



# Università degli Studi di Genova

Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in  
CHIMICA INDUSTRIALE

**PREPARAZIONE DI MEMBRANE ELETTROFILATE A BASE DI CHITOSANO  
CARICATE CON NANOPARTICELLE D'ORO PER  
APPLICAZIONI IN DIAGNOSTICA MEDICA**

**RELATORE:** *Prof.ssa Maila Castellano*

**SECONDO RELATORE:** *Dott. Andrea Dodero*

**CORRELATORE:** *Prof.ssa Silvia Vicini*

**SECONDO CORRELATORE:** *Prof.ssa Simona Delsante*

**Candidato:** *Raimondo Insogna*

Anno Accademico  
2021/2022

# SOMMARIO

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>PARTE TEORICA</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
1.1 I polimeri naturali (Il chitosano) .....	6
1.2 Il chitosano cenni storici.....	8
1.3 L'estrazione di chitina e chitosano .....	10
1.4 Tecniche usate per caratterizzare il Chitosano .....	12
1.4.1 Calcolo del grado di deacetilazione .....	12
1.4.2 Determinazione viscosimetrica della massa molecolare .....	14
<b>2 LE NANOPARTICELLE D'ORO</b> .....	<b>17</b>
<b>3 L'ELETTROFILATURA</b> .....	<b>19</b>
3.1 Cenni storici.....	19
3.2 Il processo di elettrofilatura .....	20
3.2.1 Parametri che governano il processo .....	22
3.3 Elettrofilatura del chitosano.....	25
3.4 Tecniche di monitoraggio per l'ottimizzazione dell'elettrofilatura (Reologia/Microscopia elettronica) .....	26
<b>PARTE SPERIMENTALE</b> .....	<b>31</b>
<b>4 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>32</b>
4.1 Protocollo di deacetilazione e degradazione del chitosano.....	32
4.2 Sintesi delle nanoparticelle d'oro .....	33
4.3 Preparazione delle soluzioni di Chitosano/PEO .....	34
4.4 Preparazione delle soluzioni Chitosano/PEO/AuNP.....	36
4.5 Misure reologiche .....	37
4.6 Elettrofilatura delle soluzioni polimeriche .....	38
4.7 Trattamento post-elettrofilatura delle membrane .....	40
<b>5 RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>42</b>

5.1	Deacetilazione e degradazione del chitosano .....	42
5.2	Caratterizzazione AuNP .....	47
5.3	Caratterizzazione reologica per l'elettrofilatura .....	51
5.4	Caratterizzazione delle membrane .....	54
5.5	Calorimetria differenziale a scansione (DSC) .....	59
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>
	<b>APPENDICE .....</b>	<b>67</b>

## ABSTRACT

Questo lavoro di tesi è incentrato sulla produzione di nanofibre di chitosano, caricate con nanoparticelle d'oro (AuNP), e sulla loro caratterizzazione morfologico-strutturale. Le membrane a base di chitosano sono state preparate mediante tecnica di elettrofilatura a partire da una soluzione in acido acetico diluito, utilizzando poli(etilenossido) (PEO) come agente di co-filatura. Le AuNP aggiunte potrebbero portare a nuovi sviluppi inerenti all'utilizzo di queste membrane come biosensori, dal momento che le AuNP amplificano il segnale della spettroscopia Raman (SERS), utile per la rilevazione di eventuali cellule tumorali. In primis questo lavoro affronta lo studio di caratterizzazione sul chitosano, al fine di comprendere quali siano le caratteristiche strutturali che possano influenzare le proprietà del materiale finito. In seconda istanza è necessario uno studio reologico di soluzioni di chitosano e PEO per identificare, in relazione al valore di concentrazione del polimero, la viscosità della soluzione adeguata al processo di elettrofilatura. Una volta ottimizzata l'elettrofilatura, si può procedere con la preparazione di soluzioni additivate con le AuNP, verificando con opportuni studi reologici se il valore di viscosità delle nuove soluzioni risulti ancora accettabile per condurre l'elettrofilatura. Le membrane ottenute vengono sottoposte a trattamenti di coagulazione e reticolazione perché si elimini l'agente di co-filatura, si stabilizzino le membrane stesse e si pervenga a evitare la loro solubilizzazione in ambiente acquoso. Inoltre, il monitoraggio della buona riuscita dell'elettrofilatura e dei processi di coagulazione e reticolazione è effettuato mediante analisi IR, DSC e SEM.

## **PARTE TEORICA**

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 I polimeri naturali (Il chitosano)

I polimeri di derivazione naturale hanno riscosso particolare successo negli ultimi anni. I motivi principali dell'aumento della richiesta di questi polimeri sono da attribuire alle esigenze imposte dalla società e dal mercato, poiché si va sempre di più verso la ricerca del concetto di *Green Chemistry*<sup>1,2</sup>. Questa concezione di chimica cerca di reindirizzare l'industria verso lo sviluppo di processi chimici sostenibili ottimizzando i consumi ed usando fonti energetiche rinnovabili. Tuttavia ad oggi è necessario ricordare che l'industria chimica dipende fortemente dai prodotti di origine fossile. Ciò però non ha impedito lo sviluppo di un nuovo filone di ricerche rivolte alla produzione di materiali polimerici e prodotti chimici ricavati da fonti biologiche e rinnovabili che comprendono: polisaccaridi, proteine e acidi nucleici<sup>1</sup>. Queste macromolecole di origine naturale stanno riscuotendo particolare interesse in molti ambiti: packaging, alimentare e soprattutto biomedicale e farmaceutico trovando impiego come film, idrogeli e membrane prodotte mediante il processo di elettrofilatura; attraverso il quale è possibile ottenere membrane costituite da fibre di dimensioni micro/nanometriche. Tali membrane vengono definite come tessuto non tessuto (TNT), poiché l'orientazione delle fibre nello spazio risulta essere casuale. Il processo di elettrofilatura, nel caso di macromolecole di origine naturale, può risultare più complesso, rispetto a quello necessario per le macromolecole di sintesi, richiedendo spesso un post-trattamento delle fibre per implementare le proprietà meccaniche e termiche e permettere il contatto con solventi acquosi<sup>3-5</sup>. Inoltre, in generale non è possibile elettrofilare questi tipi di polimeri da soli, ma è sempre necessario un agente di co-filatura, che tipicamente è un polimero di origine sintetica facile da elettrofilare e rimuovere nei processi di post-trattamento come ad esempio il poli(etilenoossido) (PEO). Sicuramente, i polimeri sintetici presentano meno problematiche per la buona riuscita dell'elettrofilatura, ma, per essere elettrofilati, fanno spesso uso di solventi organici risultando più impattanti sull'ambiente<sup>3-5</sup>. Tra i polimeri di derivazione naturale, che stanno acquisendo popolarità in questo ambito, c'è sicuramente il chitosano, un copolimero di unità monomeriche di 2-D-glucosammina e 2-acetil-D-glucosammina derivante dalla deacetilazione della chitina (Figura 1), un polimero naturale costituito da unità monomeriche di 2-acetil-D-glucosammina che si estrae dai gusci degli artropodi e dalle pareti cellulari dei funghi<sup>6,7</sup>.

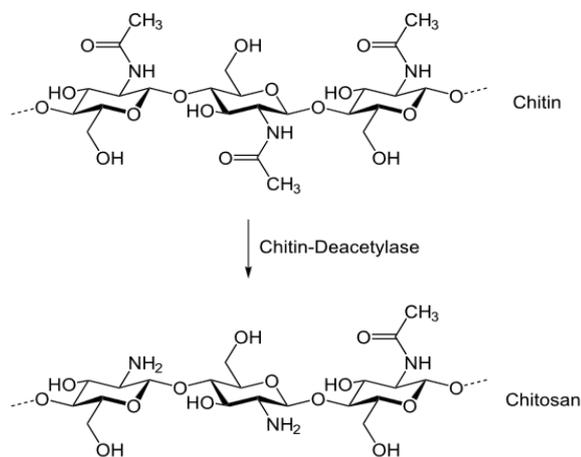


Figura 1 Formule di struttura di Chitina e chitosano

Le proprietà antibatteriche e di biocompatibilità del chitosano gli hanno permesso di essere uno dei polisaccaridi più interessanti da elettrofilare per la realizzazione di biomateriali utilizzati principalmente in ambito farmaceutico e biomedico (Figura 2).

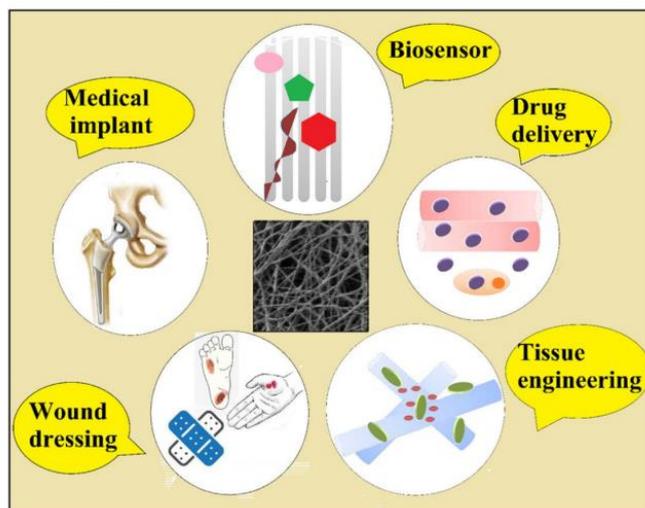


Figura 2 Applicazioni biomediche delle membrane elettrofilate a base di chitosano

Le proprietà morfologiche del sopracitato materiale gli permettono di avere un rapporto superficie volume estremamente elevato. Grazie all'elevata superficie specifica che ne facilita la diffusione, le nanofibre elettrofilate sono ottimi sistemi di rilascio controllato di farmaci. In letteratura sono noti diversi lavori nei quali il chitosano è stato impiegato come supporto per la produzione di *Drug Delivery System* (DDS) per antidolorifici come l'ibuprofene e antitumorali. Riscontriamo una ulteriore applicazione di queste membrane negli ambiti della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale. Al proposito, sono noti diversi studi pertinenti alla produzione di membrane o *scaffold* dalle buone proprietà antibatteriche e capaci di favorire la rigenerazione dei tessuti. Infine, nell'ultimo periodo sta acquisendo maggiore popolarità l'idea di sfruttare le membrane di chitosano in qualità di biosensori per molecole *target* come enzimi o anche per cellule tumorali<sup>8,9</sup>. In forza dei suoi gruppi funzionali -NH<sub>2</sub> e -OH, che gli conferiscono buone proprietà antibatteriche, il chitosano risulta anche una buona specie chelante (Figura 3)<sup>7</sup>.

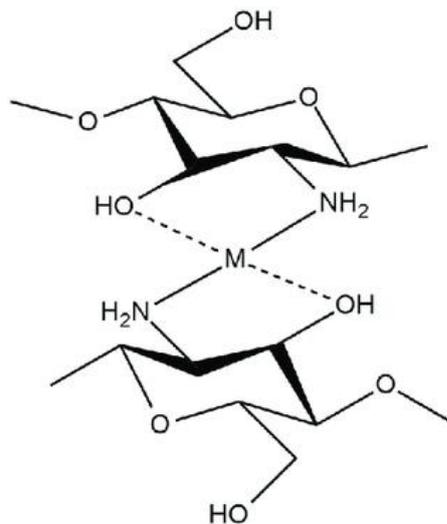


Figura 3 Interazione del chitosano con un metallo generico

## 1.2 Il chitosano cenni storici

Chitina e chitosano hanno una storia di studi e applicazioni lunga più di 200 anni. Nel 1799 il chimico Charles Hatchett usò acidi minerali per decalcificare i gusci di granchi, aragoste e gamberi, notando come, in seguito al trattamento acido, questi

presentassero un comportamento meccanico simile alla cartilagine. Per quanto questo si possa intendere come primo studio in riferimento alla chitina calcificata negli invertebrati, la scoperta della chitina è stata accreditata anche a Henri Braconnot, che la estrasse dai funghi nel 1811 soprannominandola fungina, e a Odier, che nel 1823 la ricavò dal trattamento delle ali di coleottero con l'impiego di idrossido di potassio. Successivamente nel 1843 i chimici Lassaigne e Payen scoprirono la presenza di atomi di azoto nella chitina.

In quegli anni venne poi ricavato il chitosano, il derivato primario della chitina, la cui storia ebbe inizio con lo studio di Rouget nel 1859. Il chimico, mediante l'utilizzo di idrossido di potassio concentrato, ottenne una nuova "chitina modificata" che rese solubile in acidi organici. Tuttavia, il termine chitosano fu coniato dal chimico Felix Hoppe-Seyler nel 1894 in riferimento a un derivato della chitina, ricavato dai gusci di diversi artropodi e reso solubile in ambiente acido. Successivamente vennero sviluppati nuovi studi volti a indagare nel dettaglio la struttura chimica di chitina e chitosano che non era ancora del tutto nota. Nel 1950 si iniziarono a pensare le prime applicazioni di questi due polisaccaridi e, in particolare, nel campo delle fibre per andare a competere con quelle sintetiche. Purtroppo in quel periodo, a causa della mancanza di impianti produttivi adeguati, la concorrenza dei polimeri sintetici ne limitò lo sviluppo commerciale.

Nel 1971 in seguito ai nuovi sviluppi per l'estrazione della chitina venne inaugurato il primo impianto industriale in Giappone. L'industrializzazione ha contribuito enormemente allo sviluppo di questi due polisaccaridi e ne ha reso possibili le prime applicazioni. In particolare la presenza di gruppi amminici rende il chitosano una delle risorse più promettenti per sostituire i polimeri sintetici in molti campi, che vanno dalle applicazioni tecnologiche a quelle biomediche e farmaceutiche<sup>10</sup>. Inoltre, il chitosano può essere facilmente reticolato tramite approcci sia chimici che fisici al fine di migliorarne la stabilità, aprendo così la strada al suo utilizzo come materiale economico e altamente performante. Grazie alle suddette proprietà, il chitosano è stato inoltre approvato dalla *Food and Drug Administrator* (FDA) per l'uso come pelle artificiale e nei materiali per medicazioni delle ferite. Per questo tipo di applicazioni e per una buona efficienza devono essere soddisfatti requisiti specifici: in particolare, i cerotti per la guarigione delle ferite devono essere atossici e anallergici, fornire una protezione sufficiente contro i batteri e rimuovere gli essudati della ferita consentendo allo stesso tempo gli scambi di gas<sup>11</sup>.

### 1.3 L'estrazione di chitina e chitosano

Attualmente chitina e chitosano vengono ricavati per estrazione chimica (Figura 4) a partire da scarti di insetti, funghi, molluschi e gusci di granchio trattati con solventi acidi o alcalini a temperature maggiori a 100°C. La metodica prevede l'uso di acidi forti (ad esempio HCl) ad alta temperatura e successivamente di basi (ad esempio NaOH) allo scopo di estrarre la chitina dalla biomassa. Successivamente, per l'ottenimento del chitosano si procede con una reazione di deacetilazione che sfrutta l'idrolisi basica o acida. Un parametro fondamentale è il tempo di reazione, poiché più lungo sarà, maggiori saranno le modifiche apportate alla chitina con cambiamenti sostanziali nella massa molecolare e nel grado di deacetilazione (DDA); infatti, la chitina, essendo molto sensibile agli acidi, presenta la possibilità di subire fenomeni di depolimerizzazione e degradazione<sup>12</sup>.



Figura 4 Processo di estrazione della chitina e del chitosano

La deacetilazione della chitina può essere condotta sia in ambiente acido che basico. L'idrolisi base-catalizzata risulta essere favorita da usare, poiché quella acido-catalizzata oltre a favorire l'idrolisi del gruppo ammidico potrebbe comportare la rottura del legame glicosidico  $\beta$ -(1-4) tra i monomeri. Il meccanismo che sfrutta l'idrolisi basica (Figura 5) avviene mediante l'attacco dell'ossidrilico al carbonio carbonilico che forma il

gruppo ammidico; con conseguente scissione del legame C-N. Nel complesso la reazione risulta essere esotermica e favorita ( $\Delta G = -7\text{kcal mol}^{-1}$ )<sup>12</sup>.

