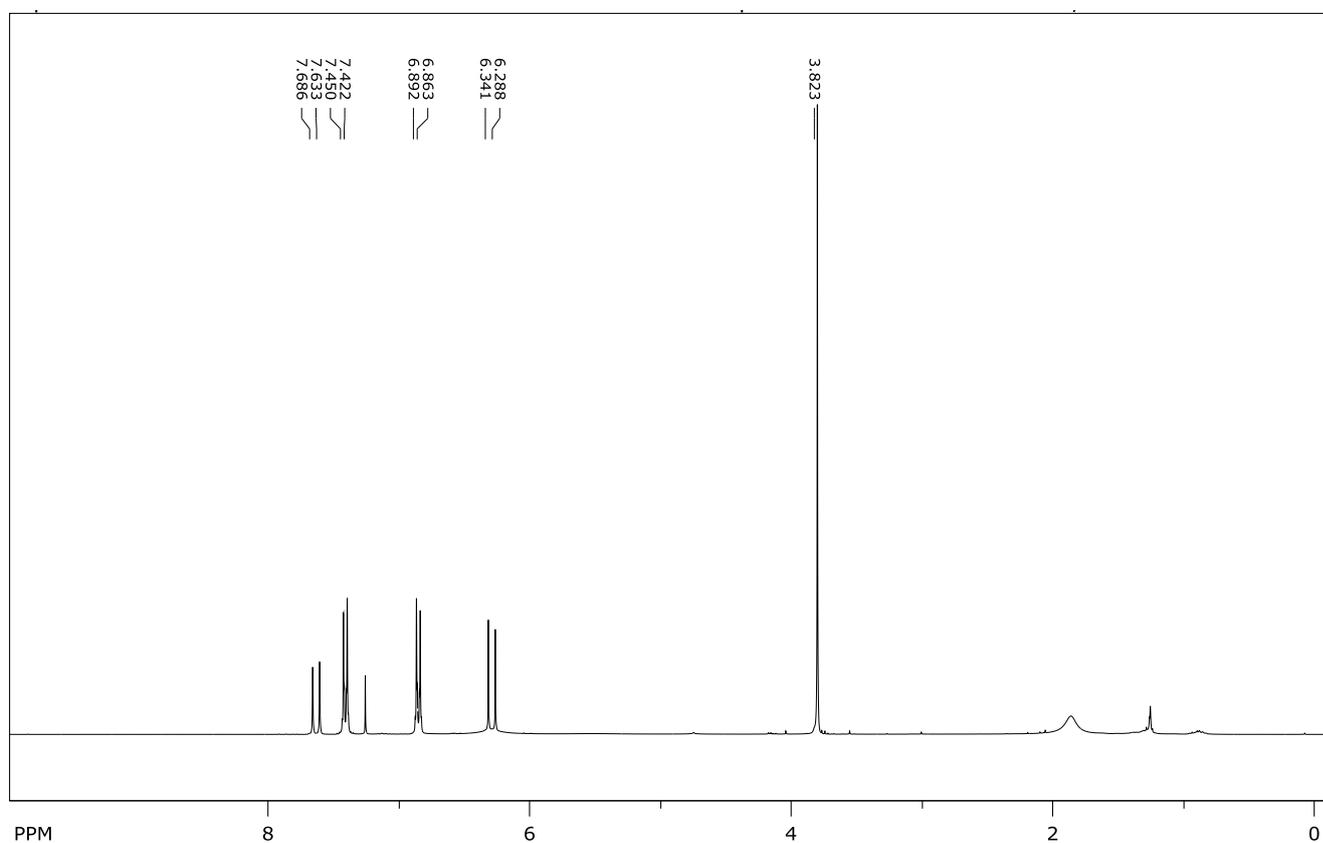


Figura 25 Spettro  $^1\text{H-NMR}$  dell'estere metilico dello zosterato di sodio.

Si osservano i doppietti a 7.65 ppm e 6.31 ppm attribuibili ai protoni arilici e i doppietti a 7.42 e 6.87 ppm attribuibili ai protoni del gruppo vinilico e soprattutto il singoletto a 3.82 ppm attribuibile ai protoni metilici del gruppo estereo. L'analisi ha quindi confermato la formazione dell'estere metilico dello zosterato sodico.

### III.5 VALUTAZIONE DELL'INCAPSULAMENTO DEI BIOCIDI

#### III.5.1 ANALISI IR

Le analisi IR sono state eseguite per confermare che il processo di incapsulamento dello zosterato di sodio, dell'estere metilico dello zosterato di sodio e del benzoato di sodio fosse avvenuto con successo.

Nello spettro FTIR riportato in figura 26, relativo alle nanoparticelle vuote non calcinate, è possibile apprezzare il contributo tipico della silice e del CTAB. In particolare:

- lo stretching Si-O-Si ( $1044\text{ cm}^{-1}$ ) e il bending del Si-O-Si ( $789\text{ cm}^{-1}$ ) [1]
- lo stretching asimmetrico dei  $\text{CH}_2$  a  $2923\text{ cm}^{-1}$ , lo stretching simmetrico dei  $\text{CH}_2$  a circa  $2853\text{ cm}^{-1}$ ; lo scissoring dei  $\text{CH}_2$  tra  $1490$  e  $1468\text{ cm}^{-1}$ ; il rocking dei gruppi  $\text{CH}_2$  a  $722\text{ cm}^{-1}$  [4].

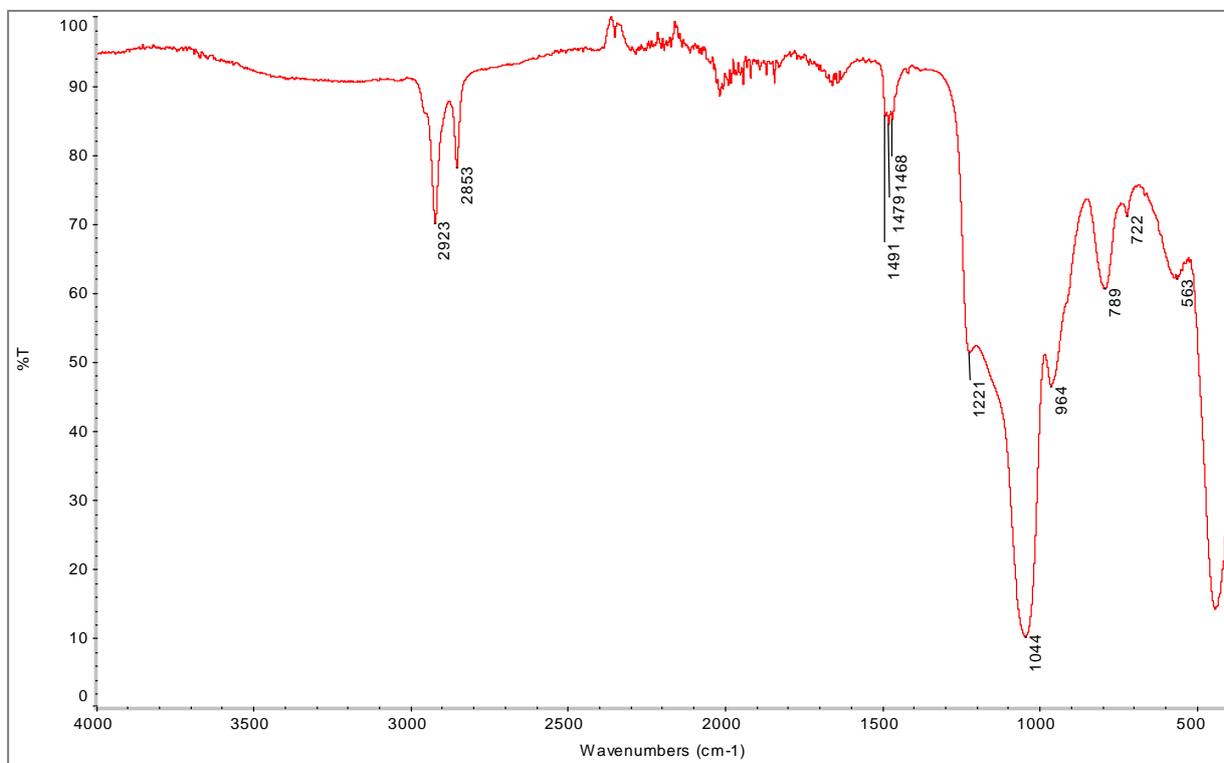


Figura 26 Spettro FTIR delle nanoparticelle non calcinate.

Come descritto nei precedenti paragrafi, una volta ottimizzata la sintesi delle nanocapsule vuote si è proceduto a caricarle con zosterato di sodio, con l'estere metilico dello zosterato di sodio e con il benzoato di sodio.

Nel caso delle nanoparticelle caricate con zosterato di sodio, la presenza di quest'ultimo è confermata dalle bande a  $1641\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ , che sono associate allo stretching del gruppo vinilico C=C e C-O benzenico, ed infine dalla banda a  $957\text{ cm}^{-1}$  (Figura 27). Il picco relativo allo stretching Si-O-Si non è centrato a  $1049\text{ cm}^{-1}$ , come nelle nanoparticelle vuote, ma a  $1028\text{ cm}^{-1}$  e questo è dovuto al fatto che il segnale di stretching di Si-O-Si si somma a quello relativo allo stretching del S=O [5].