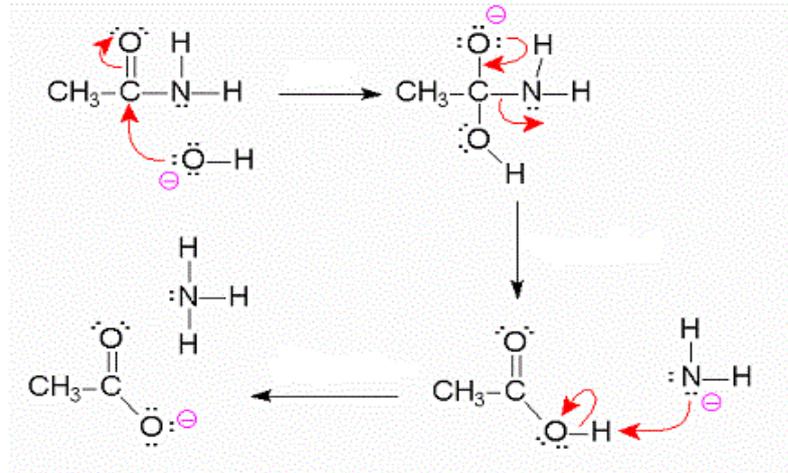


Figura 5 Meccanismo di idrolisi basica

Con l'idrolisi acida (Figura 6) il meccanismo di reazione cambia: si ha prima la protonazione dell'ossigeno del gruppo carbonilico ( $>\text{C=O}$ ) con successiva scissione del legame C-N. Anche in questo caso la reazione risulta essere esotermica con un'energia libera molto simile all'idrolisi basica ( $\Delta G = -5\text{ kcal mol}^{-1}$ )<sup>12</sup>.

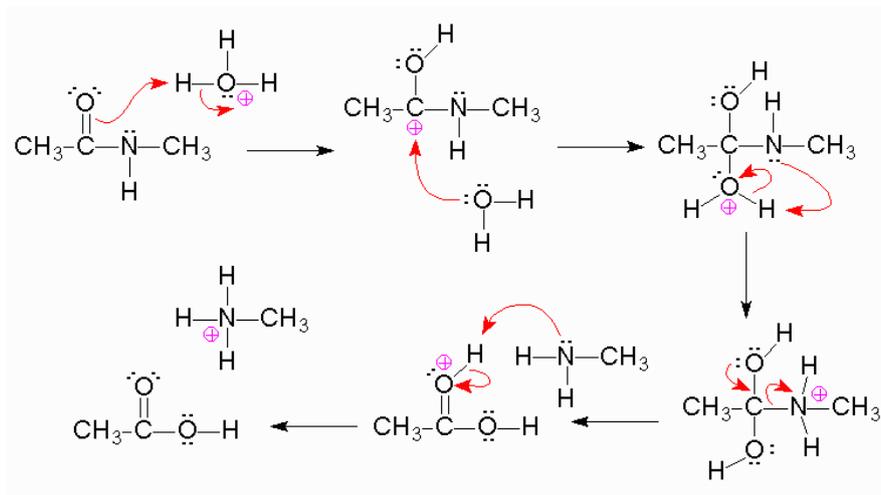


Figura 6 Meccanismo di idrolisi acida

## 1.4 Tecniche usate per caratterizzare il Chitosano

Il peso molecolare e DDA influenzano le proprietà chimico fisiche del chitosano che dipendono fortemente dalla fonte di estrazione. Questo è il motivo per cui è necessario caratterizzare il chitosano determinando la  $\bar{M}_v$  e il DDA. Dalla letteratura infatti, è noto che il DDA influenzi pesantemente la cristallinità del materiale: questa è massima per la chitina, ovvero il chitosano 0% deacetilato e per il chitosano completamente deacetilato, chiamata anche poli(D-glucosammina), a causa dell'elevata regolarità. Per valori intermedi di DDA, la cristallinità del polimero diminuisce, a causa dell'aumento di disordine nella sua struttura chimica. Inoltre, data la conoscenza di questi due parametri, è possibile controllare la stessa biodegradabilità del chitosano e le sue proprietà meccaniche. In questo modo si possono realizzare materiali altamente specifici per l'applicazione d'interesse<sup>13-15</sup>.

### 1.4.1 Calcolo del grado di deacetilazione

Attualmente, uno dei metodi principali ai quali si ricorre per la determinazione del grado di deacetilazione (DDA%) del chitosano, è la tecnica di spettroscopia infrarossa (IR).

Per registrare gli spettri IR del chitosano esistono diversi metodi di campionamento: sotto forma di pastiglie ottenute disperdendo la polvere di chitosano in KBr, oppure usando film sottili di chitosano puro essiccato, è possibile utilizzare anche la sola polvere di chitosano con la modalità *Attenuated Total Reflectance* ATR. Le bande caratteristiche del chitosano sono (Figura 7)<sup>16,17</sup>:

1. 3450  $\text{cm}^{-1}$  stretching del legame O-H.
2. 3370 e 3300  $\text{cm}^{-1}$  stretching dei legami N-H dell'ammina
3. 2920 e 2870  $\text{cm}^{-1}$  stretching dei legami alifatici C-H
4. 1655 e 1640  $\text{cm}^{-1}$  stretching del doppio legame C=O
5. 1550  $\text{cm}^{-1}$  stretching del legame C-N
6. 1100  $\text{cm}^{-1}$  stretching del legame C-O

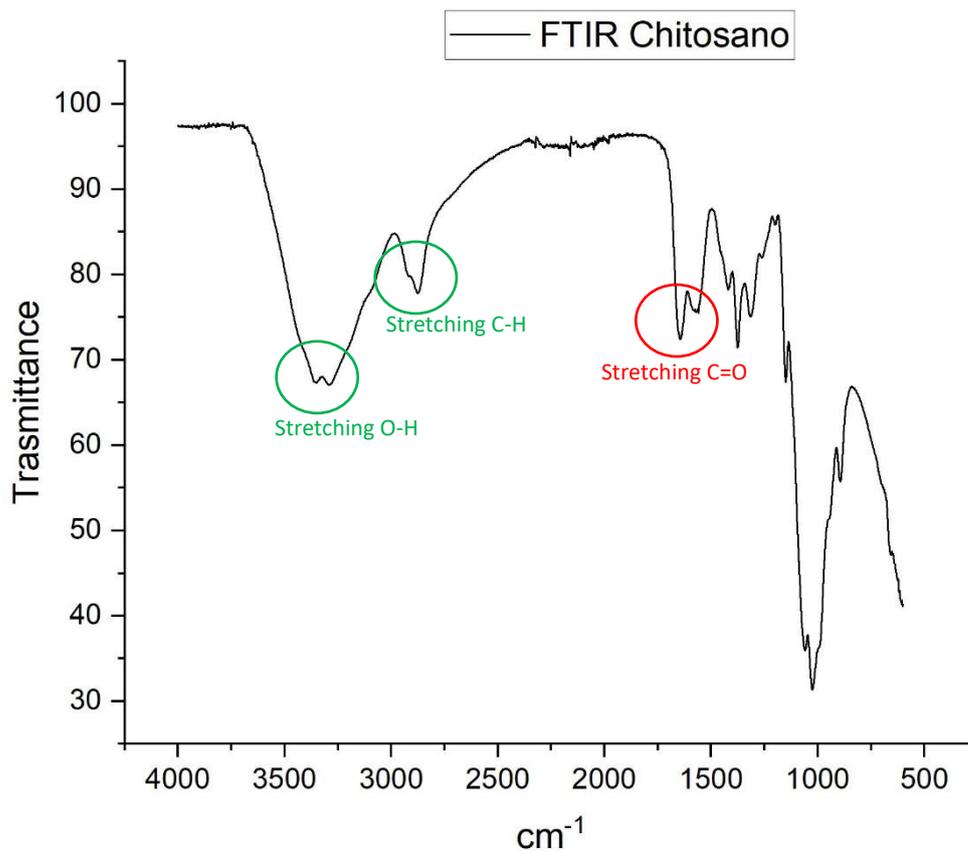


Figura 7 Spettro FT-IR Chitosano

Attraverso la comparazione di differenti bande di assorbimento si calcola il grado di acetilazione DA% dal quale si ricava il valore del DDA% per differenza a 100 (2.1.2). In letteratura sono riportati differenti metodi di calcolo. Nel 1980 i chimici Moore e Roberts propongono l'uso del picco a 1655 cm<sup>-1</sup> relativo al C=O dell'amide e come riferimento utilizzano il picco di assorbimento associato ai gruppi ossidrilici a 3450 cm<sup>-1</sup> in quanto intenso e abbastanza isolato nello spettro. L'assorbanza viene misurata tracciando linee di base tra 4000 e 1800 cm<sup>-1</sup> e tra 1800 e 1200 cm<sup>-1</sup>. Mediante un'equazione empirica (2.1.1), si determina la percentuale di chitosano N-acetilato e quindi il grado di acetilazione (DA):

$$DA\% = \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times \frac{100}{1,33} \quad (2.1.1)$$

Il coefficiente 1,33 rappresenta il 100% di chitosano acetilato poiché a tale valore di acetilazione il rapporto tra le bande di assorbimento  $A_{1655}$  e  $A_{3450}$  risulta essere uguale a 1,33. Infine per il calcolo del DDA% è sufficiente sottrarre al 100% il DA% (2.1.2)<sup>18,19</sup>.

$$DDA\% = 100\% - DA\% \quad (2.1.2)$$

Sempre in quegli anni Miya, Iwamoto, Yoshikawa e Mima hanno proposto un'altra relazione per la determinazione del DDA%, andando ad utilizzare come banda di riferimento quella corrispondente allo *stretching* dei C-H a  $2867 \text{ cm}^{-1}$  e le linee di base sono tracciate tra  $3000$  e  $2300 \text{ cm}^{-1}$  e tra  $1800$  e  $1600 \text{ cm}^{-1}$  (2.1.3)<sup>17</sup>.

$$DA\% = \left( \frac{A_{1655}}{A_{2867}} \right) \times \frac{100}{1,33} \quad (2.1.3)$$

Infine, si conosce dalla letteratura un ulteriore metodo, proposto da Baxter, che è uguale al metodo proposto da Roberts e Moore ma fa uso della linea di base usata da Miya nella zona dell'ammide quindi si traccia tra  $1800$  e  $1600 \text{ cm}^{-1}$ . In questo modo si ottengono valori di assorbimento differenti e la relazione empirica diventa (2.1.4)<sup>17</sup>:

$$DA\% = \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \quad (2.1.4)$$

#### 1.4.2 Determinazione viscosimetrica della massa molecolare

La massa molecolare del chitosano, come quella di qualsiasi altro polimero, è una caratteristica significativa che determina le proprietà fisiche del polimero stesso. In particolare, una proprietà idrodinamica delle soluzioni polimeriche, che dipende dalla massa molecolare, è la viscosità. Diversamente da altre tecniche definite assolute, che fanno uso delle proprietà colligative o del *light scattering* per ottenere il valore di massa

molecolare media, le misure di viscosità sono metodi relativi. Tuttavia, le misure viscosimetriche trovano un vasto impiego nella valutazione della massa molecolare<sup>20</sup>. Il principio alla base di questa tecnica sta nel fatto che l'aggiunta ad un dato solvente di molecole di polimero inevitabilmente aumenta la sua viscosità, rispetto a quella del solo solvente puro. Per correlare questo incremento di viscosità alle proprietà del soluto si utilizzano i parametri di viscosità osservabili in Tabella 1.

Tabella 1 Parametri di viscosità utilizzati per determinare la massa molecolare dei polimeri

Simbolo	Nome	Unità di misura
$\eta$	Viscosità soluzione	Pa·s
$\eta_s$	Viscosità solvente	Pa·s
$\eta_r = \eta / \eta_s$	Viscosità relativa	adimensionale
$\eta_{sp} = \eta_r - 1$	Viscosità specifica	adimensionale
$(\ln \eta_r) / c$	Viscosità inerente	dL/g
$\eta_{sp} / c$	Viscosità ridotta	dL/g

Una volta ricavati tutti questi parametri, è possibile determinare graficamente la viscosità intrinseca  $[\eta]$ , che misura l'aumento relativo di viscosità normalizzato per la concentrazione. Si procede graficando la viscosità ridotta in funzione della concentrazione (Figura 8) mediante la relazione di Huggins (1.4.2.1) o la viscosità inerente con quella di Kramer (1.4.2.2) e la si ricava dall'intercetta dei due modelli che dovrebbe coincidere, se così non fosse il valore di  $[\eta]$  si ricava eseguendo la media<sup>21</sup>.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k'[\eta]^2 c \quad (1.4.2.1)$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta] - k''[\eta]^2 c \quad (1.4.2.2)$$

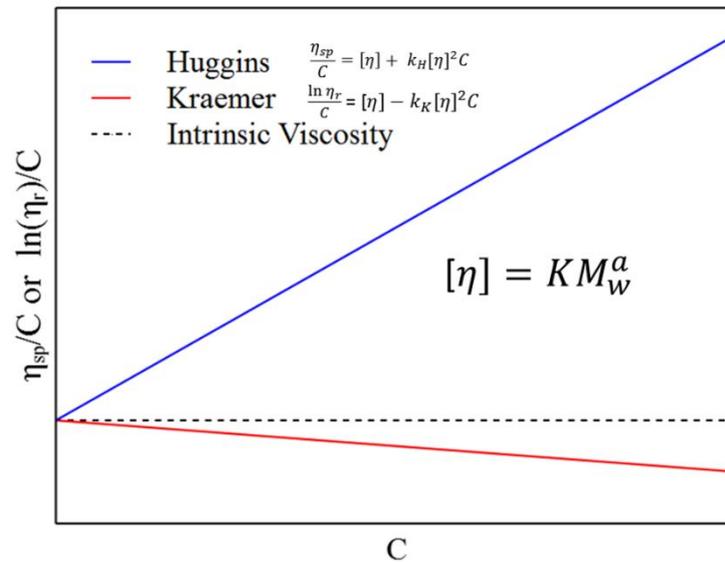


Figura 8 Grafico delle relazioni di Huggins e Kramer

Una volta ottenuta la viscosità intrinseca  $[\eta]$ , è possibile utilizzare l'equazione di Mark-Houwink-Sakurada (1.4.2.3) per determinare la massa molecolare media viscosimetrica ( $\bar{M}_v$ ) del polimero<sup>20,21</sup>. Tale massa molecolare risulta media in quanto si impiegano campioni polidispersi e presenta un valore compreso tra la massa molecolare media in numero ( $M_n$ ) e la massa molecolare media in peso ( $M_w$ ):

$$[\eta] = K \bar{M}_v^\alpha \quad (1.4.2.3)$$

Nell'equazione (1.4.2.3)  $[\eta]$  è la viscosità intrinseca,  $\bar{M}_v$  è la massa molecolare media viscosimetrica e K e  $\alpha$  sono costanti relative alla coppia polimero e solvente. Riguardo al chitosano dalla letteratura sono noti studi che dimostrano come il DDA% influenzi i valori delle costanti K ed  $\alpha$ .

## 2 LE NANOPARTICELLE D'ORO

Le nanoparticelle sono aggregati atomici di dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, le cui proprietà dipendono fortemente dalla geometria, dalle dimensioni e dall'eterogeneità delle stesse, condizionando di conseguenza i settori di applicazione. Le nanoparticelle in metallo nobile, e soprattutto quelle d'oro (AuNP), sono particolarmente interessanti per le loro proprietà ottiche, legate all'interazione tra gli elettroni della banda di conduzione del metallo e la componente elettrica della radiazione elettromagnetica incidente sulla superficie. Infatti, grazie alle loro dimensioni nanometriche, le nanoparticelle metalliche subiscono effetti quantistici di taglia, che si traducono nella comparsa di livelli energetici di transizione elettronica discreti, a differenza di quanto accade nel metallo in forma massiva. Ne deriva che le nanoparticelle metalliche sono caratterizzate dalla presenza di una banda di assorbimento particolare, chiamata risonanza plasmonica superficiale localizzata (LSPR) o più semplicemente plasmoni. Questo fenomeno è una conseguenza dell'oscillazione collettiva degli elettroni nella banda di conduzione dell'oro colloidale indotta dall'interazione con la radiazione elettromagnetica incidente della luce. Per la natura discreta dei livelli energetici di transizione elettronica nelle nanoparticelle metalliche, tale oscillazione degli elettroni avviene in risposta ad una specifica quantità di energia assorbita; in altri termini, i fotoni incidenti sul materiale, per poter indurre questa oscillazione, devono avere una determinata lunghezza d'onda, specifica per ogni tipo di nanoparticella (Figura 9)<sup>22</sup>.