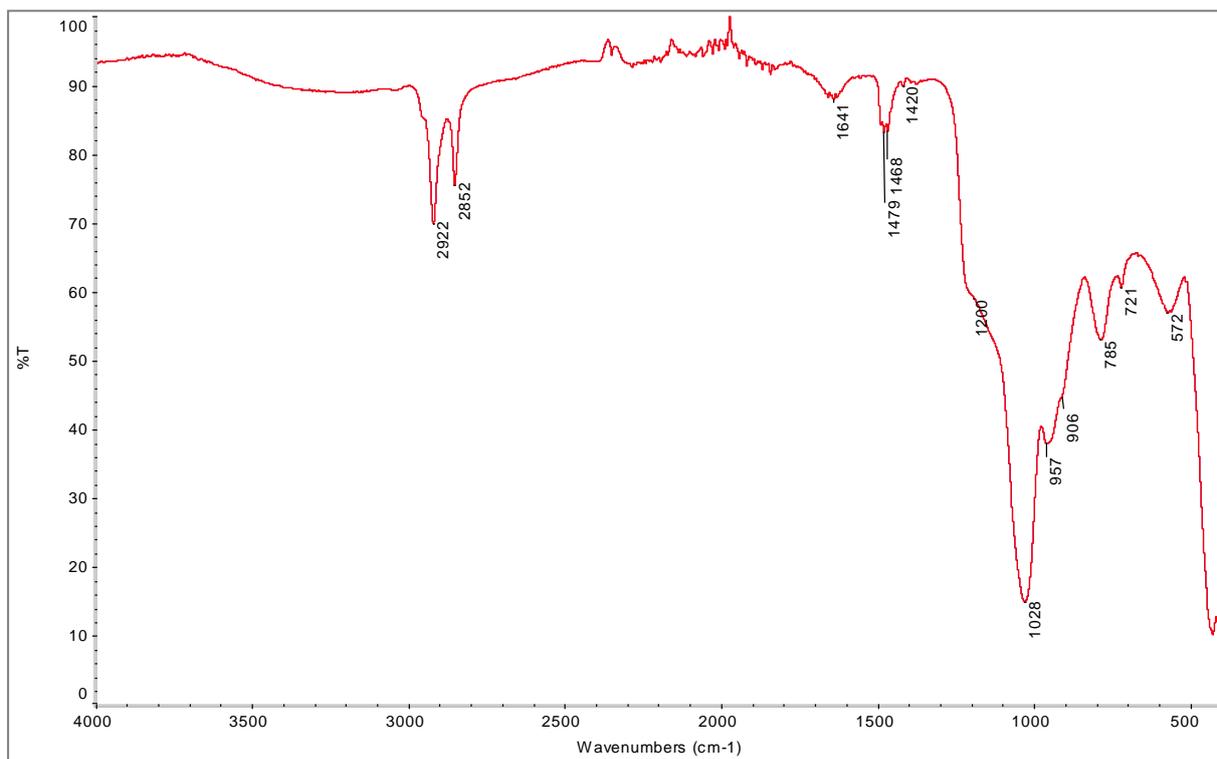


Figura 27 Spettro FTIR delle nanocapsule contenenti zosterato.

Nel caso delle nanoparticelle caricate con il benzoato di sodio, la presenza di quest'ultimo è confermata dalle bande a  $1601\text{ cm}^{-1}$ ,  $1558\text{ cm}^{-1}$  e  $1377\text{ cm}^{-1}$  che sono associate, rispettivamente, allo stretching asimmetrico e simmetrico del gruppo  $\text{COO}^-$ . A basse lunghezze d'onda si osservano due bande deboli a  $682$  e  $648\text{ cm}^{-1}$  relative al bending dei legami C-H dentro e fuori dal piano. Il picco relativo allo stretching Si-O-Si è centrato a  $1037\text{ cm}^{-1}$ , e quello del bending Si-O-Si è spostato a  $784\text{ cm}^{-1}$  (Figura 28) [6].

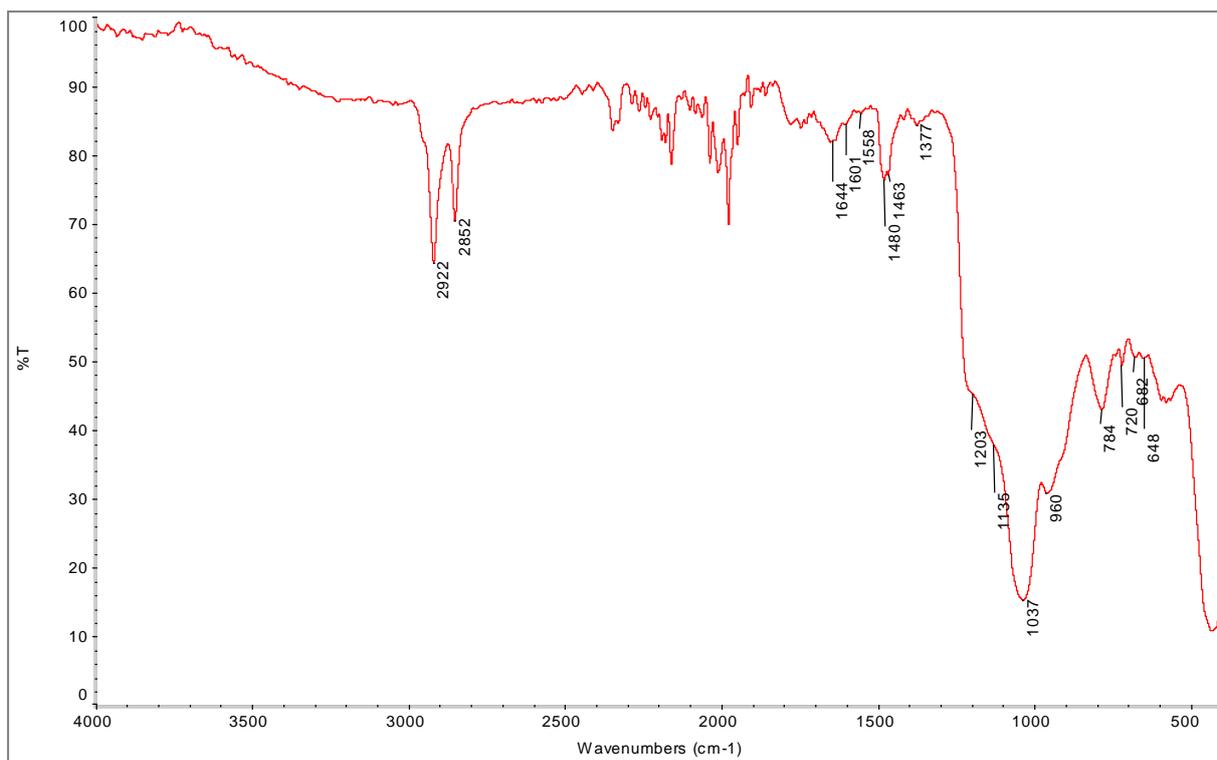


Figura 28 Spettro del campione con benzoato di sodio.

Nel caso delle nanoparticelle caricate con l'estere metilico dello zosterato di sodio, la presenza di quest'ultimo è confermata dalle bande a  $1696\text{ cm}^{-1}$  (stretching C=O),  $1626\text{ cm}^{-1}$ ,  $1582\text{ cm}^{-1}$ ,  $1201\text{ cm}^{-1}$  (stretching C-O anello benzenico),  $982\text{ cm}^{-1}$  e  $837\text{ cm}^{-1}$  (bending fuori dal piano aromatico p-sostituito). Il picco a  $1149\text{ cm}^{-1}$  è attribuibile alla vibrazione del gruppo Si-O(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) e questo dato evidenzia che parte del TEOS non si è idrolizzato [8]. Il picco relativo allo stretching Si-O-Si è centrato a  $1043\text{ cm}^{-1}$  e quello del bending Si-O-Si è spostato a  $791\text{ cm}^{-1}$  (Figura 29).

In questo ultimo campione il contributo del principio attivo è maggiormente riscontrabile. Questo risultato è attribuibile alla morfologia del campione e alla distribuzione dell'estere metilico dello zosterato di sodio; quest'ultimo, infatti, è stato solo parzialmente incapsulato e principalmente è stato adsorbito sui cristalli di silice che si sono formati a seguito dell'idrolisi-condensazione del TEOS.

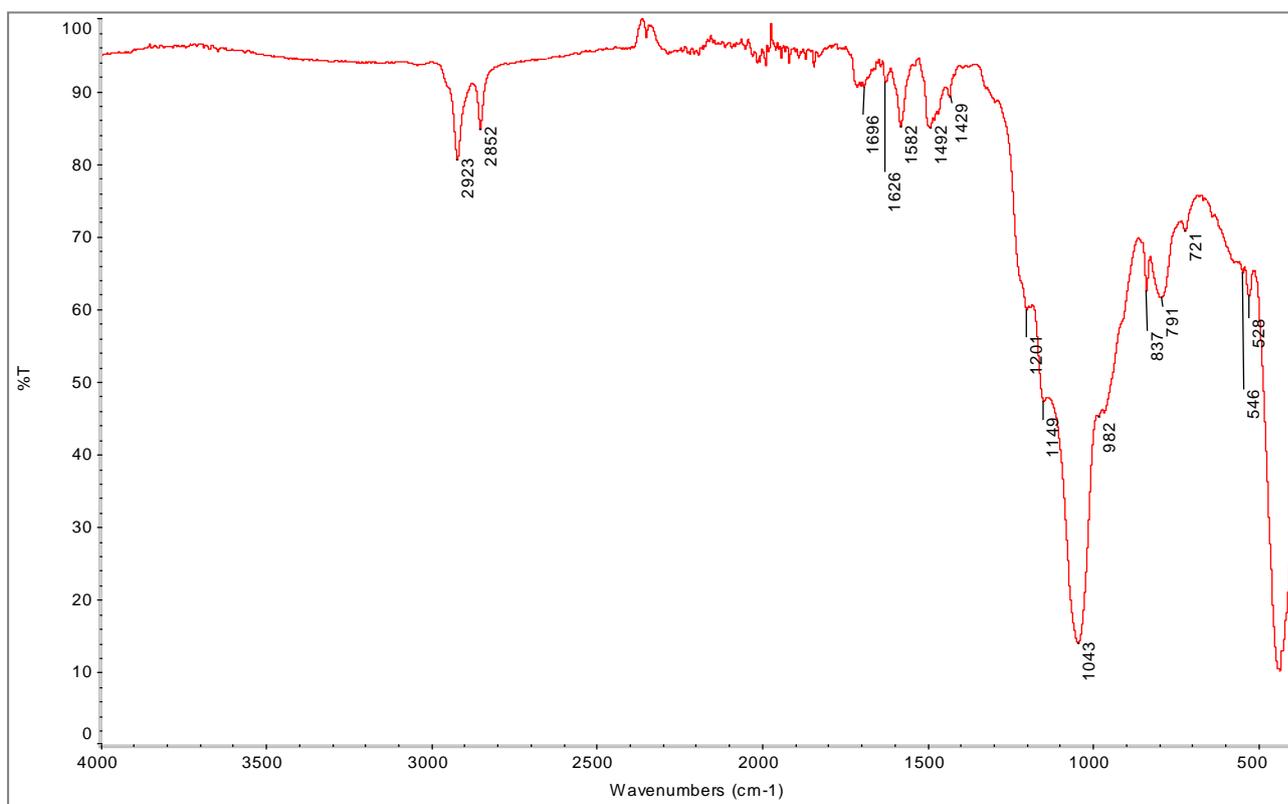


Figura 29 Spettro FTIR del campione con l'estere metilico.