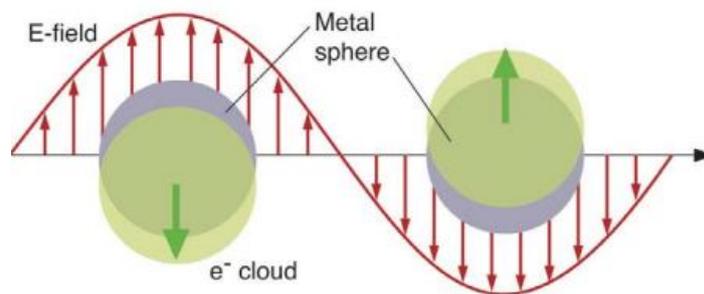


Figura 9 Schema di interazione tra una nanosfera metallica e la luce.

Nel caso delle nanoparticelle d'oro, il plasmonone cade nell'intervallo del visibile, conferendo alle soluzioni colori sgargianti con riflessi metallici. Più specificatamente, per nanoparticelle d'oro di diametro intorno ai 5-20 nm, la lunghezza d'onda corrispondente a LSPR presenta un massimo intorno ai 520 nm. Per questo motivo, questa tipologia di nanoparticelle d'oro ha in soluzione un caratteristico colore vinaccia. Tuttavia, posizione e forma del plasmonone variano fortemente in funzione dei seguenti fattori<sup>23</sup>:

1. il grado di asimmetria delle nanoparticelle, espresso tramite il rapporto di forma, definito come il rapporto tra l'asse maggiore e l'asse minore della nanoparticella;
2. le dimensioni delle particelle;
3. l'ambiente a contatto con le nanoparticelle, definito principalmente dal solvente in cui le nanoparticelle sono disperse o la presenza di leganti ancorati sulla superficie delle stesse;
4. il grado di aggregazione delle nanoparticelle.

Uno dei campi dove le AuNP stanno riscuotendo maggior successo è sicuramente l'ambito biomedicale come sensori, mediante la tecnica di spettroscopia Raman potenziata da superficie (SERS). Il fenomeno fisico alla base della spettroscopia Raman è lo scattering anelastico dei fotoni che viene influenzato da diversi modi vibrazionali e che può restituire "l'impronta" digitale della molecola bersaglio. Tuttavia, applicare direttamente questo fenomeno all'identificazione di analiti è fortemente sconsigliato a causa della bassa efficienza del fotone di scattering anelastico comportando un segnale debole. In presenza di nanoparticelle plasmoniche o superfici metalliche ruvide, tuttavia, l'intensità di scattering Raman può essere potenziata fino a  $10^{14}$  ordini di grandezza. Questo fenomeno è stato attribuito a un potenziamento del campo elettromagnetico locale indotto dalla risonanza plasmonica di superfici ed è chiamato scattering Raman potenziata dalla superficie (SERS). Il grande miglioramento della sensibilità ha reso SERS un potente strumento di analisi sia qualitative che quantitative soprattutto nell'ambito della diagnostica medica<sup>24</sup>.

## 3 L'ELETTROFILATURA

### 3.1 Cenni storici

La tecnologia dell'elettrofilatura ha fatto molta strada, da alcuni concetti fondamentali a sostanziali applicazioni industriali. L'elettrofilatura è un processo elettroidrodinamico che comporta il movimento di un fluido mediante l'applicazione di un campo elettrostatico. Questo movimento di liquidi dovuto alla forza elettrostatica è stato osservato per la prima volta da William Gilbert, un tempo medico personale della regina Elisabetta I d'Inghilterra e presidente del Royal College of Physicians. Intorno al 1600, Gilbert registrò per la prima volta il movimento del liquido, l'acqua, sotto l'influenza di un campo elettrico prodotto dallo sfregamento dell'ambra. Ciò accadeva, poiché l'attrito, indotto dallo sfregamento, portava ad una separazione di carica sulla superficie dell'ambra, che si caricava elettrostaticamente inducendo una deformazione conica nelle gocce d'acqua poste vicino ad essa<sup>25</sup>.

Successivamente nel 1749, il pastore e fisico francese Jean-Antoine Nollet osservò un altro fenomeno elettroidrodinamico: sottoponendo l'acqua a un campo elettrico, questa può frammentarsi in più goccioline, generando un processo ora noto come *elettrospraying*. Fino a questo periodo gli scienziati si limitarono unicamente a comprendere questi fenomeni<sup>25</sup>.

Solo nel 1902 J.F. Cooley e W.J. Morton brevettarono i primi sistemi per l'elettrofilatura; nel 1914, John Zeleny, fisico americano, pubblicò un lavoro riguardo al comportamento di gocce di fluido sulla punta di capillari metallici e iniziò la modellazione matematica del comportamento dei fluidi sottoposti a forze elettrostatiche. Risalgono invece al 1934, per merito di Formhal, e al 1936, grazie a Norton, i primi brevetti riguardanti la produzione di fibre polimeriche<sup>25</sup>.

Con il passare degli anni, tra il 1964 e 1969, Taylor riuscì a pubblicare i risultati dei suoi studi sulla forma che assume una goccia di liquido che si crea sulla punta di un ago quando ad essa viene applicato un potenziale elettrico, riuscendo a dimostrare che essa assume una forma conica. Ad oggi tale teoria, oltre ad essere ancora valida, dà il nome al fenomeno ovvero: "Cono di Taylor". In seguito, nel 1971 Baumgarten riuscì ad ottenere le prime fibre con diametri inferiori al micrometro con una soluzione di poliaccrilonitrile e dimetilformammide<sup>25</sup>.

Attualmente, grazie allo studio della fluidodinamica dei polimeri e a come questa sia influenzata dalle forze elettrostatiche, è stato possibile implementare questa tecnica, tanto da renderla una delle più promettenti nella produzione di materiali nel campo biomedicale, della depurazione delle acque, dei supporti per catalizzatori e dell'energia<sup>3</sup>.

### 3.2 Il processo di elettrofilatura

Il processo di elettrofilatura prevede l'applicazione di un forte campo elettrico ad una soluzione o a un fuso polimerico. Il fluido viene continuamente alimentato da una siringa collegata ad una pompa volumetrica e forzato a passare attraverso un ago, che funge da elettrodo, a cui è applicata una differenza di potenziale (d.d.p). A determinati valori di potenziale si genera una forza elettrostatica capace di contrastare la tensione superficiale e le forze di attrito viscoso della soluzione polimerica. La risultante di queste forze quindi va a deformare la goccia di liquido formatasi in corrispondenza dell'uscita dell'ago in una forma conica, il cono di Taylor (Figura 10)<sup>3</sup>.

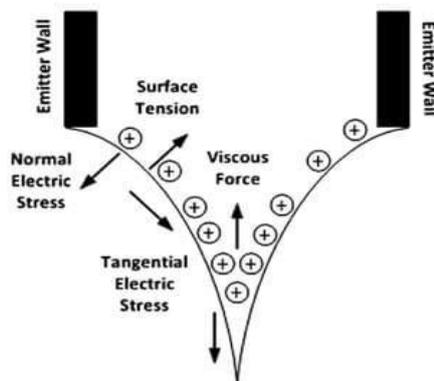


Figura 10 schema delle forze che portano alla formazione del Cono di Taylor

Alla fuoriuscita del getto carico, per effetto delle forze di repulsione, delle forze attrattive indotte dall'elettrodo di segno opposto e per l'evaporazione del solvente, si ottengono delle fibre che si depositano sul collettore (Figura 11)<sup>3</sup>.

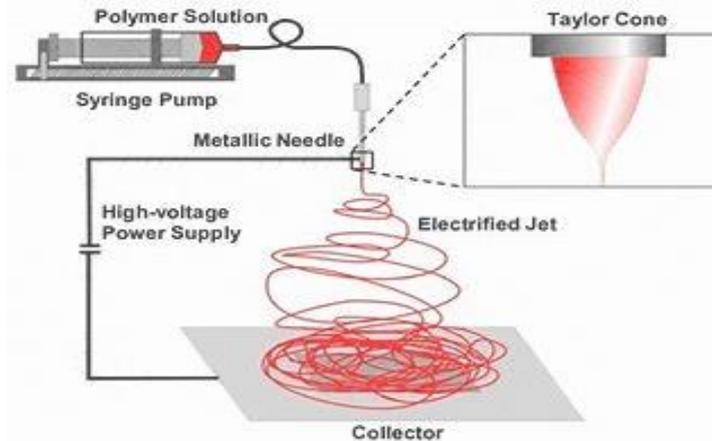


Figura 11 schema del processo di elettrofilatura

A seconda delle proprietà della soluzione che si intende filare, esiste la possibilità di ottenere diversi risultati: se la coesione molecolare del liquido non è abbastanza elevata o il valore di potenziale è troppo alto, il getto si rompe in tante goccioline, portando al fenomeno di *elettrospray*, mentre se la tensione superficiale del getto è molto elevata si ha la possibilità di ottenere fibre aventi sezione non circolare, chiamate nastri. Oltre ai parametri della soluzione è necessario individuare in base a questi il miglior valore di differenza di potenziale (d.d.p) per l'elettrofilatura<sup>3,21</sup>.

Inoltre, il collettore, che funge da elettrodo, può assumere diverse geometrie, per conferire proprietà differenti al tessuto fibroso depositato: lastra piana, rullo cilindrico e a disco. La differenza sostanziale risiede tra lastra piana o disco e il rullo cilindrico poiché nei primi due casi la disposizione delle fibre è completamente casuale, mentre nel caso del rullo cilindrico, grazie alla possibilità di regolare la sua velocità di rotazione, è possibile orientare le fibre in direzione assiale. Un ulteriore parametro da prendere in considerazione è l'evaporazione del solvente, dal momento che, se non completa, porta a coalescenza delle fibre che impattano sul collettore<sup>3,21</sup>.

### 3.2.1 Parametri che governano il processo

Per ottimizzare il processo di elettrofilatura è quindi necessario controllare una moltitudine di parametri che possono suddividersi in tre grandi categorie:

1. Proprietà della soluzione polimerica;
2. Parametri strumentali;
3. Parametri ambientali.

#### 3.2.1.1 Parametri della soluzione polimerica

In questa categoria sono inclusi: peso molecolare del polimero e indice di polidispersità, concentrazione, viscosità, tensione superficiale, conduttività elettrica e volatilità del solvente. Le caratteristiche del solvente non sono da trascurare rispetto al polimero, poiché ha il ruolo di omogenizzare il sistema solubilizzando in maniera adeguata il polimero stesso. È necessario quindi valutare bene le sue interazioni con il polimero, la sua volatilità, tensione superficiale e temperatura di evaporazione<sup>3</sup>.

1. Massa Molecolare: interviene nella formazione di entanglements tra le catene polimeriche che influenzano la viscoelasticità della soluzione polimerica da elettrofilare, quindi anche la morfologia finale delle fibre. Generalmente all'aumentare della massa molecolare si può riscontrare un aumento del diametro delle fibre con una diminuzione significativa del numero di difetti che spesso si manifestano sotto forma di sferette di polimero che congiungono tra loro le fibre e vengono chiamate *beads*. Nonostante ciò, non è sempre necessario avere alte masse molecolari, poiché si può andare a compensare questa problematica sfruttando le interazioni intermolecolari del polimero mediante l'aggiunta di un agente di *co-spinning*<sup>27</sup>.
2. Concentrazione: rispetto a tutti gli altri parametri della soluzione, la concentrazione rappresenta quello più importante e più semplice da controllare per la buona riuscita dell'elettrofilatura. Dalla letteratura, è noto come per ottenere fibre uniformi sia necessario raggiungere una

concentrazione ottimale che viene identificata in maniera empirica e come il diametro delle fibre cresca all'aumentare della concentrazione<sup>27</sup>.

3. Viscosità: questo parametro dipende sia dalla massa molecolare del polimero che dalla concentrazione della soluzione. Il suo valore deve essere compreso tra due valori limite: uno minimo, sotto il quale la viscoelasticità della soluzione è troppo bassa per ottenere fibre continue, e avviene il fenomeno dell'*elettrospray*, e uno massimo dove risulta difficoltoso estrarre il materiale poiché le forze elettrostatiche non riescono a contrastare le forze di attrito viscoso della soluzione<sup>27</sup>.
4. Tensione superficiale: dipende sia dal tipo di solvente utilizzato che dalla concentrazione di polimero e risulta essere direttamente proporzionale al diametro delle fibre. Una tensione superficiale troppo alta potrebbe causare formazione di *beads*; per ovviare a questo imprevisto, è possibile cambiare tipo di solvente o abbassare la concentrazione. Oppure, se non si è in grado di cambiare queste condizioni, risulta necessario usare tensioattivi specifici, che, oltre ad abbassare la tensione superficiale, permettono anche di lavorare a potenziali più bassi<sup>27</sup>.
5. Conducibilità: una buona conducibilità della soluzione consente una corretta formazione e stabilità del cono di Taylor, evitando la formazione di difetti nelle fibre. Qualora si presentasse un problema con questo parametro, sarebbe possibile risolverlo con l'aggiunta di specie ioniche<sup>27</sup>.
6. Volatilità del solvente: non è da trascurare per una buona riuscita del processo, poiché, se l'evaporazione del solvente non avviene in modo corretto, si può avere formazione di difetti sotto forma di pori o addirittura le fibre possono coalescere sul collettore<sup>27</sup>.

### 3.2.1.2 Parametri strumentali

In questa categoria sono inclusi: la differenza di potenziale applicata, la portata della soluzione, la distanza tra ago e collettore, la geometria del collettore e diametro dell'ago.

1. Differenza di potenziale: il valore caratteristico di differenza di potenziale per l'elettrofilatura, dipende dal tipo di soluzione con cui si ha a che fare. In generale però è possibile affermare, che un aumento di questo parametro comporta un aumento di carica superficiale sul fluido polimerico estruso che risente maggiormente del campo elettrico: in questo modo è soggetto a forze di stiro maggiori, e si formano fibre di diametro più piccolo<sup>27</sup>.
2. Portata: la portata influenza principalmente il diametro delle fibre e la volatilità del solvente. Il diametro delle fibre cresce con l'aumento della portata, mentre riguardo la volatilità del solvente è preferibile utilizzare portate basse permettendo un'evaporazione omogenea del solvente evitando così la formazione di difetti sulle fibre<sup>27</sup>.
3. Distanza tra ago e collettore: bisogna sempre stabilire una distanza minima tra ago e collettore per favorire l'evaporazione del solvente mentre la fibra è in volo, altrimenti, se arrivasse bagnata al collettore avremmo o formazione di difetti come pori nelle fibre o perdita della struttura fibroso poiché coalescono<sup>27</sup>.
4. Tipo di collettore e diametro dell'ago: mediante la scelta del collettore è possibile il tipo di orientazione che si vuole imporre alle fibre mentre il diametro dell'ago è direttamente proporzionale al diametro delle fibre<sup>27</sup>.

### 3.2.1.3 Parametri Ambientali

I parametri ambientali principali sono tre: temperatura, umidità e pressione. Quest'ultimi giocano un ruolo chiave nell'evaporazione del solvente e ad oggi grazie allo della strumentazione è possibile eseguire l'elettrofilatura in camere dove si possono controllare temperatura e umidità senza essere vincolati dalle condizioni atmosferiche esterne. La numerosità di questi parametri fa intendere l'estrema difficoltà nel trovare

le condizioni ottimali di elettrofilatura, motivo per cui ancora oggi le condizioni vengono determinate empiricamente<sup>27</sup>.

### **3.3 Elettrofilatura del chitosano**

Il chitosano, così come la maggior parte dei polimeri naturali, sono difficili da elettrofilare a causa della loro limitata solubilità in acqua, del carattere ionico, della rete tridimensionale dovuta ai legami idrogeno, unita all'elevata viscosità della soluzione a basse concentrazioni. Queste limitazioni possono essere superate miscelandolo con polimeri lineari flessibili, come il poli(etilenoossido) (PEO) e il poli(vinilalcol) (PVA) che migliorano significativamente la filatura del polimero naturale. L'utilizzo di queste miscele ha portato dei vantaggi rispetto alle nanofibre elettrofilate di soli polimeri naturali puri, perché hanno permesso il miglioramento delle proprietà meccaniche, di biocompatibilità e l'effetto antibatterico<sup>26,28,29</sup>.

### 3.4 Tecniche di monitoraggio per l'ottimizzazione dell'elettrofilatura (Reologia/Microscopia elettronica)

Un reometro è uno strumento che misura le proprietà viscoelastiche dei materiali oltre la semplice viscosità come i classici viscosimetri. La reologia, dal greco  $\rho\acute{\epsilon}\omega$  che vuol dire scorrere, è la scienza che studia il flusso e la deformazione della materia sotto azione di forze esterne.

In questo caso ci concentreremo particolarmente sulla viscosità: che è uno dei parametri principali da controllare per la buona riuscita del processo di elettrofilatura. Per la sua determinazione si fa riferimento a studi reologici, che sfruttano le due grandezze fondamentali:

1. La velocità di deformazione detta anche *shear rate*  $\dot{\gamma}$ , che è il rapporto tra la velocità dell'oggetto che applica la deformazione  $v$  e lo spessore  $h$  lungo il quale è applicata (4.4.1.1)<sup>30</sup>.

$$\dot{\gamma} = \frac{1}{h} \frac{ds}{dt} = \frac{v}{h} \quad (3.4.1)$$

2. Lo sforzo di deformazione o di taglio detto anche *shear stress*  $\tau$ , il rapporto tra la forza  $F$  e la superficie  $A$  su cui è applicata (3.4.3)

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (3.4.3)$$

Il rapporto tra queste due grandezze ci restituisce la viscosità  $\eta$  (3.4.4).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{F h}{A v} \quad (3.4.4)$$

La viscosità  $\eta$  può essere definita come la capacità di un fluido di muoversi sotto l'azione di una forza esterna dove, a parità di sforzo, la velocità del fluido diminuisce con l'aumentare della viscosità. In questo modo  $\tau$  e  $\dot{\gamma}$  seguono una legge di proporzionalità diretta (3.4.5).

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (3.4.5)$$

Questo però è confermato solo per i cosiddetti fluidi Newtoniani ovvero nei casi in cui la viscosità dipende solo da temperatura e pressione. Quando si ha a che fare con fluidi complessi, come ad esempio le soluzioni polimeriche la viscosità dipende anche dalle condizioni di flusso e quindi dallo *shear rate*. In questo caso parliamo di fluidi non Newtoniani e lo sforzo non cresce più in modo direttamente proporzionale allo *shear rate* e la  $\eta$  risulta essere una funzione decrescente della  $\dot{\gamma}$  (3.4.6).

$$\tau = \eta(\dot{\gamma}) \cdot \dot{\gamma} \quad (3.4.6)$$

Questo comportamento è tipico delle soluzioni polimeriche e viene definito pseudoplastico o di *shear-thinning*. Presenta una regione di viscosità costante per bassi valori di shear rate quindi un iniziale comportamento newtoniano, seguita da una graduale diminuzione della viscosità all'aumentare dello *shear rate* (Figura 12).

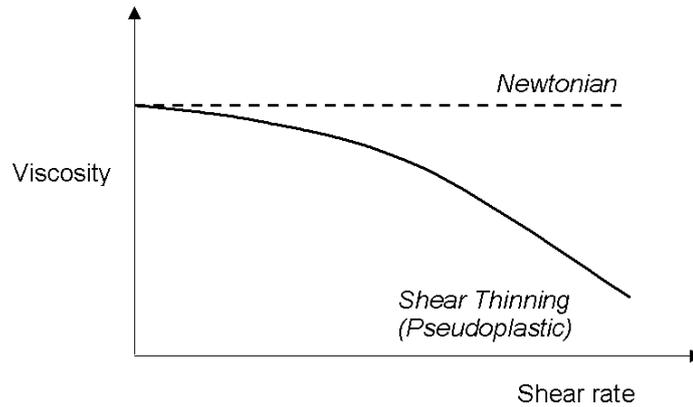


Figura 12 Andamento della viscosità vs. shear rate per un fluido pseudoplastico

Ciò è dovuto alla natura delle macromolecole. Infatti, le catene polimeriche per sforzi di taglio nulli o molto bassi, creano una fitta rete di vincoli topologici, chiamati *entanglements*. All'aumentare dello stress applicato, questi vincoli si sciolgono e le catene si orientano lungo le linee di flusso, abbassando la viscosità della soluzione (Figura 13)<sup>26,31</sup>.

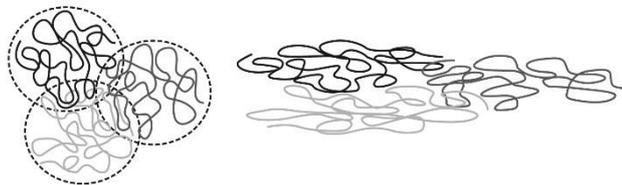


Figura 13 Comportamento delle macromolecole soggette ad uno sforzo di taglio.

Dalla letteratura, è stato dimostrato che è possibile elettrofilare soluzioni di chitosano se  $\eta_0$ , che rappresenta la viscosità a velocità di deformazione pari a zero, si aggira intorno a 10 Pa·s. Il valore di  $\eta_0$  viene determinato andando a graficare (Figura 14) i dati sperimentali con il modello di Carreau-Yasuda (3.4.7)<sup>32</sup>.

$$\eta = \eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty}) \cdot [1 + (K\dot{\gamma})^a]^{\frac{n-1}{a}} \quad (3.4.7)$$

1.  $\eta_0$  viscosità a shear rate pari a zero
2.  $\eta_\infty$  viscosità per shear rate che tende ad  $\infty$
3. K consistenza o tempo caratteristico
4. n parametro che indica il tipo di regime in cui ci troviamo
5. a parametro che incide sulla transizione tra regime newtoniano e non-newtoniano.

Accoppiando questo tipo di studio reologico delle soluzioni da elettrofilare, con lo studio morfologico delle membrane elettrofilate, eseguito tramite microscopia a scansione elettronica (SEM), è possibile identificare il valore esatto di  $\eta_0$  della soluzione per cui è possibile ottenere delle fibre prive di difetti (*beads*). Secondo studi presenti in letteratura, ad oggi è possibile elettrofilare soluzioni che presentano una concentrazione globale di polimero che si aggira intorno a valori di 5% e 7% w/v ed il rapporto tra chitosano e PEO in miscela risulta essere 50/50 con una preferenza verso concentrazioni di polimero tra 6-7% (Figura 14-15)<sup>28</sup>.

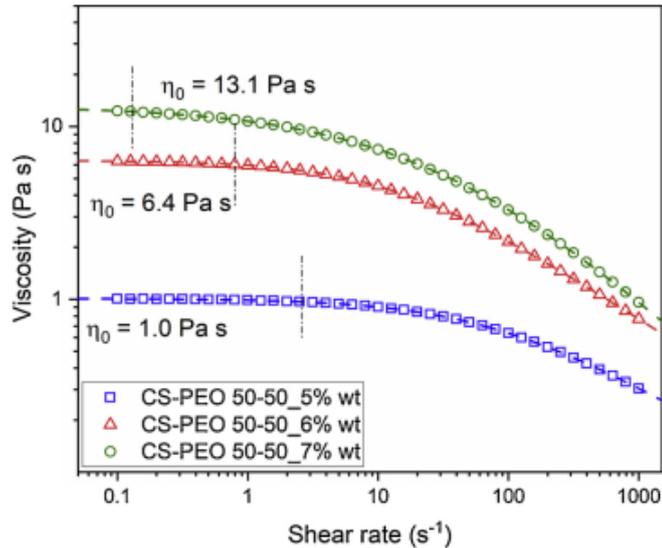


Figura 14 Curve di flusso di diverse soluzioni di chitosano e PEO elaborate con il modello di Carreau-Yasuda<sup>24</sup>

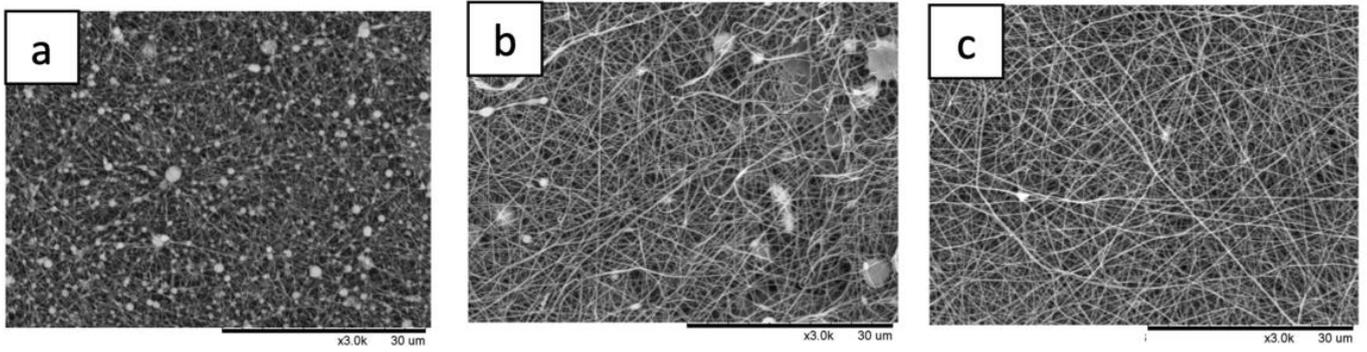


Figura 15 Immagini SEM delle membrane a base di CS preparate; a) da soluzione CS-PEO 50-50 5 % in peso, b) da soluzione CS-PEO 50-50 6 % in peso e c) da soluzione CS-PEO 50-50 7 % in peso<sup>24</sup>

## **PARTE SPERIMENTALE**

## 4 MATERIALI E METODI

### 4.1 Protocollo di deacetilazione e degradazione del chitosano

La messa a punto di una metodica di deacetilazione e degradazione controllata del chitosano può essere utile per comprendere gli effetti che questi processi possono apportare alla chimica del chitosano stesso, conferendogli proprietà chimico-fisiche differenti e permettendo il suo utilizzo in diversi campi tra cui quello dell'elettrofilatura. Per la deacetilazione del chitosano è stata messa a punto una metodica che ne permettesse l'ottenimento a diversi gradi di DDA%. A causa della particolare sensibilità del chitosano all'ambiente fortemente acido, si è deciso di procedere con un'idrolisi basica che eviti fenomeni degradativi. Il chitosano, utilizzato per questa campagna sperimentale, è stato il chitosano commerciale Krill (KCCS  $\bar{M}_v = 1,2 \cdot 10^7$  g/mol e DDA = 17%). La metodica a cui si fa riferimento risale ad un precedente lavoro di dottorato eseguito presso l'Università di Genova<sup>33</sup>.

Per il processo di deacetilazione è stata utilizzata una soluzione di NaOH al 47% v/v, mantenendo il sistema sotto costante agitazione e a una temperatura di 90°C. Da letteratura è noto come il tempo di reazione influenzi il DDA%<sup>14</sup>: pertanto, allo scopo di ottenere prodotti a diverso grado di deacetilazione ogni ora, (su un totale di 3 ore di reazione) ne è stata prelevata un'aliquota. I diversi campioni sono stati siglati: KCCS-D1, KCCS-D2 e KCCS-D3 rispettivamente. Successivamente, ogni aliquota di campione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e lavata con acqua fino al raggiungimento della neutralità delle acque di lavaggio, e infine posta ad essiccare in stufa a 30°C sottovuoto.

Riguardo la degradazione controllata, secondo letteratura, uno dei metodi più utilizzati per rompere il legame glicosidico è risultato essere l'idrolisi acida.

Come condizioni di reazione sono state utilizzate quelle messe a punto in un precedente lavoro di dottorato; ovvero sono stati pesati 0,5 g di KCCS-D1 e solubilizzati in un pallone da 250 mL con 100 mL di una soluzione di HCl 0,6 mol/L a 50 °C sotto agitazione magnetica. Quindi, la soluzione è stata divisa in due aliquote, una prima aliquota di 50 mL prelevata dopo 30 minuti di reazione (KCCS-D1-M1) e la seconda dopo 1 ora (KCCS-D1-M2). Infine, il chitosano è stato fatto precipitare riversando le aliquote in un becker da 500mL contenente NaOH 0,5 mol/L, ed è stato quindi filtrato, lavato con

acqua e posto ad essiccare in stufa sottovuoto. Tale metodica è stata applicata anche per tutti gli altri campioni di chitosano deacetilati in precedenza (KCCS-D2, KCCS-D3). Per terminare questo studio sono stati calcolati i gradi di deacetilazione tramite spettroscopia IR di tutti i campioni e le loro rispettive masse molecolari mediante misure viscosimetriche<sup>33,34</sup>.

## 4.2 Sintesi delle nanoparticelle d'oro

Per la sintesi delle nanoparticelle d'oro (AuNP) i reagenti utilizzati sono stati:

1. Chitosano KCCS  $\bar{M}_v = 1,2 \cdot 10^7$  g/mol e DDA% = 17%)
2. Acido acetico
3. Acido tetracloroaurico (HAuCl<sub>4</sub>, Alfa Aesar)
4. Sodio tetraboro idruro (NaBH<sub>4</sub>, Alfa Aesar)
5. Acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Fluka)
6. Perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 22 volumi, Sigma-Aldrich)

La sintesi è stata eseguita in una beuta da 50 mL precedentemente pulita con soluzione piranha (70% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 30% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), per eliminare eventuali impurezze presenti sulla vetreria che potrebbero causare fenomeni di aggregazione delle AuNP. Una volta pulita la vetreria, si è potuto procedere con la sintesi, che è stata eseguita aggiungendo a 20 mL di una soluzione acquosa di HAuCl<sub>4</sub> (4,16 mmol/L) 1 mL di una soluzione di chitosano 0,1% w/v in acido acetico 0,1% v/v. Il chitosano ha un ruolo fondamentale nella sintesi delle nanoparticelle perché agisce da stabilizzante. Alla miscela così ottenuta sono stati aggiunti sotto agitazione magnetica 0,1 mL di una soluzione 0,01 mol/L di NaBH<sub>4</sub>. Con l'aggiunta del riducente il colore della soluzione cambia repentinamente da giallo a rosso-violetto scuro a testimonianza dell'avvenuta formazione di nanoparticelle d'oro stabilizzate con chitosano (AuNP@Chit) (Figura 16).

Terminata la sintesi, le nanoparticelle sono state frazionate mediante centrifugazione a 8000 rpm per 10 minuti. Sono state così isolate due frazioni: il surnatante, denominato AuNP@Chit-S, e il precipitato, ripreso con uguale volume di acqua bidistillata e denominato AuNP@Chit-P. Entrambe le frazioni sono state caratterizzate spettroscopicamente (con 1800 Shimadzu®) e morfologicamente (SEM) come descritto nel paragrafo 5.2 inerente ai risultati.