In conclusione, dal confronto degli spettri delle nanocapsule con zosterato, con benzoato e con zosterato esterificato si evidenzia che nella zona tra i  $1700$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$  è possibile individuare delle bande attribuibili alle diverse sostanze attive. Nel range dai  $1300$  a  $800\text{ cm}^{-1}$  (zona di finger print) le bande relative alla silice del guscio delle nanoparticelle sono predominanti rispetto alle bande relative ai biocidi. Solo nel campione con l'estere metilico dello zosterato è ben visibile il contributo del biocida oltre a quello della silice (Figura 30).

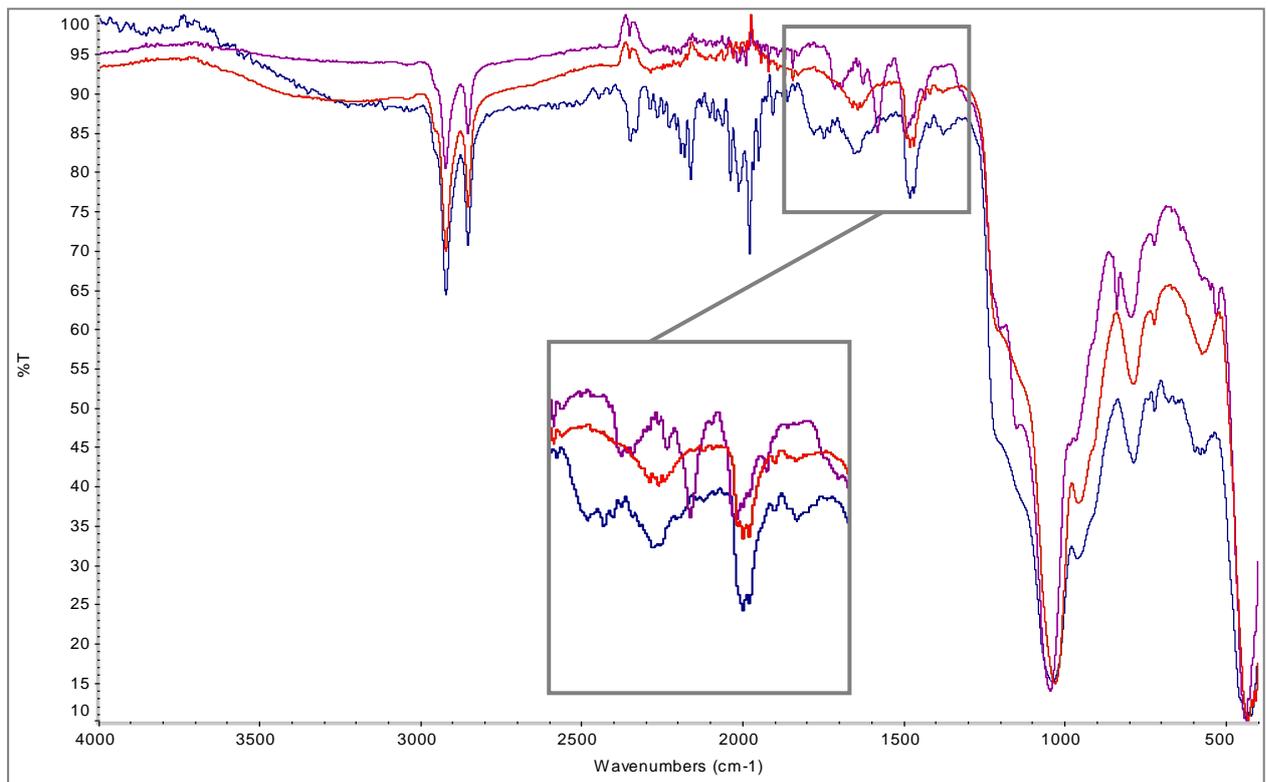


Figura 30 Confronto tra gli spettri dei campioni: LR11 (in rosso), LR16 (in blu), LR12 (in viola).

### III.5.2 ANALISI TERMOGRAVIMETRICHE

Le analisi termogravimetriche sono state eseguite per verificare la stabilità termica dei materiali sintetizzati e per determinare la quantità di principio attivo caricato nelle nanoparticelle (% in peso).

Per avere un riferimento sono stati condotti test termogravimetrici anche sulle nanoparticelle vuote calcinate per 5 ore a 550°C (campione LR9). La curva termogravimetrica (TG) del campione LR9, come atteso e verificato con dati di letteratura, non mostra significative variazioni ponderali con la temperatura. Dal confronto tra le nanoparticelle vuote calcinate e non, è possibile stimare una differenza in termini di perdita di massa pari al 30,2%. Questo dato è relativo alla degradazione del TEOS non idrolizzato e non condensato e a quantità residue di tensioattivo (Figura 31).

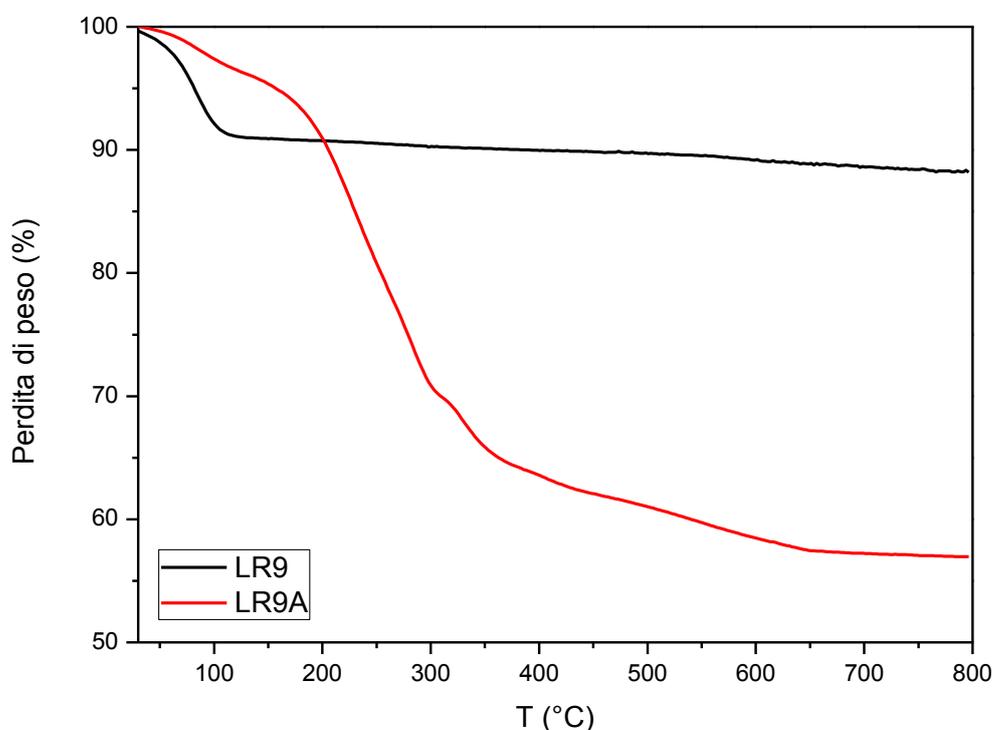


Figura 31 Profili TG delle nanoparticelle calcinate (campione LR9) e delle nanoparticelle non calcinate (campione LR9A).

Le curve relative alle nanoparticelle contenenti lo zosterato di sodio (campione LR11) e il benzoato di sodio (campione LR16) mostrano un profilo simile; per questo in tabella 11 sono riportate le perdite di peso espresse in termini percentuali e il range di temperatura a cui si verificano. Le perdite di peso iniziano prima dei 100°C e sono dovute al desorbimento di acqua e dai 100°C ai 300°C si ha una graduale perdita di peso. In quest'ultimo range di temperature si verifica la rimozione delle frazioni organiche come confermato dai punti di fusione dei composti coinvolti in questi processi di sintesi:

- CTAB → 237°C
- Acido zosterico → 260°C

- Benzoato di sodio → 300°C

Tra i 300 e i 500°C si verifica la combustione dei gruppi etossilici non reagiti relativi al TEOS e la decomposizione di residui di molecole organiche.

Tabella 11 Confronto delle perdite di peso dei campioni LR9A, LR11 e LR16

PERDITA DI PESO (%)			RANGE TEMPERATURA (°C)
LR9A	LR11	LR16	
2.83	4.07	2.55	30-100
26.48	27.28	28.61	110-300
6.20	6.59	7.72	300-390
7.45	7.79	6.30	390-690

Per il campione LR11 la perdita di massa complessiva è pari al 45,2%, mentre per il campione LR16 è pari al 44,6%. La differenza tra la perdita di peso dei nanocontenitori vuoti (LR9A) e caricati con il biocida può essere utilizzata per stimare la quantità di principio attivo caricato nelle capsule: nel caso del campione LR11 è pari al 3,2%, mentre per il campione LR16 è pari al 2,6% (Figura 32).

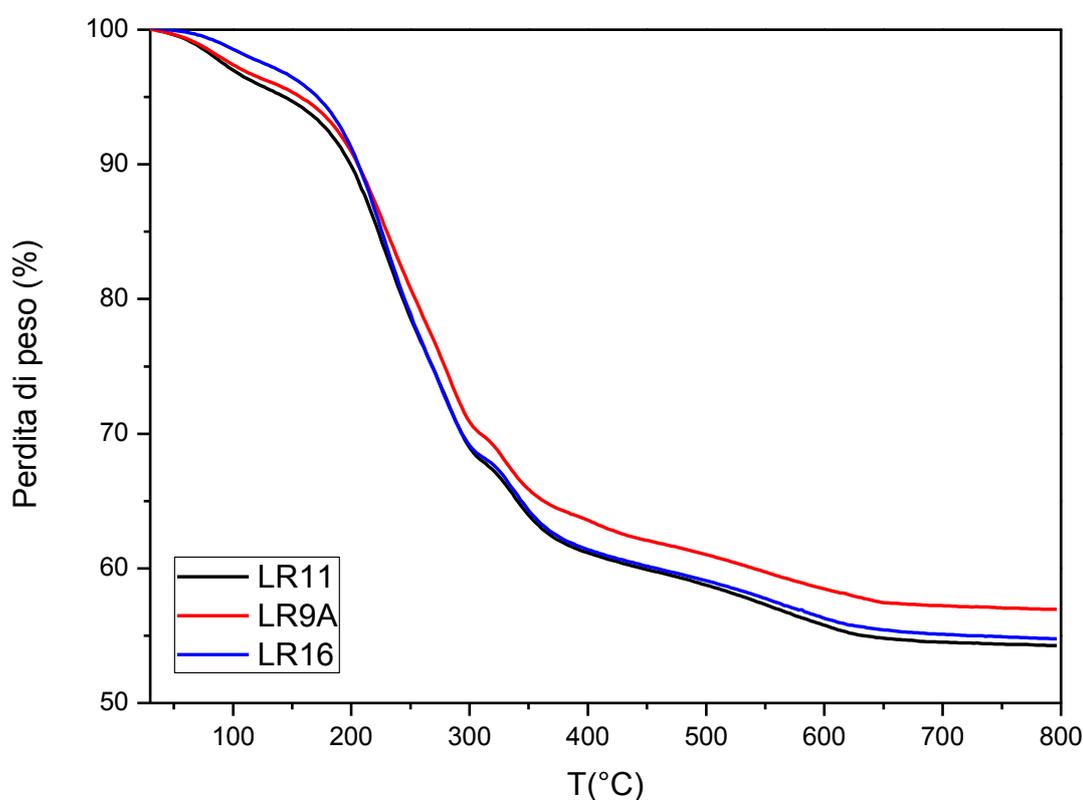


Figura 32 Profilo TG delle nanoparticelle caricate con zosterato di sodio (LR11), delle nanoparticelle caricate con benzoato di sodio (LR16) e le nanoparticelle vuote non calcinate (LR9A).

Il termogramma del campione relativo allo zosterato di sodio esterificato (LR12), riportato in figura 33, ha un andamento complessivo diverso rispetto al profilo delle nanocapsule vuote (LR9A); inoltre il materiale mostra una stabilità termica maggiore visto che la prima perdita di peso considerevole si registra a circa 200°C (Tabella 12).

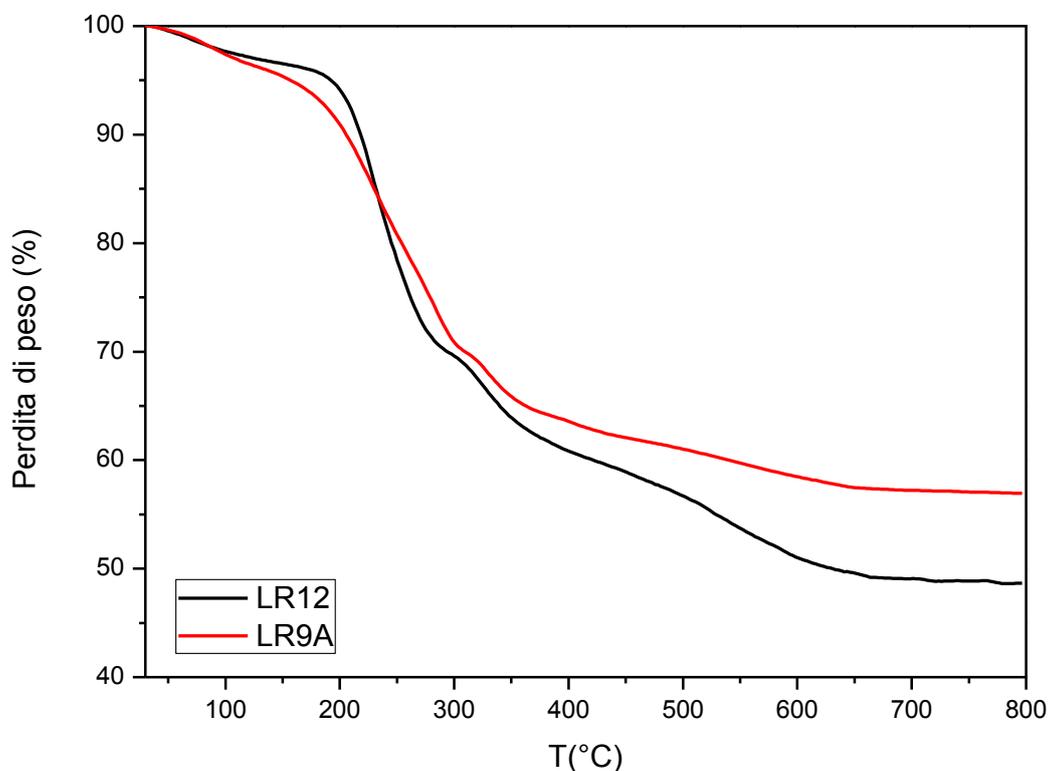


Figura 33 Profilo TG del campione LR12 a confronto con il profilo del campione LR9A.

Questa differenza in termini di stabilità termodinamica può essere attribuita alla diversa morfologia del campione, parametro che gioca un ruolo importante nelle misure termogravimetriche perché influenza:

- la velocità e l'omogeneità di trasmissione del calore dalla fornace al campione
- la velocità di diffusione dei prodotti di decomposizione e di conseguenza il decorso della reazione di decomposizione.

Tabella 12 Perdite di peso del campione LR12

PERDITA DI PESO (%)	RANGE DI TEMPERATURA (°C)
4.59	30-200
24.45	200-300
8.27	300-360
13.89	360-680
0.51	680-800

Le osservazioni al SEM, riportate nel paragrafo III.3, evidenziano che questo campione ha una morfologia disomogenea con materiale cristallizzato e con nanoparticelle. Facendo la differenza tra la perdita di peso complessiva del campione LR9A e quella del campione LR12 si ottiene un valore pari al 10%, che si può considerare relativo allo zosterato esterificato adsorbito sulla silice e incorporato nelle nanocapsule formatesi.

### III.5.3 PROVE DI RILASCIO

Le prove di rilascio sono state effettuate per quantificare il principio attivo caricato nelle nanoparticelle e per studiare in quanto tempo i diversi principi attivi vengono rilasciati in etanolo.

Prima di iniziare le prove di rilascio è stato registrato lo spettro di assorbimento UV-Vis dei principi attivi (benzoato di sodio, estere metilico dello zosterato di sodio e CTAB) in etanolo come riportato in figura 34.

Lo spettro UV-Vis del benzoato di sodio è caratterizzato da due picchi ben definiti a 205 e 223 nm e una spalla centrata a 279 nm. Lo zosterato di sodio esterificato in etanolo presenta uno spettro con due picchi nella regione tra i 200 e 250 nm, rispettivamente a 211 e 229 nm e una banda di assorbimento, nella regione tra i 250 e 350 nm, centrata a 313nm.

La sintesi delle nanoparticelle ha previsto l'utilizzo del CTAB come tensioattivo cationico funzionale alla formazione delle micelle; malgrado la procedura di lavaggio del materiale di sintesi sia stata standardizzata e abbia previsto l'uso di etanolo per favorire l'eliminazione del tensioattivo stesso, non si può escludere la presenza di residui. Alla luce di queste considerazioni si è ritenuto necessario registrare lo spettro del CTAB che mostra un picco di assorbimento intenso a 212 nm e una spalla centrata a 272 nm.