*Figura 16 Immagine della sospensione di nanoparticelle d'oro stabilizzate con chitosano.*

### **4.3 Preparazione delle soluzioni di Chitosano/PEO**

Per la preparazione delle soluzioni è stato utilizzato un chitosano (Low Molecular Weight) fornito dalla Sigma Aldrich, che avrebbe dovuto possedere le stesse caratteristiche di quello usato nella letteratura di riferimento<sup>28</sup> e che secondo scheda tecnica avrebbe dovuto avere un DDA%  $\geq 75\%$ . Per avere un valore definito è stato comunque calcolato il DDA% mediante metodo FT-IR di Moore e Roberts (vedi paragrafo 1.4.1) e in realtà la caratterizzazione ci ha restituito un DDA% = 38%. Inoltre è stato fatto anche uno studio reologico, come per il KCCS, per determinare la massa molecolare che è risultata essere 2800 kDa (in Appendice sono riportati i risultati relativi alla caratterizzazione del chitosano Sigma Aldrich®). In base ai risultati ottenuti dalle nostre caratterizzazioni è stato necessario modificare quanto riportato in letteratura<sup>28</sup> allo scopo di ottenere soluzioni con le caratteristiche opportune per condurre un processo di elettrofilatura; l'agente di co-spinning utilizzato per il processo è stato il PEO 900 kDa, inoltre tutte le soluzioni sono state additivate con Triton-X 100 (Figura 17) allo scopo di regolare la tensione superficiale rendendo più stabile il cono di Taylor durante l'elettrofilatura.

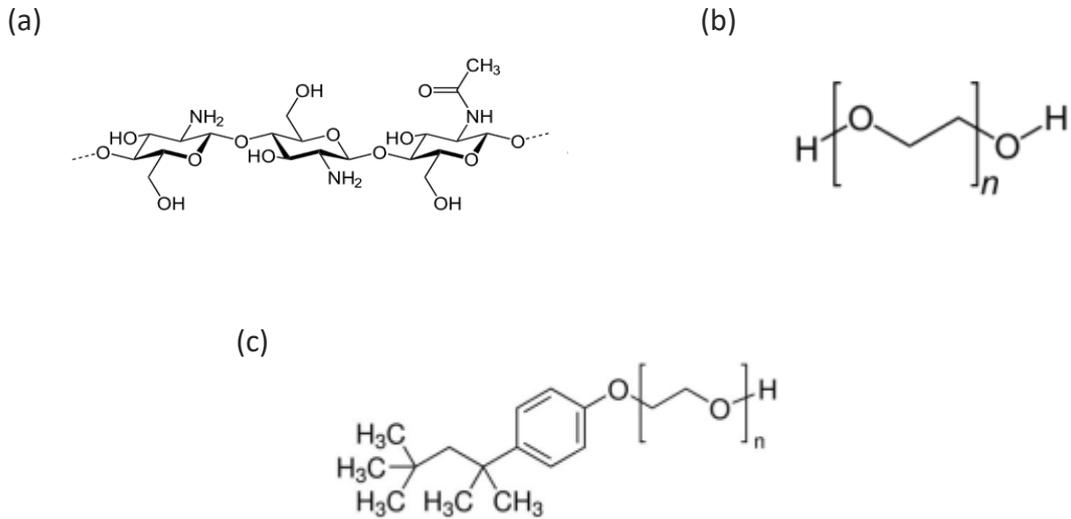


Figura 17 formule di struttura di chitosano (a), PEO (b) e Triton X-100 (c)

Allo scopo di creare delle soluzioni ternarie di Chitosano, PEO e AuNP in grado di essere elettrofilate, è stato necessario condurre inizialmente uno studio reologico su soluzioni binarie di solo Chitosano e PEO. Ciò è stato fatto per identificare l'esatto rapporto che deve esserci tra i due polimeri e la loro concentrazione globale in modo tale da permettere la loro elettrofilatura. Per la preparazione di queste soluzioni, si è seguita una metodica reperita in letteratura<sup>28</sup>, eseguendo accuratamente tutti i suoi passaggi e rispettando tutti i suoi tempi. Il rapporto tra i due polimeri in soluzione è stato mantenuto sempre al 50/50 Chitosano/PEO. Al fine di identificare la concentrazione ottimale ad elettrofilare sono state preparate soluzioni a diversa concentrazione globale di polimero (Tabella 2): 6%, 5,6%, 4,5% e 4%. Dai risultati delle prove reologiche si è riscontrato che la concentrazione globale di polimero ideale all'elettrofilatura del sistema finito in questo caso si aggirasse intorno al 4,5% w/v.

Tabella 2 Composizione delle differenti soluzioni di chitosano e PEO

Campione	Volume soluzione	Quantità chitosano	Quantità PEO	Quantità Triton-X
CS-PEO 50/50 6% w/v	40 mL	1,2 g	1,2 g	0,4 g
CS-PEO 50/50 5,6% w/v	40 mL	1,12 g	1,12 g	0,4 g
CS-PEO 50/50 4,5% w/v	40 mL	0,9 g	0,9 g	0,4 g
CS-PEO 50/50 4% w/v	40 mL	0,8 g	0,8 g	0,4 g

Le soluzioni sono state preparate in 3 step, facendo passare 24 h tra un passaggio e l'altro. Inizialmente è stata pesata la quantità desiderata di chitosano e PEO in parti uguali ed entrambi i due polimeri sono stati solubilizzati separatamente, mediante agitatori magnetici, in una soluzione al 5% di acido acetico. In seguito le soluzioni sono state miscelate ed infine si è proceduto con l'aggiunta di un 1% w/v di Triton X-100. L'aggiunta di tensioattivo non è stata mai variata al contrario delle concentrazioni dei due polimeri<sup>28,35</sup>.

#### 4.4 Preparazione delle soluzioni Chitosano/PEO/AuNP

A partire dalla soluzione più promettente di chitosano e PEO a 4,5% è stata preparata una soluzione con l'aggiunta delle AuNP. La metodica seguita è risultata identica a quella descritta in precedenza con la differenza che, una volta realizzata la soluzione binaria chitosano-PEO, è stato aggiunto un volume noto di sospensione di AuNP@Chit-S precedentemente preparata per arrivare ad ottenere una formulazione elettrofilabile. Per convenzione si continuerà a chiamare la soluzione CS-PEO 50/50 4,5% + AuNP, ma a livello pratico avviene una piccola diluizione e in realtà la concentrazione globale di polimero sarà del 4,34% w/v.

## 4.5 Misure reologiche

Al fine di determinare la massa molecolare viscosimetrica del KCCS e dei suoi derivati deacetilati e degradati e di caratterizzare e identificare la concentrazione globale di chitosano Aldrich, adatta all'elettrofilatura di una soluzione di chitosano-PEO-AuNP, sono stati eseguiti mirati test reologici. Le misure reologiche sono state realizzate mediante un reometro rotazionale Anton Paar Physica® MCR 301 (Figura 18), comprensivo di un sistema Peltier per il controllo della temperatura.



Figura 18 Reometro rotazionale Anton Paar Physica MCR 301

Per la buona riuscita delle misure sono state utilizzate due tipi di geometrie (Figura 19):

1. Double gap: adatto per lo studio della viscosità di soluzioni più diluite grazie alla maggiore area di contatto che si crea tra superficie e campione. È stato utilizzato per ricavare le viscosità di soluzioni diluite tra lo 0,1% w/v fino a 0,5% w/v di KCCS deacetilato e degradato per la determinazione della massa molecolare.
2. Cono piatto: diametro 50 mm, angolo di 0,9° e gap fissato a 99  $\mu\text{m}$ . Questa geometria è risultata adatta per lo studio di soluzioni più viscosi per andare a identificare la concentrazione ideale per l'elettrofilatura.

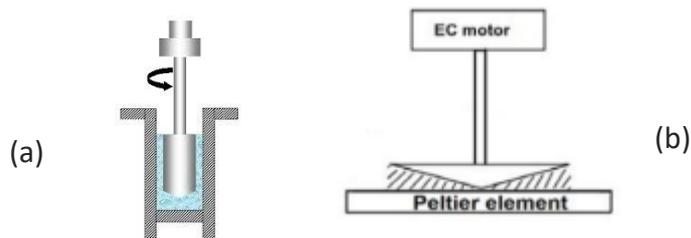


Figura 19 (a) Double gap, (b) cono piatto

Tutte le misure sono state eseguite in continuo, è stata scelta una temperatura di riferimento alla quale condurre la misura ed è stato valutato il comportamento viscoelastico del materiale. Le analisi, che fanno uso del *Double Gap*, sono state effettuate a  $T=25^{\circ}\text{C}$ , poiché i valori di  $k$  e  $\alpha$  della relazione di Mark Houwink-Sakurada per il calcolo della  $\overline{M}_v$  sono tabulati per quella temperatura<sup>33,36</sup>. Con il cono piatto invece è stata utilizzata una  $T=20^{\circ}\text{C}$ , poiché l'elettrofilatura del chitosano veniva condotta alla temperatura sopra citata<sup>28</sup>.

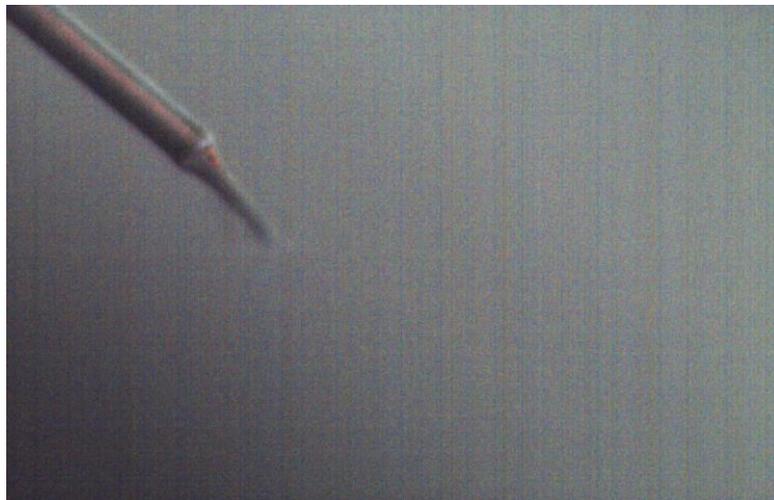
#### 4.6 Elettrofilatura delle soluzioni polimeriche

L'elettrofilatura delle soluzioni polimeriche è stata eseguita mediante l'uso del sistema Doxa® Microfluidics Electrospinning Professional Machine (Figura 20).



Figura 20 Doxa Microfluidics Electrospinning Professional Machine

Questo strumento è costituito da: un generatore ad alta tensione che permette di lavorare tra un *range* di 0 kV-30 kV, due pompe indipendenti che consentono la regolazione delle portate delle soluzioni contenute all'interno di siringhe, due aghi da cui esce la soluzione e ai quali si applica la differenza di potenziale. Il collettore utilizzato per recuperare la membrana è in alluminio e a seconda delle esigenze sperimentali può essere piatto o cilindrico. Anche ad esso è applicata una differenza di potenziale. Lo strumento permette anche il controllo sull'umidità della camera nella quale viene eseguita la lavorazione. Per una corretta elettrofilatura i parametri voltaggio, portata, umidità e distanza ago collettore sono stati determinati in maniera empirica osservando la stabilità del cono di Taylor con una telecamera interna allo strumento (Figura 21).



*Figura 21 Immagine del cono di Taylor stabile*

Le condizioni di elettrofilatura utilizzate per le soluzioni binarie di chitosano e PEO sono:

1. Collettore piatto
2. Portata pari a 0,2 ml/h
3. Voltaggio applicato pari a 23,5 kV sull'iniettore e 2,5 kV sul collettore.
4. L'umidità impostata al 50% per consentire una corretta evaporazione del solvente.

5. La distanza tra la punta dell'ago ed il collettore sempre mantenuta pari a 15 cm.
6. Diametro ago siringa 26 Gauge = 0,4 mm

Le condizioni di elettrofilatura utilizzate per le soluzioni di chitosano e PEO e AuNP sono:

1. Collettore cilindrico
2. Portata pari a 0,5 ml/h
3. Voltaggio applicato pari a 24,15 kV sull'iniettore e 2,70 kV sul collettore.
4. L'umidità impostata al 30% per consentire una corretta evaporazione del solvente.
5. La distanza tra la punta dell'ago ed il collettore sempre mantenuta pari a 15 cm.
6. Diametro ago siringa 26 Gauge = 0,4 mm

#### **4.7 Trattamento post-elettrofilatura delle membrane**

Dopo aver elettrofilato le membrane è necessario procedere con un trattamento di stabilizzazione che si suddivide in un processo di coagulazione e uno di reticolazione.

1. Coagulazione: questo trattamento è utile per neutralizzare l'acido acetico presente nella membrana limitando la solubilità delle fibre di chitosano in ambiente acquoso. In letteratura il bagno di coagulo più promettente utilizzato in questo caso è una soluzione di etanolo, ammoniaca e acqua in proporzione 7/2/1 a pH=7,5<sup>28</sup>.
2. Reticolazione: Dalla letteratura è noto che la reticolazione delle fibre è necessaria per migliorare la stabilità strutturale e le proprietà meccaniche della membrana. Uno tra i metodi più usati è la reticolazione fisica: la membrana viene immersa in una soluzione satura al 10% w/v di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Gli ioni fosfato vanno ad interagire con i gruppi amminici presenti sulle catene polimeriche del chitosano rendendo la struttura finale del materiale più rigida (Figura 22).

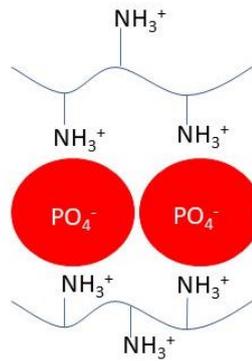


Figura 22 Schematizzazione della reticolazione fisica

A livello sperimentale questo passaggio è risultato essere uno dei più critici, poiché, non disponendo dello stesso chitosano usato in letteratura, il bagno di coagulo EtOH/NH<sub>3</sub> 1%/H<sub>2</sub>O 7:2:1 si è rivelato inadeguato alle membrane, siccome dall'analisi morfologica SEM si è rilevata una perdita della struttura fibrosa. Quindi si è proceduto ipotizzando tre metodi differenti di stabilizzazione: tentando prima a coagulare la membrana con i vapori di NH<sub>3</sub>, poi reticolandola direttamente in una soluzione al 10% di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e infine creando un bagno in queste proporzioni: EtOH/NH<sub>3</sub> 30%/ tampone fosfato 89:1:10 che permettesse contemporaneamente la coagulazione e la reticolazione della membrana. Dopo ogni trattamento le membrane sono state essiccate in stufa per poi essere caratterizzate al SEM. Inoltre, è stato utilizzato un calorimetro a scansione differenziale (DSC Q20 TA Instruments®) allo scopo di monitorare la reale rimozione dell'agente di co-spinning all'interno delle membrane.

## 5 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 5.1 Deacetilazione e degradazione del chitosano

Il chitosano commerciale Krill (KCCS) ( $\bar{M}_v = 1,2 \cdot 10^7$  g/mol e DDA = 17%) è stato sottoposto ad un trattamento di deacetilazione e degradazione seguendo le metodiche descritte nel paragrafo 5.1<sup>31</sup>. A titolo di esempio per far vedere come è avvenuta l'elaborazione dei dati sperimentali, si riportano i risultati relativi al campione sottoposto ad un singolo trattamento di deacetilazione e a due trattamenti di degradazione (KCCS D1\_M2). Inizialmente, allo scopo di determinare la viscosità intrinseca, e quindi la massa molecolare media viscosimetrica dei nostri campioni, sono state condotte le prove reologiche su soluzioni diluite di KCCS tra lo 0,1% w/v e 0,5% w/v ricavando la  $\eta_0$  per ciascuna soluzione (Figura 23). Successivamente, i valori di  $\eta_0$  ottenuti sono stati elaborati e attraverso le relazioni di Huggins e Kramer, è stato possibile ricavare graficamente (Figura 24) il valore di viscosità intrinseca  $[\eta]$ , corrispondente all'intercetta dei due modelli.

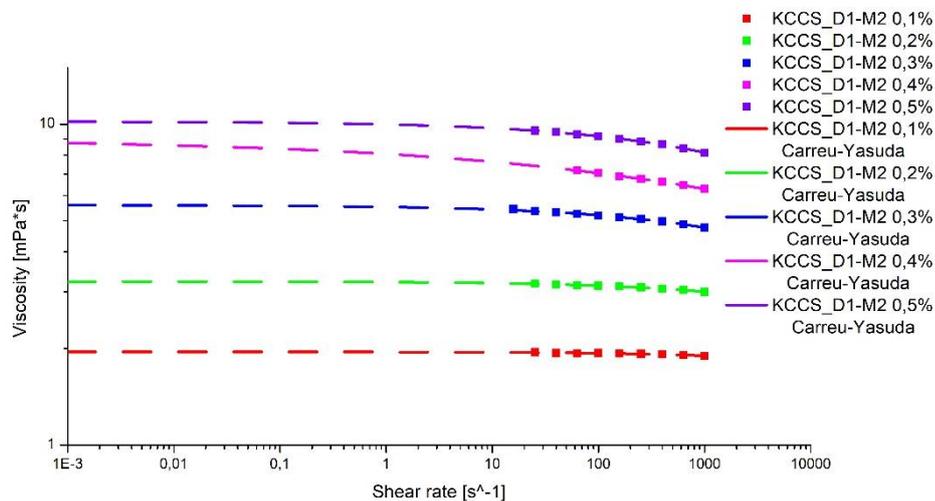


Figura 23 Prove reologiche su soluzioni diluite di KCCS\_D1\_M2. KCCS\_Dx\_My, x= n° di trattamenti di deacetilazione e y= n° di trattamenti di degradazione

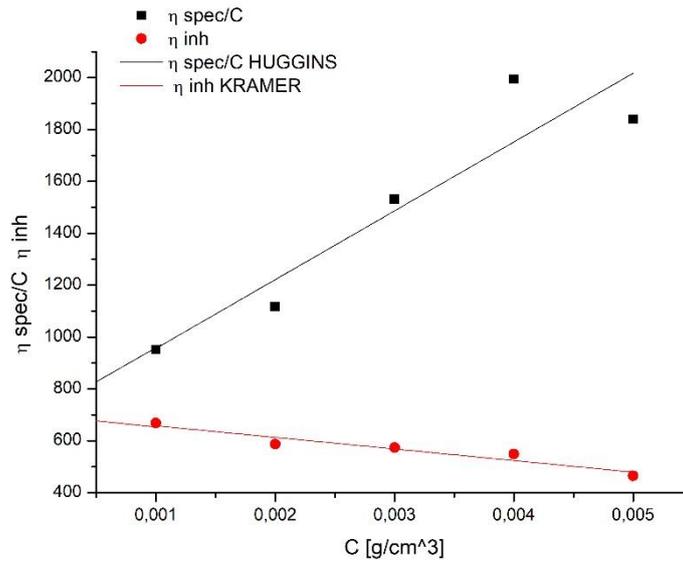


Figura 24 Relazioni di Huggins e Kramer per il campione D1-M2

In Tabella 3 sono raccolti i valori di  $[\eta]$  per tutti i campioni esaminati.

Tabella 3 risultati di viscosità intrinseca ricavati con i modelli di Huggins e Kramer

Campione	$[\eta]$ [dL/g]
KCCS_D1	6939,3
KCCS_D1_M1	1057,4
KCCS_D1_M2	696,5
KCCS_D2	6939,3
KCCS_D2_M1	752,2
KCCS_D2_M2	897,5
KCCS_D3	6939,3
KCCS_D3_M1	743,1
KCCS_D3_M2	799,3

Dal valore medio di  $[\eta]$  si è quindi ricavata la massa molecolare media viscosimetrica ( $\overline{M}_v$ ) attraverso l'equazione di Mark Houwink-Sakurada<sup>36</sup> (5.1.1):

$$[\eta] = k\overline{M}_v^\alpha \quad (5.1.1)$$

Il grado di deacetilazione (DDA%), è stato determinato mediante FTIR utilizzando il metodo di Moore e Roberts ampiamente discusso nel capitolo 1.4.1. A titolo di esempio in Figura 25 viene riportata l'elaborazione grafica realizzata per il campione KCCS\_D1\_M2.

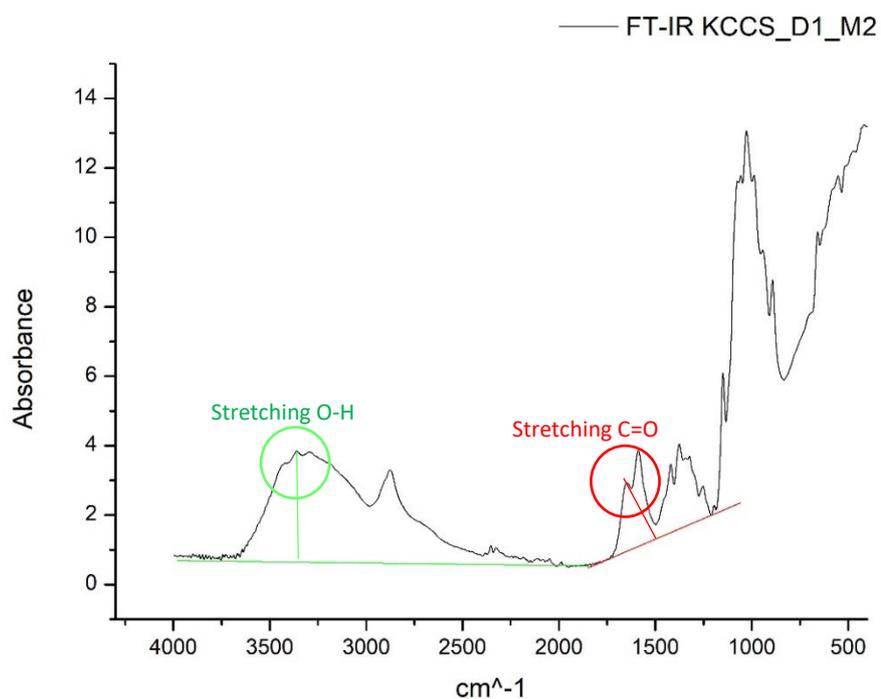


Figura 25 Spettro FT-IR del KCCS\_D1\_M2 elaborato mediante metodo di Moore e Roberts per determinare il DDA%

Tutti i risultati riguardanti il DDA% e  $\overline{M}_v$  di campioni investigati sono stati raccolti in Tabella 4.

Tabella 4 Valori del grado di N-deacetilazione e di  $\overline{M}_v$  dei campioni di chitosano KCCS sottoposti al trattamento di deacetilazione e riduzione della massa molecolare. KCCS\_Dx\_My, x= n° di trattamenti di deacetilazione e y= n° di trattamenti di degradazione

Campione	DDA %	$\overline{M}_v$ [g/mol]
KCCS_D1	73,6	$1,2 \cdot 10^7$
KCCS_D1_M1	63,4	$1,6 \cdot 10^6$
KCCS_D1_M2	48,7	$1,0 \cdot 10^6$
KCCS_D2	68,7	$1,2 \cdot 10^7$
KCCS_D2_M1	59,5	$1,1 \cdot 10^6$
KCCS_D1_M2	68,5	$1,3 \cdot 10^6$
KCCS_D3	66,6	$1,2 \cdot 10^7$
KCCS_D3_M1	71,9	$1,1 \cdot 10^6$
KCCS_D3_M2	69,5	$1,2 \cdot 10^6$

In Figura 26 vengono riportate a confronto le masse molecolari medie determinate a seguito dei diversi processi di degradazione/deacetilazione. Si può osservare chiaramente che il processo di deacetilazione non comporta variazioni significative della massa molecolare del KCCS, al contrario il trattamento per indurre la degradazione controllata induce una diminuzione della massa molecolare di circa un ordine di grandezza dopo il primo processo degradativo (M1), che permane invariata a seguito del successivo processo (M2). Pertanto, volendo indurre ulteriore degradazione potrebbe risultare necessario rendere più spinte le condizioni operative della metodica utilizzando soluzioni di HCl a concentrazione maggiore.

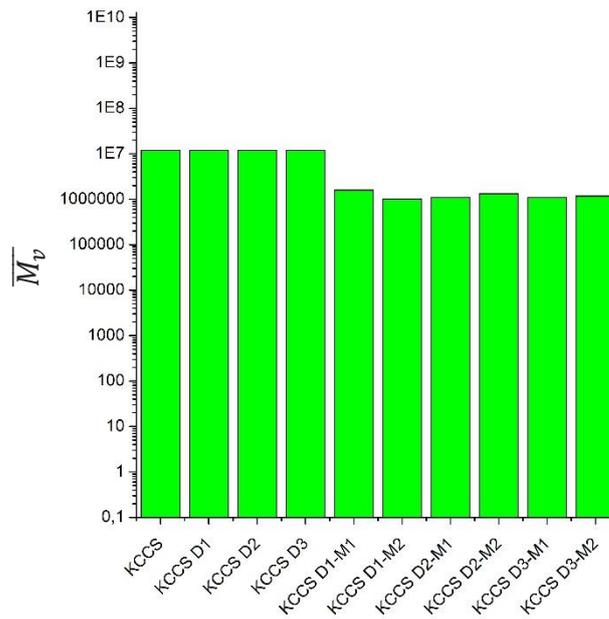


Figura 26 Istogramma riguardante la variazione della massa molecolare in seguito ai trattamenti di deacetilazione e degradazione

In Figura 27, sono riportati a confronto i DDA% dei campioni sottoposti ai diversi trattamenti; si evidenzia un forte aumento del DDA% successivo al primo processo di deacetilazione KCCS-D1, mentre non si riscontrano grandi differenze in seguito ai successivi processi di deacetilazione (KCCS-D2, KCCS-D3). Anche in questo caso come per la degradazione della massa molecolare potrebbe quindi rivelarsi necessario modificare la metodica utilizzando condizioni più severe, ovvero aumentando la concentrazione della soluzione di NaOH per i successivi trattamenti. Un ulteriore aspetto da prendere in considerazione è come la degradazione influenzi il DDA%. A seconda di quanto sono stati deacetilati i campioni (KCCS D1 (profilo rosso), D2 (profilo blu) e D3 (profilo viola)), si osservano comportamenti differenti quando questi vengono sottoposti a successiva degradazione. Nel caso del KCCS-D1 sia la prima che la seconda degradazione (KCCS-D1-M1, KCCS-D1-M2) portano ad un abbassamento del DDA%, ascrivibile all'ambiente fortemente acido. Per i campioni KCCS-D2 e KCCS-D3 si osserva, in seguito ai processi degradativi M1 e M2, un comportamento totalmente casuale nella variazione del DDA%. Questa casualità è giustificabile dall'avvento di fenomeni degradativi e di idrolisi acida dei gruppi ammidici in entrambi i campioni.

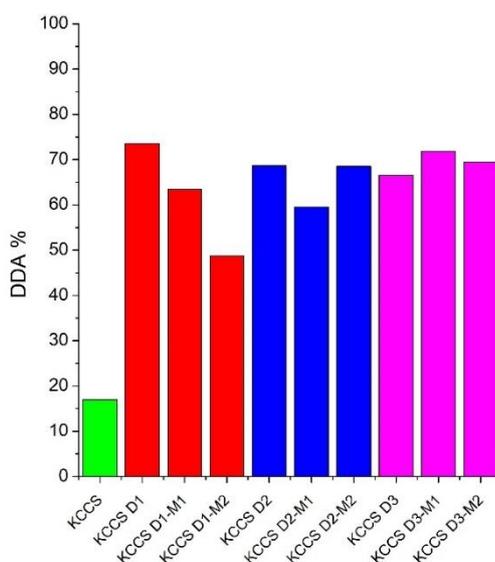


Figura 27 Istogramma riguardante la variazione del DDA% in seguito ai trattamenti di deacetilazione e degradazione. Campione non trattato (verde) campione deacetilato 1 volta (rosso), campione deacetilato 2 volte (blu), campione deacetilato 3 volte (viola)

## 5.2 Caratterizzazione AuNP

Al fine di verificare l'avvenuta formazione e la morfologia delle AuNP, i campioni sintetizzati, come descritto nel capitolo (5.2), sono stati caratterizzati tramite spettroscopia UV-Vis e microscopia FE-SEM. Di seguito si riportano i risultati ottenuti. In Figura 28 sono rappresentati gli spettri UV-Vis relativi alla soluzione grezza (AuNP@Chit, profilo nero) e alle frazioni surnatante (AuNP@Chit-S, profilo rosso) e precipitato (AuNP@Chit-P, profilo blu), ottenute per centrifugazione del grezzo. Lo spettro delle soluzioni acquose di nanoparticelle d'oro isotropiche è caratterizzato da una banda di assorbimento stretta e simmetrica posizionata intorno a 520 nm, corrispondente alla banda LSPR<sup>20</sup>. Il profilo spettrale nero è caratterizzato da un picco asimmetrico, a testimonianza della presenza di nanoparticelle disomogenee per dimensioni e/o forma in soluzione. Lo spettro della frazione surnatante si presenta con una banda di assorbimento più stretta e simmetrica con il picco posizionato a 524 nm, mentre la frazione precipitato è caratterizzata da una banda di intensità inferiore centrata per un valore di lunghezza d'onda leggermente superiore (526 nm). I risultati della

caratterizzazione spettroscopica confermano la buona riuscita del frazionamento per centrifugazione delle nanoparticelle disomogenee.

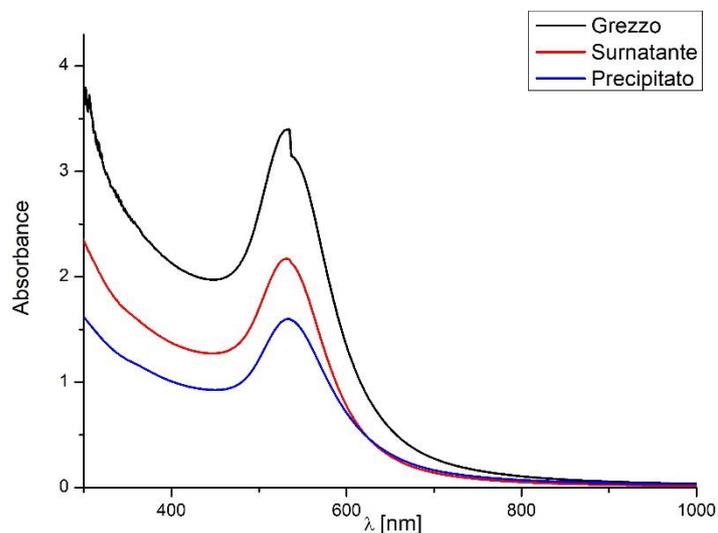


Figura 28 Spettri UV-Vis delle soluzioni colloidali di AuNP@Chit: grezzo (profilo nero), surnatante (profilo rosso), precipitato (profilo blu.)

Partendo dal rapporto delle intensità relative alla lunghezza d'onda a 400 nm si può calcolare la concentrazione di oro metallico, poiché è noto da studi di letteratura che l'assorbanza a tale lunghezza d'onda è indicativa della quantità di oro presente in soluzione indipendentemente dalla forma e dalle dimensioni delle nanoparticelle concentrazione di oro in nanoparticelle<sup>37,38</sup>. In Tabella 5 si riportano le concentrazioni di oro metallico nel grezzo e nel surnatante.

Tabella 5 Calcolo della concentrazione di oro metallico per il grezzo e per il surnatante

	$\lambda$ [nm]	Densità ottica a 400 nm	Au [mmol/L]
<b>AuNP@Chit-G</b>	400	10	4,16
<b>AuNP@Chit-S</b>	400	7	2,92

Al fine di ottenere informazioni dirette sulla morfologia delle nanoparticelle (diametro medio e rapporto di forma) e sulla concentrazione di AuNP@Chit-S presenti nella sospensione aggiunta successivamente alla soluzione da elettrofilare, si riportano di seguito, a titolo di esempio, alcune immagini ottenute dall'analisi FESEM dei campioni AuNP@Chit-S (Figura 29) e AuNP@Chit-P (Figura 30). Per l'elaborazione delle immagini è stato usato il software Image j®. Le immagini FESEM per le AuNP@Chit-P evidenziano la presenza di AuNP sferiche piuttosto omogenee sia per forma che per dimensione come sottolineano i dati riportati in Tabella 5. Per quello che riguarda la frazione surnatante AuNP@Chit-S l'immagine 30 manifesta la presenza di AuNP più eterogenee soprattutto per la forma al punto che sono presenti delle AuNP di forma ellissoidale e dei nanobastoncini sottili. Questo dato è confermato anche dai risultati di Tabella 5, in quanto sia la deviazione standard del diametro che il rapporto di forma risultano incrementati rispetto alla frazione precipitata (AuNP@Chit-P).