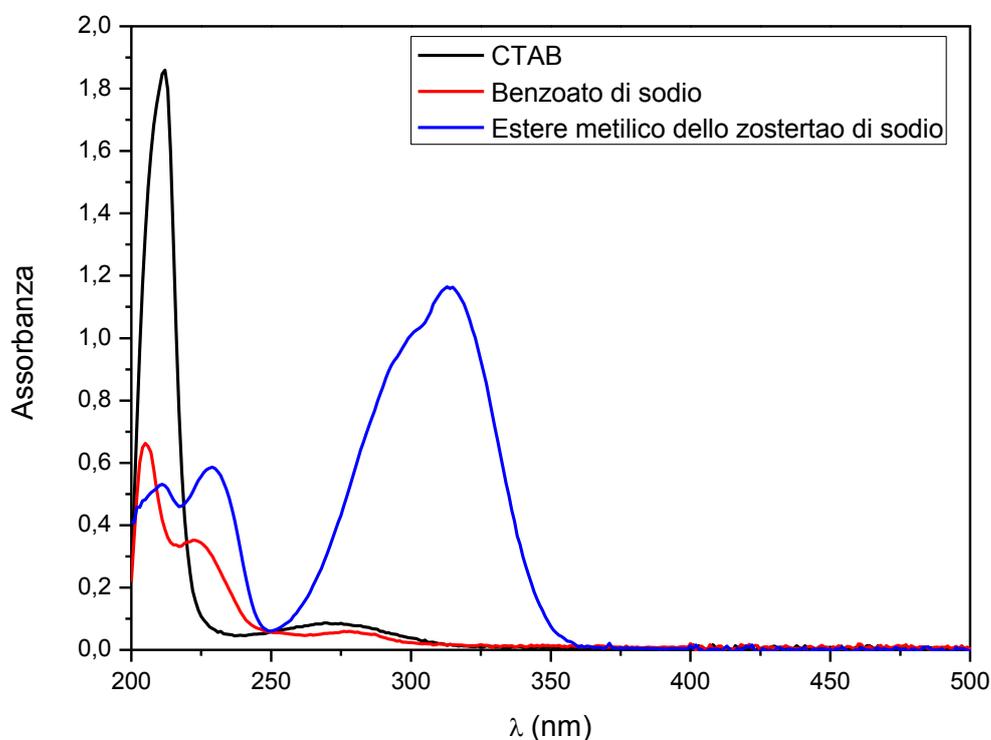


Figura 34 Spettri di assorbimento UV-Vis del CTAB, dello zosterato esterificato, del benzoato di sodio.

Durante la fase di sintesi, l'ambiente di reazione è basico per la presenza dell'ammoniaca che svolge il ruolo di catalizzatore per l'idrolisi e la condensazione del TEOS, precursore della silice. Si è ritenuto, dunque, necessario verificare se l'aggiunta di poche gocce di una soluzione acquosa di NaOH (0,1M) inducesse un cambiamento nello spettro di assorbimento dello zosterato di sodio in etanolo per effetto di un aumento di pH. Rispetto allo spettro dello zosterato di sodio in etanolo lo spettro registrato in ambiente basico subisce uno shift ipsochromo della banda a 284 nm che passa a 273 nm e presenta una spalla a 337 nm (Figura 35) [7].

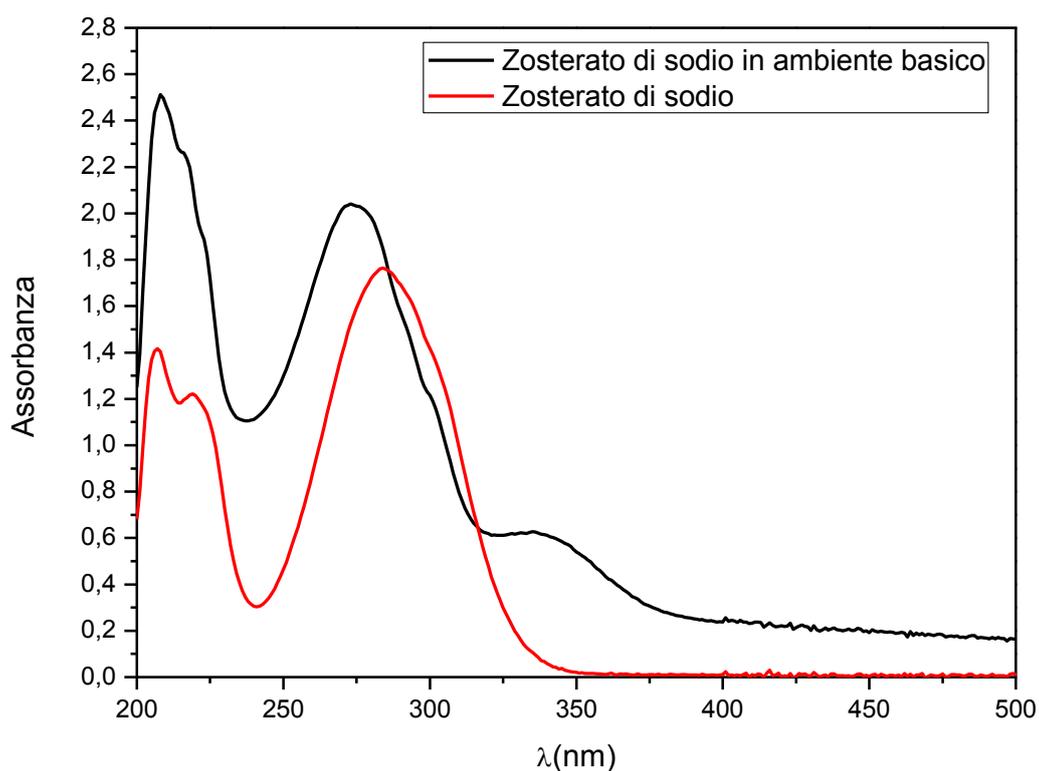


Figura 35 Spettro di assorbimento UV-Vis dello zosterato di sodio in etanolo e con aggiunta di soluzione acquosa 0,1M di NaOH.

Il processo di rilascio è stato monitorato seguendo il cambiamento dell'assorbanza tra i 200-650 nm. Si è scelto di monitorare l'assorbanza del picco a 269 nm, malgrado non fosse il più intenso in termini relativi, perché si ipotizza che l'assorbanza del picco a 208 nm possa contenere anche il contributo del CTAB. Come mostrato in figura 36, lo zosterato di sodio rilascia in etanolo senza alcun dubbio.

Il processo di rilascio inizialmente procede in modo relativamente veloce e quasi il 53% di zosterato di sodio è rilasciato dopo 60 minuti. Il processo di rilascio gradualmente rallenta e si livella dopo 26 h indicando che è stato raggiunto un equilibrio.

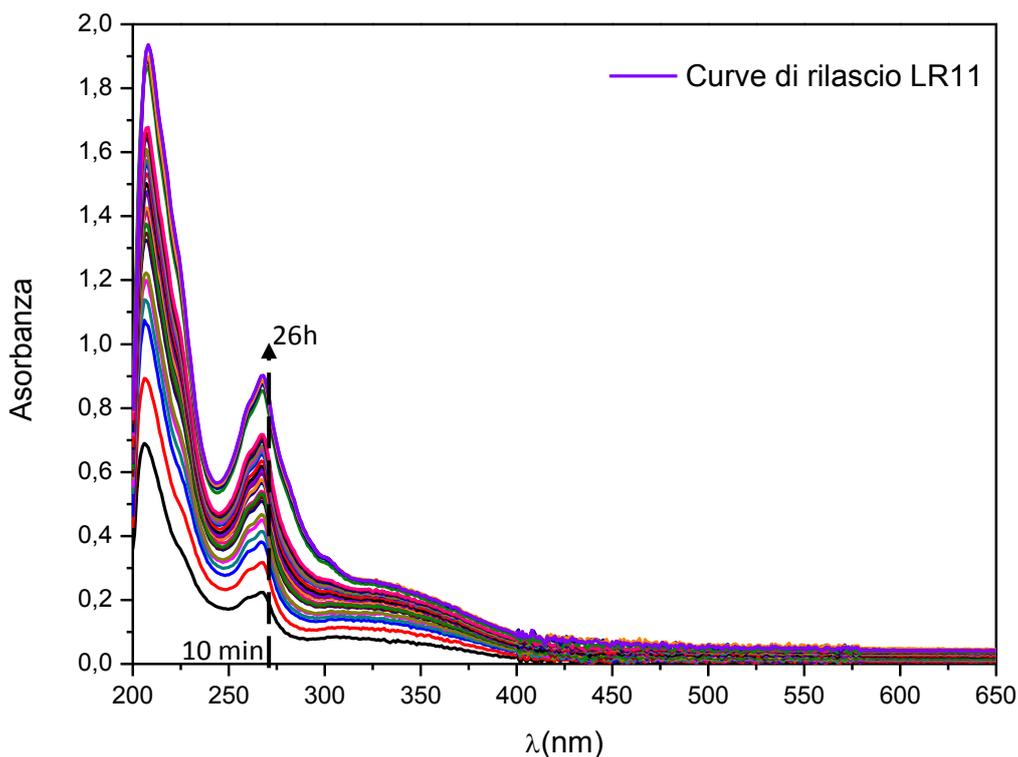
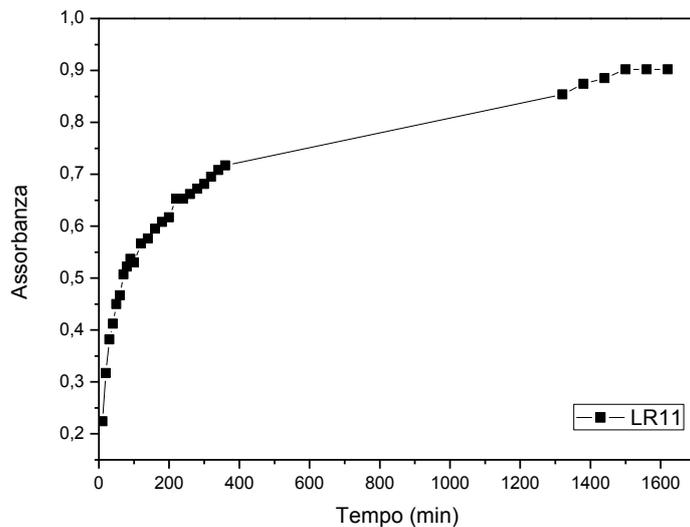


Figura 36 Spettri UV-VIS a differenti tempi in etanolo nel quale lo zosterato di sodio è rilasciato dalle nanoparticelle di silice.

Il rilascio cumulativo normalizzato, riportato in figura 37, è stato calcolato secondo la seguente equazione:

$$\text{Rilascio cumulativo (\%)} = \text{Abs}_t / \text{Abs}_{\text{max}} * 100$$

(dove  $\text{Abs}_{\text{max}}$  è l'assorbanza del picco a 267 nm registrata a 26 h, dopo le quali l'intensità del picco non cambia di molto e  $\text{Abs}_t$  è l'assorbanza dello stesso picco registrata al tempo t)



TEMPO (min)	RILASCIO CUMULATIVO (%)
30	43.06
60	52.65
120	63.93
240	73.95

Figura 37 Profilo di rilascio relativo agli spettri UV-Vis a differenti tempi riportati in figura 36; la tabella sulla destra schematizza la cinetica del processo di rilascio.

Questi risultati evidenziano che è stato realizzato l'incorporamento del biocida e che il suo rilascio avviene in modo controllato. Il rilascio procede mediante un meccanismo di diffusione delle molecole *guest* nel mezzo.

Per calcolare la quantità di biocida rilasciato è stato necessario costruire una retta di calibrazione. Si è proceduto a registrare lo spettro UV-Vis di 6 standard a concentrazione nota (2, 5, 7, 10, 12 mg/L) basificati con 12 gocce di una soluzione acquosa 0,1M di NaOH. Il fitting lineare della retta Assorbanza vs Concentrazioni ha permesso di estrapolare l'equazione della retta che è stata utilizzata per calcolare la concentrazione di zosterato di sodio rilasciato: 17,86 mg/L (Figura 38). Questo valore corrisponde alla quantità di zosterato di sodio rilasciato da 15mg di campione in 5 ml di etanolo durante le 26 h di monitoraggio.

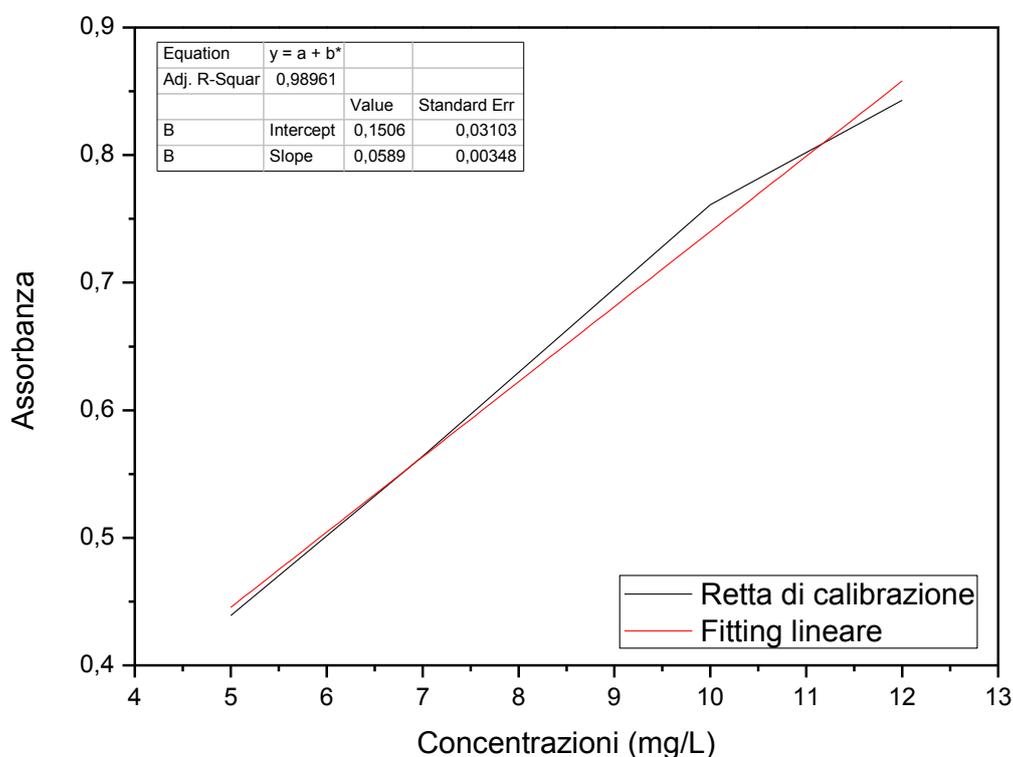


Figura 38 Retta di calibrazione dello zosterato di sodio.

Il rilascio dell'estere metilico dello zosterato di sodio è stato valutato disperdendo il campione LR12 in etanolo. Il processo di rilascio è stato monitorato seguendo il cambiamento dell'assorbanza del mezzo, ma è stato necessario utilizzare una maggior quantità di etanolo (50 ml) per evitare di saturare il segnale già dopo i primi 10 minuti. In questo caso si è scelto di monitorare la variazione di assorbanza del picco a 313 nm (Figura 39).

Il processo di rilascio procede molto velocemente e già dopo 10 minuti più del 67% dell'estere metilico è stato rilasciato in etanolo, come evidenziato dai valori riportati in figura 40.

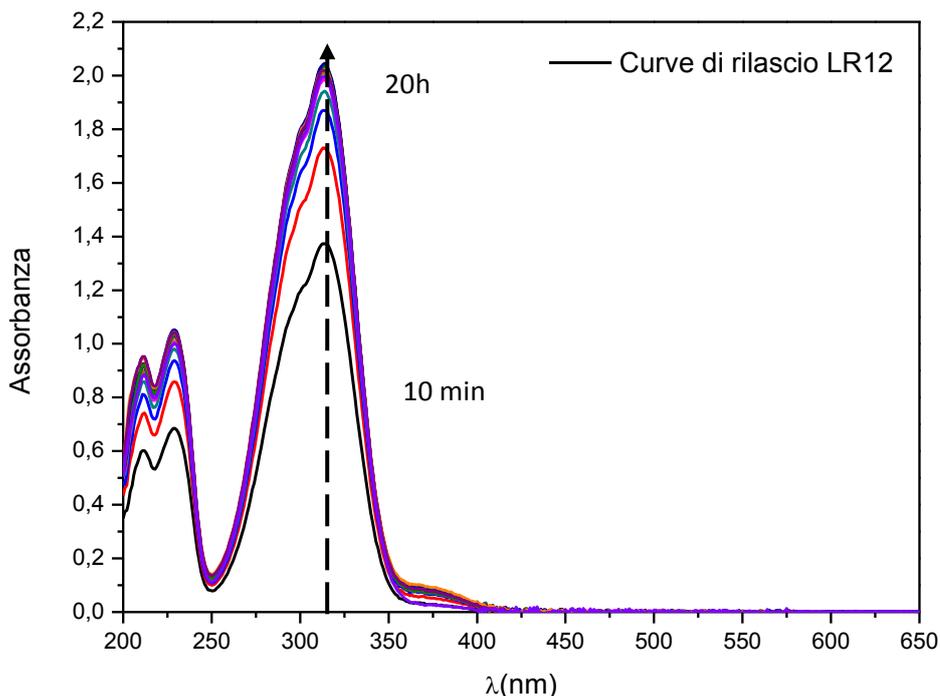
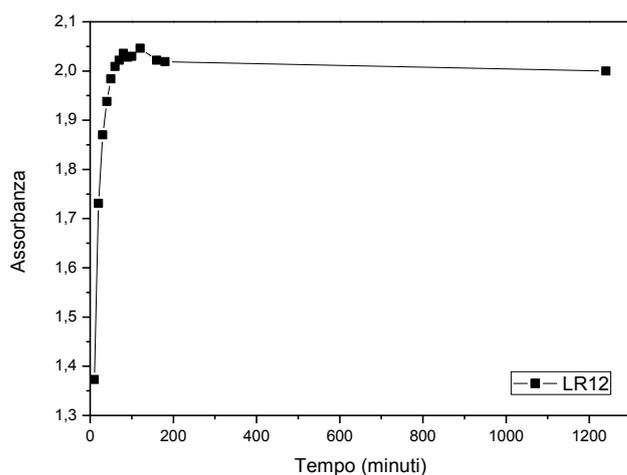


Figura 39 Spettri UV-VIS a differenti tempi in etanolo nel quale lo zosterato esterificato è rilasciato dal campione.

Questa notevole differenza con il profilo di rilascio dello zosterato di sodio è da imputare principalmente alla differente morfologia del campione e alla maggiore solubilità dell'estere metilico in etanolo. Nel caso dello zosterato di sodio il rilascio avviene per diffusione dalle nanoparticelle, nel caso del campione LR12 l'estere non deve diffondere dalle nanoparticelle perché è in parte adsorbito sulla silice.



TEMPO (min)	RILASCIO CUMULATIVO (%)
10	67.10
30	84.60
60	96.97

Figura 40 Profilo di rilascio relativo agli spettri UV-Vis a differenti tempi riportati in figura 39; la tabella sulla destra schematizza la cinetica del processo di rilascio.

Per calcolare la quantità di biocida rilasciato, anche in questo caso, è stato necessario costruire una retta di calibrazione. Si è proceduto a registrare lo spettro UV-Vis di 5 standard a concentrazione nota (5, 10, 15, 20, 25 mg/L). Il fitting lineare della retta Assorbance vs

Concentrazione ha permesso di estrapolare l'equazione della retta che è stata utilizzata per calcolare la concentrazione dell'estere metilico dello zosterato rilasciato: 15,97 mg/L (Figura 41). Questo valore corrisponde alla quantità principio attivo rilasciato da 7 mg di campione in 50 ml di etanolo.