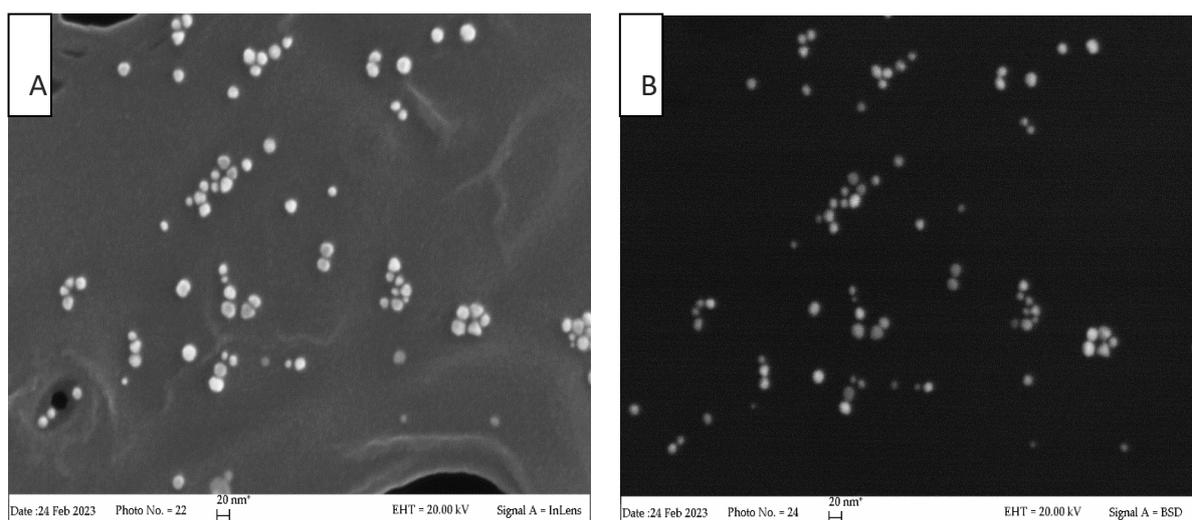


Figura 29 Immagini FE-SEM del campione AuNP@Chit-P ottenute in modalità diretta e back-scattered (A)= InLens, (B)= Back-scatterd

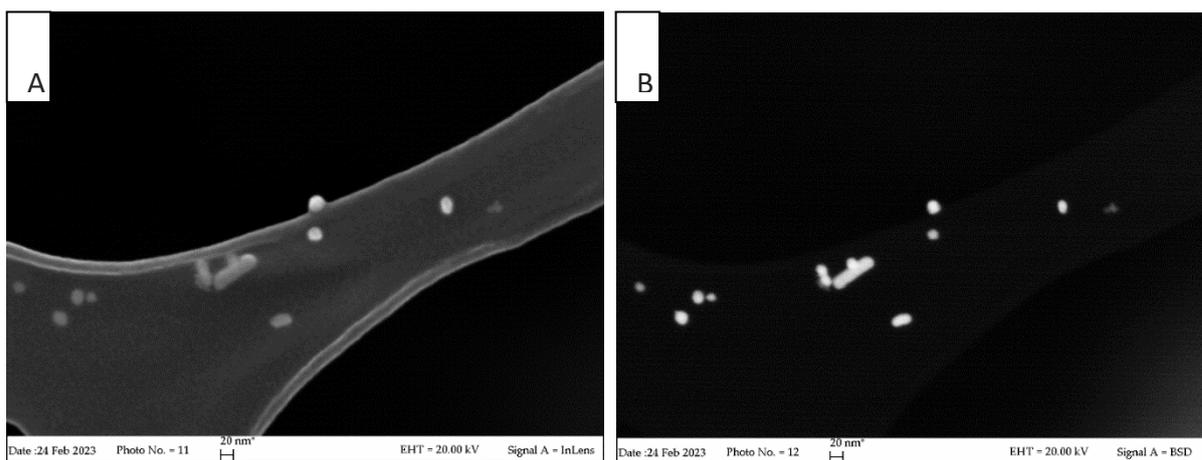


Figura 30 Immagini FE-SEM del campione AuNP@Chit-s ottenute in modalità diretta e back-scattered (a) = InLens, (b)= Back-scattered

Confrontando i dati di Tabella 6, si evince che il diametro medio del surnatante sia superiore rispetto alla frazione precipitata.

Tabella 6 Risultati dell'analisi morfologica sul precipitato e sul surnatante

	Diametro [nm]	Deviazione standard [nm]	Rapporto di forma	Deviazione standard
<b>AuNP@Chit-P</b>	$23,4 \pm 0,4$	3,8	$1,13 \pm 0,01$	0,13
<b>AuNP@Chit-S</b>	$27 \pm 2$	11	$1,23 \pm 0,07$	0,42

Questo risultato potrebbe essere dovuto al contributo, seppur minoritario, delle forme più anisotrope come i nanobastoncini, che determinano un aumento del diametro medio di nanoparticelle ipotizzate sferiche. Il fatto che le particelle più anisotrope siano presenti nella frazione surnatante, si giustifica come conseguenza che, aumentando l'anisotropia delle nanoparticelle, aumenta il volume idrodinamico delle stesse con conseguente maggiore difficoltà a sedimentare nelle condizioni sperimentali adottate. Queste supposizioni sono parzialmente confermate dal profilo spettrale del campione AuNP@Chit-S, che risulta meno simmetrico rispetto a quello del campione AuNP@Chit-P (Figura 30). Si può concludere che, nonostante non ci siano grosse

differenze strutturali tra la frazione surnatante e quella precipitata, il frazionamento per centrifugazione permette di isolare i sottoprodotti più anisotropi. Infine, conoscendo il diametro medio delle nanoparticelle e la concentrazione di oro metallico presenti nel surnatante è stato possibile calcolare la concentrazione di AuNP nella soluzione surnatante, che è risultata pari a 7,3 nmol/L. Tale valore è stato utilizzato per modulare la quantità di campione AuNP@Chit-S da aggiungere nella formulazione di chitosano per l'elettrofilatura.

### 5.3 Caratterizzazione reologica per l'elettrofilatura

Le prove reologiche, tese a individuare l'esatta concentrazione di polimero in soluzione per condurre in modo adeguato il processo di elettrofilatura, sono rappresentate in Figura 31 con i rispettivi dati sperimentali ed il modello di Carreau-Yasuda usato per estrapolare il valore di viscosità  $\eta_0$ . Ogni soluzione verrà siglata: CS/PEO\_50/50\_X dove X rappresenta la concentrazione di polimero in soluzione. In base alle informazioni ricavate dagli studi precedenti<sup>28</sup> la concentrazione complessiva di polimero più promettente per l'elettrofilatura dovrebbe essere quella al 6%. In realtà la misura reologica ha smentito tale risultato, poiché è stato ottenuto un valore di viscosità troppo elevato per elettrofilare la soluzione. Questa discrepanza con i risultati della letteratura è giustificabile dalla provenienza del chitosano. Quando si ha a che fare con polimeri naturali, risulta estremamente difficile uniformare le loro proprietà in un processo industriale siccome a seconda della provenienza di estrazione si potrebbero avere caratteristiche differenti. Al fine d'identificare il valore ideale di viscosità adatto al processo di elettrofilatura si è ricorsi alla preparazione di soluzioni di CS/PEO a concentrazioni via via decrescenti fino al raggiungimento di un valore di  $\eta_0$  che rispecchiasse la letteratura, intorno ai 10 Pa·s.

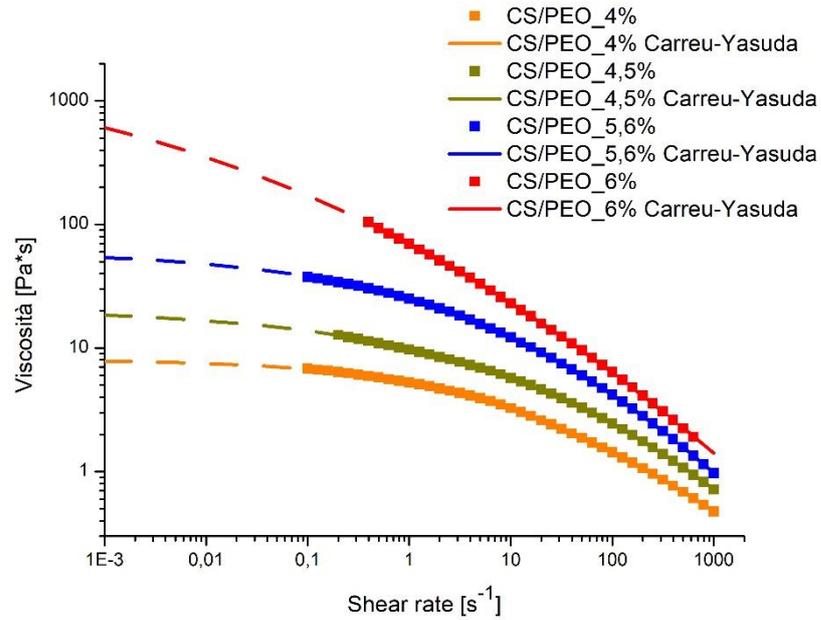


Figura 31 Curve reologiche delle soluzioni CS/PEO

In Tabella 7 sono riportati i valori di  $\eta_0$  per tutte le soluzioni investigate.

Tabella 7 Valori di  $\eta_0$  ricavati con le prove reologiche eseguite sulle soluzioni di CS/PEO investigate

Campione	$\eta_0$ [Pa·s]
6%	982,4
5,6%	53,9
4,5%	18,5
4%	7,8

La soluzione più promettente che è stata elettrofilata è risultata essere quella con concentrazione pari al 4% in peso di polimero con  $\eta_0 = 7,8$  Pa·s.

Successivamente si è proceduto con la preparazione delle soluzioni contenenti nanoparticelle d'oro preparate secondo la metodica descritta nel capitolo 5.1. Essendo che dalla letteratura è noto come le nanoparticelle metalliche possano abbassare la

viscosità delle soluzioni polimeriche a causa di diversi effetti (Interazione tra le nanoparticelle metalliche e i polimeri, Effetto lubrificante, Effetto di schermatura, Effetto Browniano, Effetto di sospensione) non quantificabili, in seguito all'aggiunta di AuNP, si è dovuto ricorrere ad ulteriori prove reologiche partendo da soluzioni a concentrazioni maggiori fino ad arrivare alla concentrazione che rende la soluzione elettrofilabile. Si è quindi proceduto con lo studio sulle soluzioni al 4,5% e 5,6% w/v, alle quali è stato aggiunto circa il 5,6% v/v di sospensione contenente le nanoparticelle d'oro (1,5mL/26,5 mL = sospensione AuNP / sospensione AuNP+ soluzione polimerica) cui sono state addizionate le AuNP. In Figura 32 sono riportate le curve di viscosità delle soluzioni investigate.

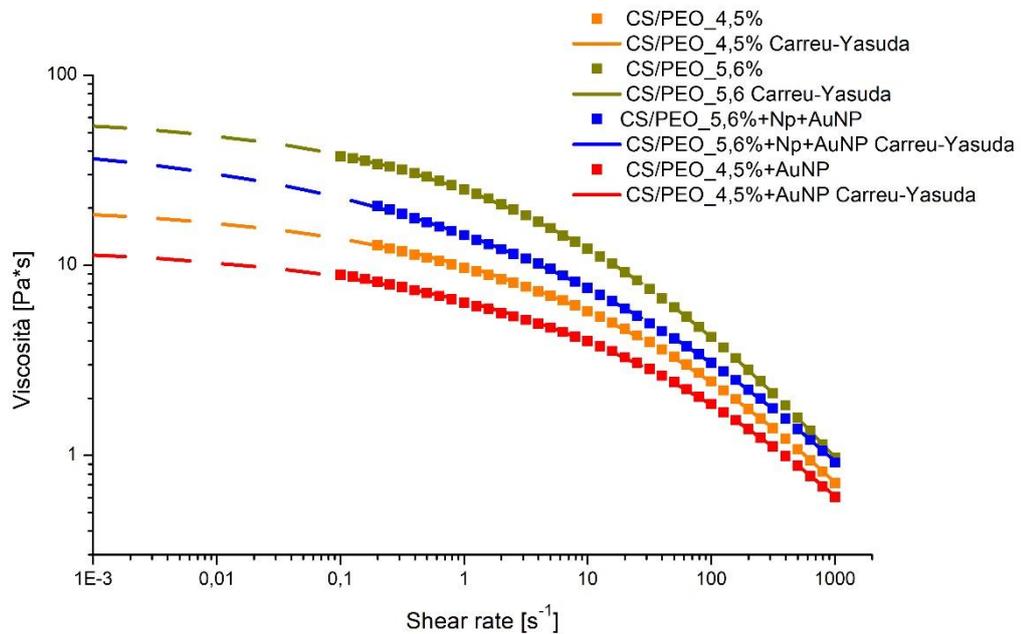


Figura 32 Curve reologiche delle soluzioni di CS/PEO caricate con le AuNP

Dai dati raccolti in Tabella 8, la soluzione ottenuta a partire da quella al 5,6% w/v risulta ancora troppo viscosa (38,4 Pa·s) per procedere al successivo processo di elettrofilatura, al contrario, quella ottenuta a partire dalla 4,5% w/v mostra un valore di  $\eta_0$  compatibile (11,3 Pa·s).

Tabella 8 Valori di  $\eta_0$  ricavati con le prove reologiche eseguite sulle soluzioni di CS/PEO caricate con le AuNP

Campione	$\eta_0$ [Pa·s]
5,6%	53,9
5,6%+Au Np	38,4
4,5%	18,5
4,5%+Au Np	11,3

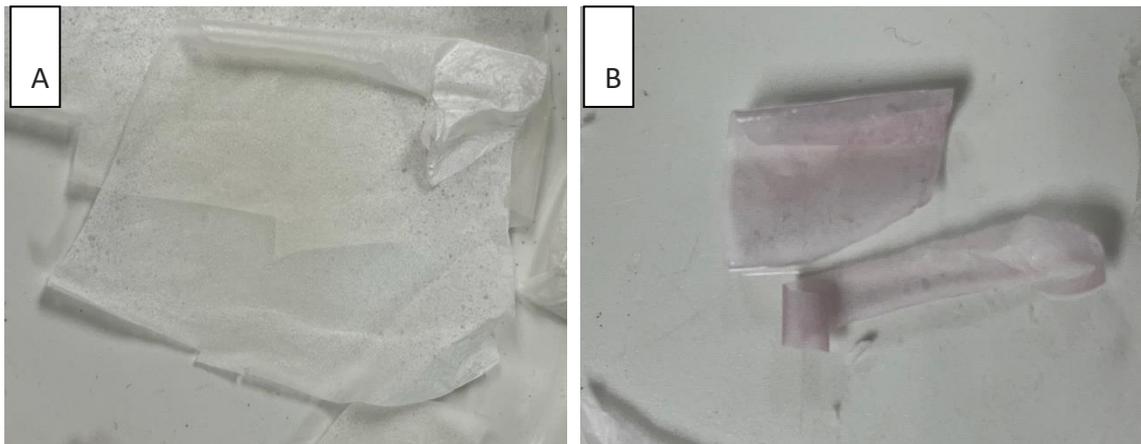
## 5.4 Caratterizzazione delle membrane

Sono state quindi ottenute membrane CS/PEO e CS/PEO/AuNP a partire dalle soluzioni al 4% w/v e 4,5% w/v rispettivamente. A dimostrazione del fatto che le soluzioni selezionate avevano le caratteristiche giuste per essere elettrofilate, in Figura 33 si riporta la formazione del cono di Taylor che comunemente si osserva durante il processo. L'immagine è stata acquisita mediante una telecamera presente all'interno della camera dello strumento.



*Figura 33 Immagine della formazione del cono di Taylor durante l'elettrofilatura*

Una volta terminato il processo di elettrofilatura le membrane ottenute si presentano di colore bianco (Figura 34 A) o tendente al rosa (Figura 34 B), a seconda se tal quali o additivate con AuNP, rispettivamente.