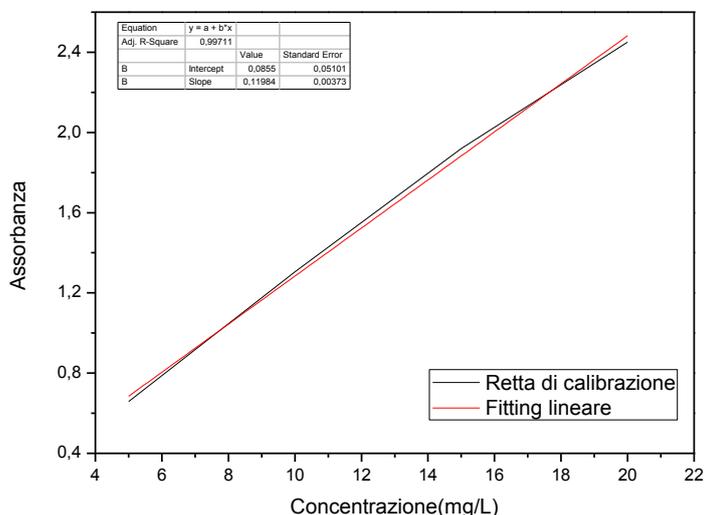


Figura 41 Retta di calibrazione dell'estere metilico dello zosterato di sodio.

Il rilascio controllato del benzoato di sodio è stato studiato disperdendo le nanocapsule contenenti il principio attivo in etanolo. Il processo di rilascio è stato monitorato seguendo le variazioni dell'assorbanza nel range tra i 200-650 nm. In questo caso si è scelto di monitorare l'assorbanza del picco a 223 nm.

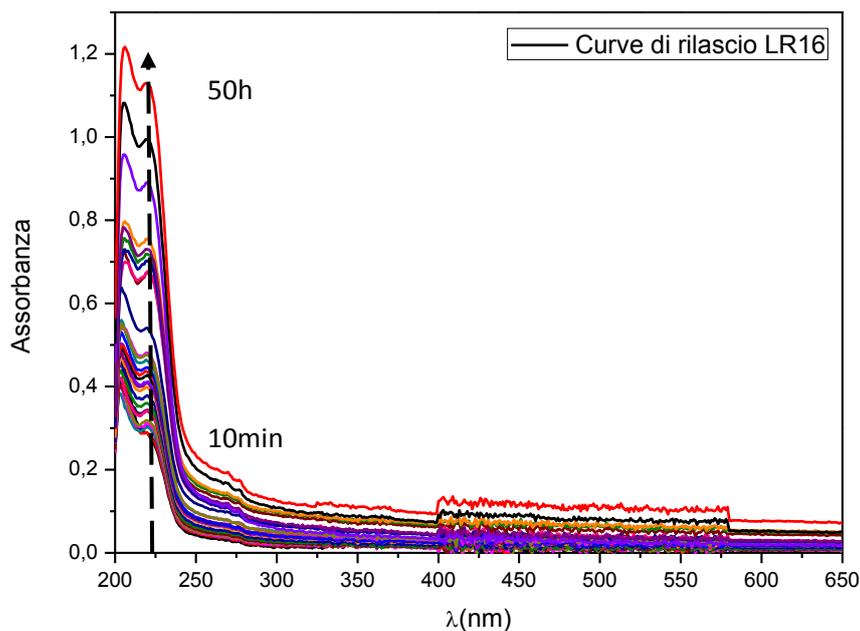


Figura 42 Spettri UV-VIS a differenti tempi in etanolo nel quale il benzoato di sodio è rilasciato dal campione.

Come mostrato in figura 42, il benzoato di sodio è rilasciato in etanolo lentamente; infatti, dopo i primi 60 minuti solo il 36% di benzoato di sodio è stato rilasciato. Il processo di rilascio gradualmente rallenta, ma dopo 50 h di monitoraggio non ha ancora raggiunto un valore di equilibrio, come evidenziato dai valori riportati in figura 43.

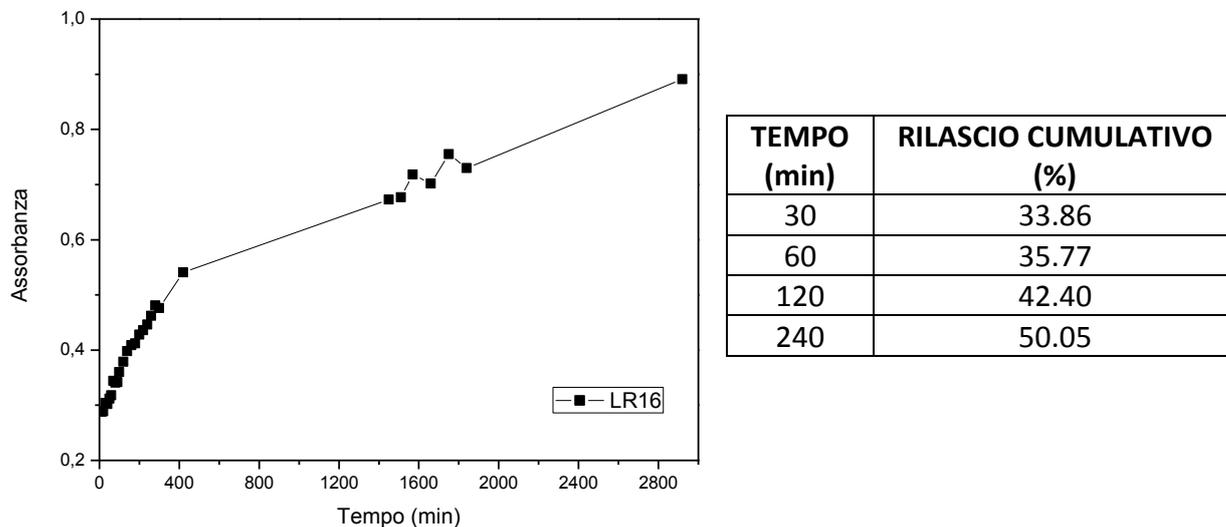


Figura 43 Profilo di rilascio relativo agli spettri UV-Vis a differenti tempi riportati in figura 42; la tabella sulla destra schematizza la cinetica del processo di rilascio.

Per calcolare la quantità di biocida rilasciato, anche in questo caso è stata costruita una retta di calibrazione usando 5 standard a concentrazione nota (1, 3, 5, 10, 15 mg/L). Il fitting lineare della retta ha permesso di calcolare la concentrazione del benzoato di sodio rilasciato: 19,97 mg/L (Figura 44). Questo valore corrisponde alla quantità di principio attivo rilasciato da 21,2 mg di campione in 5 ml di etanolo.

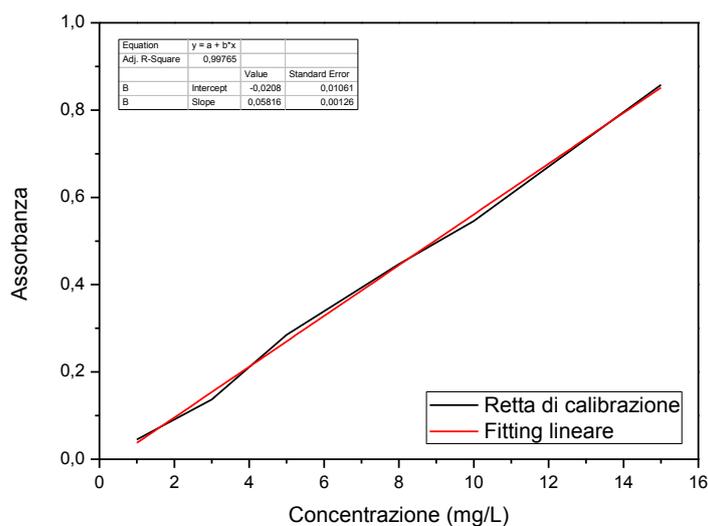


Figura 44 Retta di calibrazione del benzoato di sodio.

Per poter confrontare le concentrazioni ricavate dalle misure di rilascio con i dati ottenuti dalle misure termogravimetriche, il dato in mg/L è stato espresso in termini percentuali secondo le operazioni riportate in tabella 13:

Tabella 13

	<b>CONCENTRAZIONE IN mg</b>	<b>PRINCIPIO ATTIVO RILASCIATO IN RAPPORTO ALLA QUANTITÀ DI CAMPIONE</b>	<b>PERCENTUALE DI PRINCIPIO ATTIVO RILASCIATO</b>
<b>LR11</b>	$(17,86 \text{ mg/L} * 5 \text{ ml})/1000 = 0,1$	$(0,1 \text{ mg}/15 \text{ mg})$	0,67%
<b>LR12</b>	$(15,97 \text{ mg/L} * 50 \text{ ml})/1000 = 0,8$	$(0,8 \text{ mg}/7 \text{ mg})$	11,4%
<b>LR16</b>	$(19,76 \text{ mg/L} * 5 \text{ ml})/1000 = 0,1$	$(0,1 \text{ mg}/21,2 \text{ mg})$	0,48%

Il campione con maggior rilascio percentuale è il campione LR12 e questo è attribuibile alla morfologia del campione stesso; le immagini al SEM infatti hanno evidenziato che non tutta la silice forma nanoparticelle e che è presente della silice cristallizzata. L'estere dello zosterato di sodio dunque è stato rilasciato dal materiale molto rapidamente, come evidenziato dai valori riportati in tabella 14 senza dover superare la barriera costituita dalle nanocapsule. Inoltre, questo prodotto di sintesi ha una maggiore affinità per il solvente usato nelle prove di rilascio rispetto agli altri due principi attivi.

Le analisi termogravimetriche relative alle nanoparticelle con zosterato di sodio (LR11) evidenziano che il processo di sintesi ha permesso di caricarne il 3,2%; i test di rilascio in etanolo evidenziano che del 3,2% caricato ne è stato rilasciato lo 0,67% dopo 28 h.

La sintesi delle nanocapsule contenenti benzoato di sodio (LR16) ha portato ad un materiale caricato con il 2,6% di principio attivo secondo i dati termogravimetrici. I test di rilascio mostrano che del 2,6% di principio attivo ne è stato rilasciato lo 0,48% dopo 50 h.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Maia, J. Tedim, A.D. Lisenkov, A.N. Salak, M.L. Zheludkevich, M.G. Ferreira, *Silica nanocontainers for active corrosion protection*, *Nanoscale* (2012), 4, 1287–1298.
- [2] F. Maia, A. P. Silva, S. Fernandes, A. Cunha, A. Almeida, J. Tedim, M.L. Zheludkevich, M.G.S. Ferreira, *Incorporation of biocides in nanocapsules for protective coatings used in maritime applications*, *Chemical Engineering Journal* (2015), 270, 150–157.
- [3] H. Chen, J. He, H. Tang, C. Yan, *Porous Silica Nanocapsules and Nanospheres: Dynamic Self-Assembly Synthesis and Application in Controlled Release*, *Chem. Mater.* (2008), 20, 5894–5900.
- [4] G. Sponchia, R. Marin, I. Freris, M. Marchiori, E. Moretti, L. Storaro, P. Caton, A. Lausi, A. Benedetti, P. Riello, *Mesoporous silica nanoparticles with tunable pore size for tailored gold nanoparticles*, *J Nanopart Res* (2014), 16, 2245.
- [5] R.B. Viana, A.B.F. da Silva, A.S. Pimentel, *Infrared Spectroscopy of Anionic, Cationic, and Zwitterionic Surfactants*, *Advances in Physical Chemistry* (2012), 2012.
- [6] D. Barsotti, *Nuovi sistemi a base di silice con potenziali proprietà antivegetative*, Università Ca' Foscari di Venezia, Relatore Prof.ssa Elisabetta Zendri, Tesi di Laurea Magistrale in Scienze chimiche per la conservazione e il restauro, A.A. 2012-2013.
- [7] N. Kumar, S. Thomas, R.B. Tokas, R.J. Kshirsagar, *Investigation on the adsorption characteristics of sodium benzoate and taurine on gold nanoparticle film by ATR-FTIR spectroscopy*, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* (2014), 118, 614-8.
- [8] R.F.S. Lenza, W.L. Vasconcelos, *Structural Evolution of Silica Sols Modified with Formamide*, *Materials Research*(2001), 4(3), 175-179.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

L'obiettivo di questa tesi è stato la sintesi e la caratterizzazione di nanoparticelle di silice contenenti biocidi a rilascio controllato, da utilizzare nel settore della conservazione delle superfici architettoniche. Si è cercato di combinare due linee di ricerca estremamente innovative:

- 1) l'utilizzo di un agente anti-biofouling ecocompatibile quale lo zosterato di sodio
- 2) un metodo di incapsulamento ad uno solo step che prevede un assemblaggio self-assembly

La sintesi di nanoparticelle in silice ha previsto l'utilizzo del metodo del self-assembly che combina la stabilizzazione della condensazione del TEOS (precursore della silice) con l'assemblaggio dinamico. E' stato utilizzato il dietilere come cosolvente che non solo ha svolto il ruolo di template dinamico per la formazione delle nanocapsule, ma ha anche giocato un ruolo fondamentale nella formazione dei pori del guscio durante la fase di evaporazione. Il dietilere ha il vantaggio di essere rimosso facilmente, a causa del suo basso punto di ebollizione, senza dover ricorrere a successivi step di calcinazione o estrazione per rimuovere il template e ottenere nanocapsule vuote.

Questa procedura di sintesi è stata utilizzata per incapsulare tre differenti principi attivi:

- 1) lo zosterato sodico, prodotto innovativo e non disponibile in commercio
- 2) l'estere metilico dello zosterato sodico, sintetizzato al fine di ottenere una molecola con un grado di lipofilità maggiore rispetto allo zosterato sodico
- 3) il benzoato di sodio, prodotto commerciale ampiamente utilizzato come biocida in molti settori dai beni culturali ai conservanti alimentari.

Prima di ottenere le nanocapsule è stato necessario ottimizzare la sintesi, verificando le concentrazioni riportate in letteratura, le modalità e le tempistiche di aggiunta di ogni componente.

Lo zosterato di sodio è stato incorporato con successo nelle nanoparticelle di silice (LR11). Queste ultime sono termicamente stabili, con una forma regolare e un diametro di circa 400 nm. La quantità di zosterato di sodio incorporato è stata stimata con misure di termogravimetria ed è pari al 3,2%.

Il profilo di rilascio delle nanocapsule contenenti zosterato sodico conferma che la sostanza è stata incapsulata e che il rilascio avviene in modo graduale. Dopo i primi 60 minuti si registra un rilascio cumulativo percentuale pari al 52% e dopo 26 h la curva Assorbanza vs Tempo raggiunge un plateau indicando che è stato raggiunto l'equilibrio tra la frazione di biocida nelle nanocapsule e quello rilasciato nel mezzo.

Anche il benzoato di sodio è stato incorporato senza alcuna difficoltà. Il prodotto ottenuto (LR16) ha una stabilità termica elevata e confrontabile con il prodotto contenente lo zosterato

di sodio. Le nanoparticelle anche in questo caso hanno forma sferica regolare e un diametro di circa 200 nm.

Il profilo di rilascio delle nanocapsule contenenti benzoato sodico conferma che la sostanza è stata incapsulata ed evidenzia che il rilascio avviene molto lentamente. Dopo i primi 60 minuti si registra un rilascio cumulativo percentuale pari al 32% e dopo 50 h la curva Assorbanza vs Tempo non ha ancora raggiunto il plateau.

L'estere metilico dello zosterato di sodio è stato sintetizzato al fine di ottenere un composto direttamente solubile nel dietilere, cosolvente della miniemulsione O/W. Si è scelto di andare ad agire sul gruppo carbossilico perché dati di letteratura attribuiscono al  $-OSO_3$  le proprietà anti-biofouling della molecola. Analisi  $^1H-NMR$  hanno confermato la formazione dell'estere metilico dello zosterato sodico.

La sintesi delle nanocapsule caricate con l'estere metilico dello zosterato sodico (LR12) non ha dato i risultati attesi; il campione, infatti, presenta una morfologia disomogenea con molti cristalli di silice e alcune nanoparticelle. Anche il termogramma di questo campione ha un andamento che si discosta dagli altri e questo è attribuibile alla diversa morfologia e alla presenza di una maggior quantità di TEOS non idrolizzato/ condensato. Gli spettri FTIR in modalità ATR e lo studio dei profili di rilascio confermano che, in questo caso, il principio attivo si trova solo parzialmente nei nanocontenitori. I picchi principali, infatti, attribuibili all'estere metilico sono ben visibili nello spettro FTIR del campione LR12; inoltre, il rilascio cumulativo percentuale raggiunge il 97% dopo soli 30 minuti di test.

Viste le difficoltà incontrate nell'incapsulare direttamente l'estere metilico con il sistema del self-assembly sarebbe interessante usare le nanocapsule vuote, prodotte con questo metodo, come supporto per l'impregnazione sottovuoto dell'estere metilico in etanolo o metanolo. Questo metodo potrebbe dare risultati estremamente soddisfacenti in termini di tempistiche di rilascio del principio attivo in acqua. Genericamente, infatti, si utilizza il metodo dell'impregnazione sottovuoto per molecole solubili in acqua e questo rende necessario creare un guscio polimerico che garantisca il rilascio controllato ed eviti la fuoriuscita spontanea del principio attivo. Nel caso dell'estere metilico il guscio polimerico non sarebbe necessario e il rilascio controllato sarebbe garantito dalla struttura porosa delle nanoparticelle e dal fatto che il composto non è solubile in acqua a pH neutro.

Per completare questo lavoro di ricerca sarebbe interessante vagliare l'efficacia antibiofouling delle nanocapsule caricate con i differenti biocidi; inoltre sarebbe di grande interesse, per applicazioni nel settore dei beni culturali, inserire tali nanocontenitori in diversi tipi di coating, da quelli a base acquosa a quelli a base di solventi.

Questi sistemi a lento rilascio carichi con biocidi potrebbero trovare impiego anche come additivi nelle malte. In alcuni lavori si riscontra l'impiego di sali di ammonio quaternario all'interno del formulato della malta per conferire al materiale finale proprietà antialgali, per esempio.

Questa presenza, come nel caso dell'aggiunta dei biocidi direttamente nel formulato dei coating, perturba il sistema finale ed evidenze sperimentali mostrano che il biocida scelto tende a migrare verso la superficie e ad essere dilavato. L'utilizzo di nanocapsule caricate con biocidi, in quanto nanocontenitori a lento rilascio compatibili chimicamente con i leganti idraulici e scarsamente idrofobi, potrebbe favorire la diffusione dei biocidi nell'impasto e ridurre sensibilmente il trascinarsi verso la superficie durante il processo di presa e indurimento della malta.

## RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo percorso formativo vorrei ringraziare non solo coloro che mi hanno seguito da un punto di vista professionale, ma anche coloro che sono stati miei compagni di avventura.

Desidero ringraziare la Prof.ssa Zendri per aver creduto nel mio progetto di tesi, sostenendo le mie idee con competenza e disponibilità.

Vorrei ringraziare la Dott.ssa Laura Crociani per avermi accolto in laboratorio e per aver affrontato con me la sfida di questo progetto di ricerca.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Naida El Habra per le misure termogravimetriche, ma principalmente per il sostegno, la gentilezza e i consigli.

Vorrei, inoltre, ringraziare il Dott. Alessandro Galenda per il supporto fornitomi durante le misure di spettroscopia UV-Vis; il Dott. Paolo Guerriero per aver dato un "volto" al mio lavoro attraverso le immagini di microscopia a scansione elettronica.

Infine desidero ringraziare gli amici di sempre che mi sono stati accanto e i compagni di corso che con il tempo sono diventati compagni di avventura e amici sempre presenti.

Un ringraziamento speciale alla mia famiglia che mi ha dato tanto permettendomi di raggiungere questo traguardo.