*Figura 34 Membrana CS/PEO\_4% (A), Membrana CS/PEO\_4,5%+AuNP (B)*

Le membrane ottenute sono state accuratamente analizzate mediante analisi morfologica SEM, le prime presso il dipartimento Soft Matters Physics, dell'Adolphe Merkle Institute a Friburgo, le seconde realizzate presso il DCCI. In Figura 35 sono riportate le immagini SEM a diversi ingrandimenti (10000 x, 25000x e 50000x) di una membrana elettrofilata a partire dalla soluzione CS/PEO\_4%.

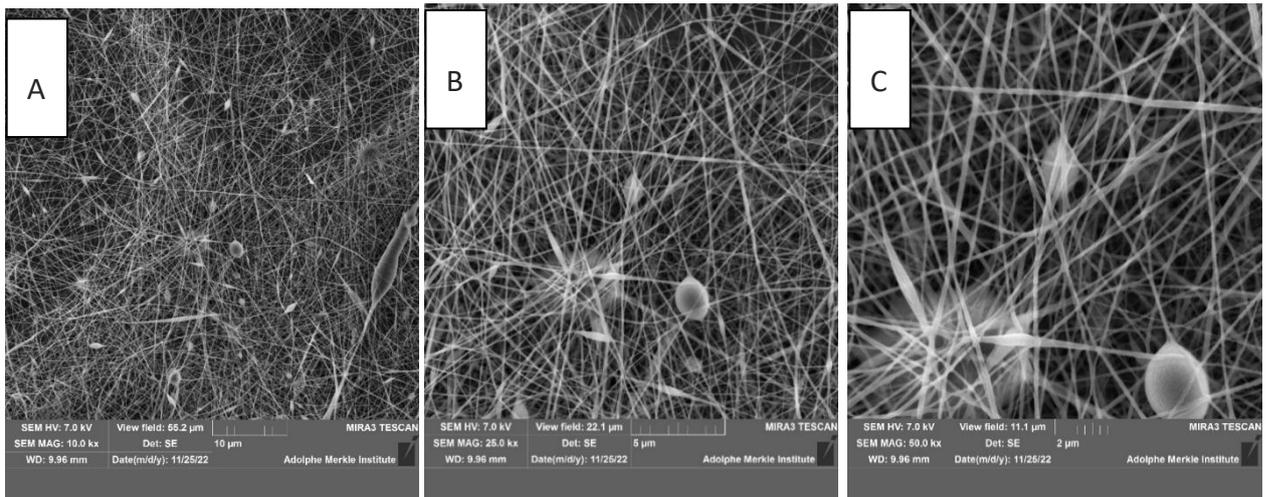


Figura 35 Immagini SEM CS/PEO\_4% a diversi ingrandimenti: A=10000X, B=25000X e C=50000X

Nonostante la presenza di alcuni difetti, la membrana risulta avere fibre di dimensioni regolari, di circa 100 nm, una buona porosità e non si riscontra una presenza troppo marcata di difetti (*beads*) sulle fibre.

In Figura 36 si rappresentano le immagini FE-SEM, relative al campione CS/PEO\_4,5% caricato con Au NP, a diversi ingrandimenti. Le immagini sono state realizzate in modalità mista per evidenziare attraverso gli elettroni back-scattered la presenza dell'oro. Tuttavia, solo ad ingrandimento 50000x è possibile intravedere qualche AuNP a causa delle loro dimensioni estremamente piccole e della loro bassa concentrazione nella soluzione da elettrofilare. Si è preferito non eseguire la misura in solo *back-scattered* perché si sarebbe persa l'informazione sulla morfologia delle fibre.

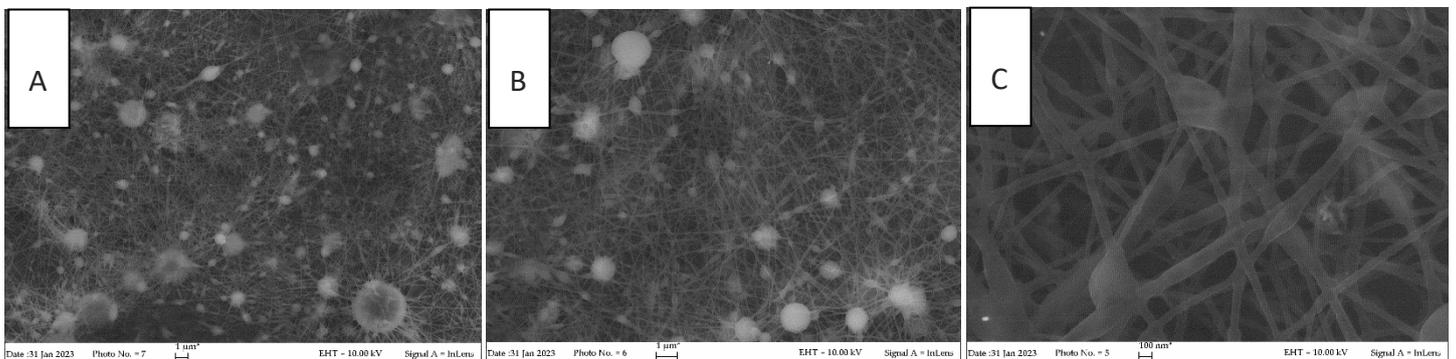


Figura 36 Immagini FE-SEM CS/PEO\_4,5%+Au NP a diversi ingrandimenti: A=10000X, B=25000X e C=50000X

Nonostante siano state usate condizioni di elettrofilatura lievemente differenti rispetto alla tal quale (CS/PEO\_4%) le fibre ottenute in questo caso presentano un diametro di circa 100nm. Al fine di stabilizzare le membrane così ottenute, è tuttavia necessario procedere con dei trattamenti di post produzione, quale un passaggio in bagno di coagulo per neutralizzare la membrana ed eliminare l'agente di co-spinning (solubilizzandolo) ed un successivo processo di reticolazione per renderla trattabile e resistente; tali processi sono stati ampiamente discussi nel paragrafo 4.7. In base a quanto riportato in letteratura<sup>28</sup> si è partiti usando un bagno di coagulo EtOH/NH<sub>3</sub> 1%/H<sub>2</sub>O 7:2:1. Le prime prove di post-trattamento sono state eseguite sulla membrana CS/PEO\_4%. In Figura 37 viene mostrata l'analisi morfologica fatta presso i laboratori di Friburgo sulle membrane così trattate.

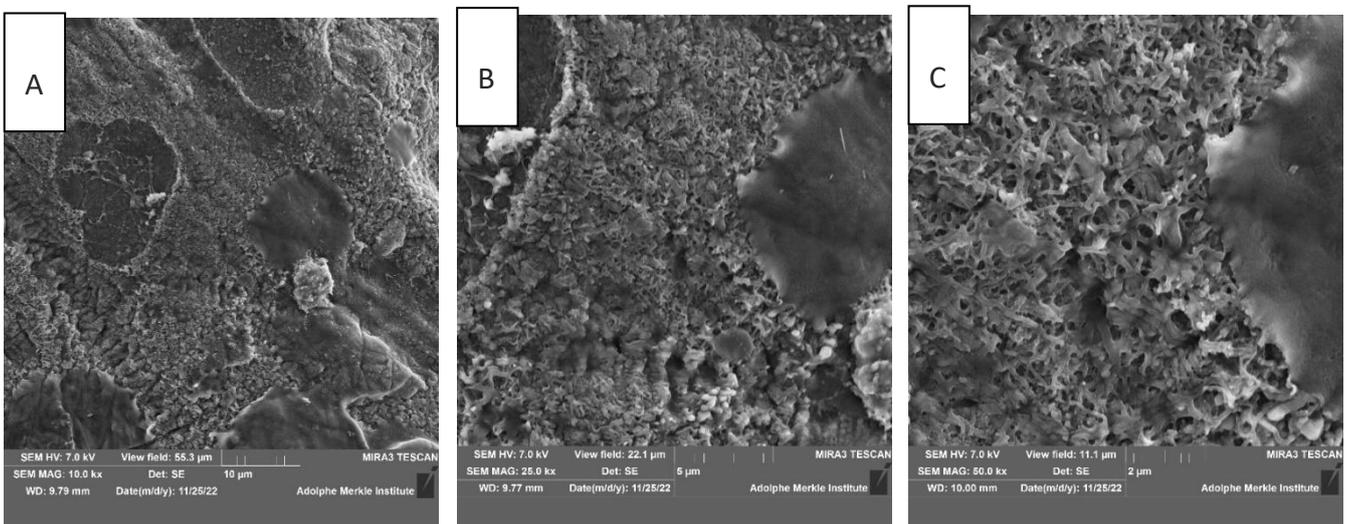


Figura 37 Membrana CS/PEO<sub>4</sub>% coagulata EtOH/NH<sub>3</sub> 1%/H<sub>2</sub>O 7:2:1 a diversi ingrandimenti: A=10000X, B=25000X e C=50000X

È apparso subito evidente che a seguito di questo post-trattamento la membrana nonostante conservasse parzialmente la sua struttura porosa andava a perdere la struttura fibrosa. A causa del risultato poco soddisfacente, si è optato, in seconda battuta, per l'utilizzo di vapori di ammoniaca come stabilizzante (Figura 38) prevedendo di poter eliminare l'agente di *co-spinning* (PEO) in fase di reticolazione essendo lui solubile in acqua. Anche in questo caso però le immagini SEM hanno dato un riscontro negativo poiché in seguito all'esposizione delle membrane ai vapori di ammoniaca si ha una scomparsa quasi totale della struttura fibrosa.



Figura 38 Membrana CS/PEO\_4% coagulata con vapori di  $NH_3$  a diversi ingrandimenti: A=10000X, B=25000X e C=50000X

Si è quindi deciso di abbandonare lo step di coagulazione e fare in modo che l'acido acetico presente nelle membrane evaporasse, si sono quindi lasciate le membrane sotto cappa per una settimana in modo da far evaporare tutto l'acido per poi procedere direttamente con lo step di reticolazione immergendo la membrana in una soluzione satura al 10% w/v di  $Na_2HPO_4$ . Purtroppo, anche in questo caso le membrane non presentavano una morfologia accettabile come evidente nelle immagini riportate in Figura 39.

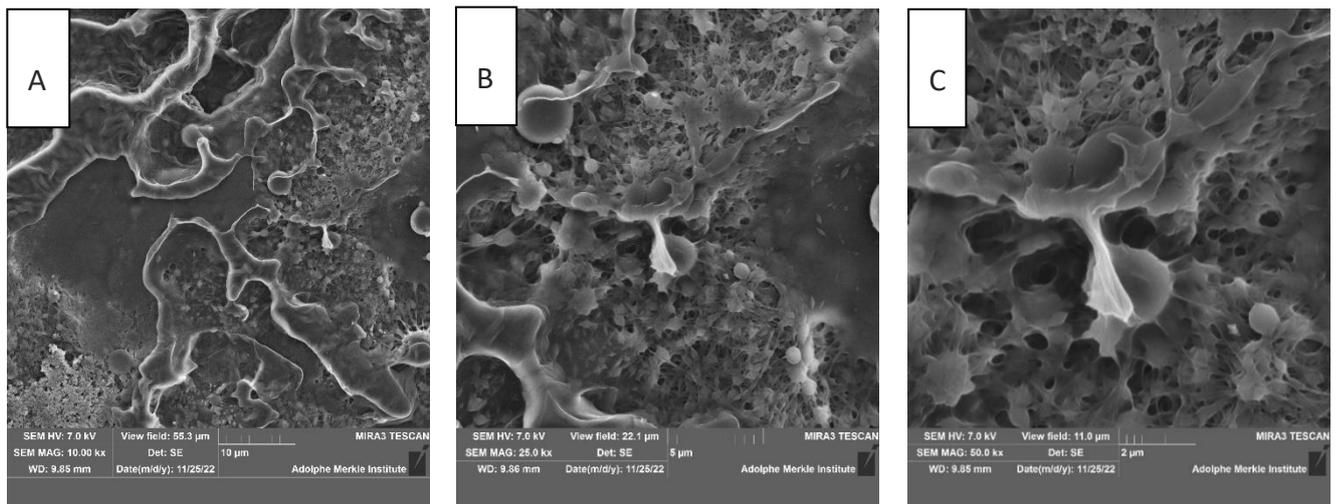


Figura 39 Membrana CS/PEO\_4% Direttamente RET

In base ai risultati ottenuti, si è quindi optato per procedere con un processo che prevedesse di eseguire il trattamento di coagulazione e reticolazione contemporaneamente creando un bagno di coagulo EtOH/NH<sub>3</sub> 30%/Tampone fosfato 89:1:10. Le immagini FE-SEM condotte sulla membrana CS/PEO\_4,5%+AuNP ci hanno restituito un risultato molto incoraggiante (Figura 40). Questo tipo di bagno di coagulo, infatti, permette di preservare la struttura fibrosa e porosa della membrana seppur comporti un aumento di difetti rispetto alla membrana appena elettrofilata.

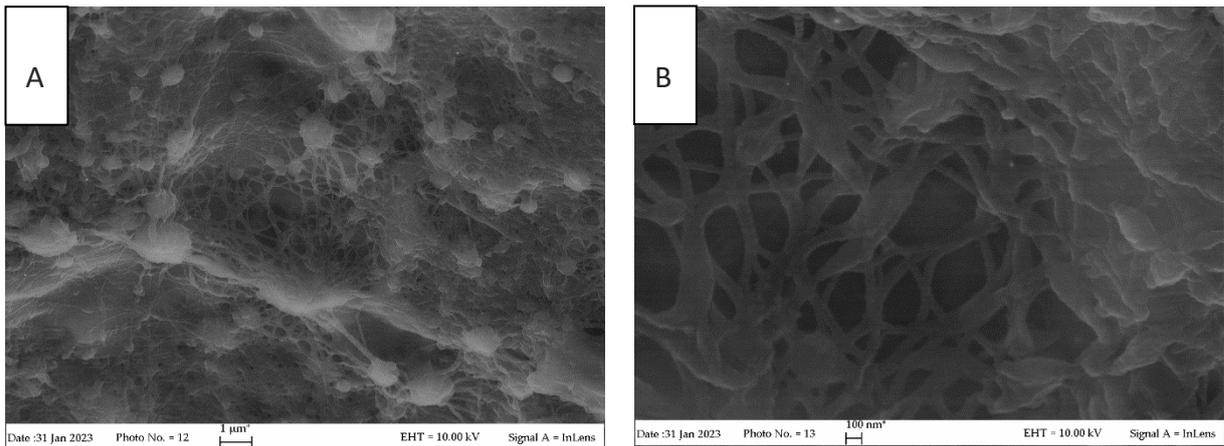


Figura 40 Immagini FE-SEM coagulazione e reticolazione contemporanea del CS/PEO\_4,5%+Au NP a diversi ingrandimenti: A=25000X e B=50000X

## 5.5 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Allo scopo di verificare l'efficacia nel rimuovere l'agente di co-spinning mediante i processi di stabilizzazione utilizzati, è stata condotta un'analisi termica via DSC sulle membrane trattate. Tenendo conto che la temperatura di fusione dell'agente di co-spinning (PEO) è attorno ai 60°C, si è proceduto con una scansione a partire da -20 fino a 120°C con velocità di riscaldamento di 10°/min. In Figura 41) vengono riportate le curve termiche per i vari campioni esaminati. Come si può chiaramente osservare, facendo un confronto tra i profili termici della membrana coagulata con EtOH/NH<sub>3</sub> 1%/H<sub>2</sub>O 7:2:1, direttamente reticolata e coagulata con EtOH/NH<sub>3</sub> 30%/Tampone fosfato 89:1:10 si può concludere che il solo processo di coagulazione non permette l'eliminazione del PEO, al contrario il con il solo processo di reticolazione si riesce ad eliminare il PEO, ma distruggiamo la membrana, mentre questo nuovo trattamento utilizzato permette non solo la più che parziale conservazione della struttura fibrosa

come osservato sopra, ma permette di eliminare completamente l'agente di *co-spinning*.

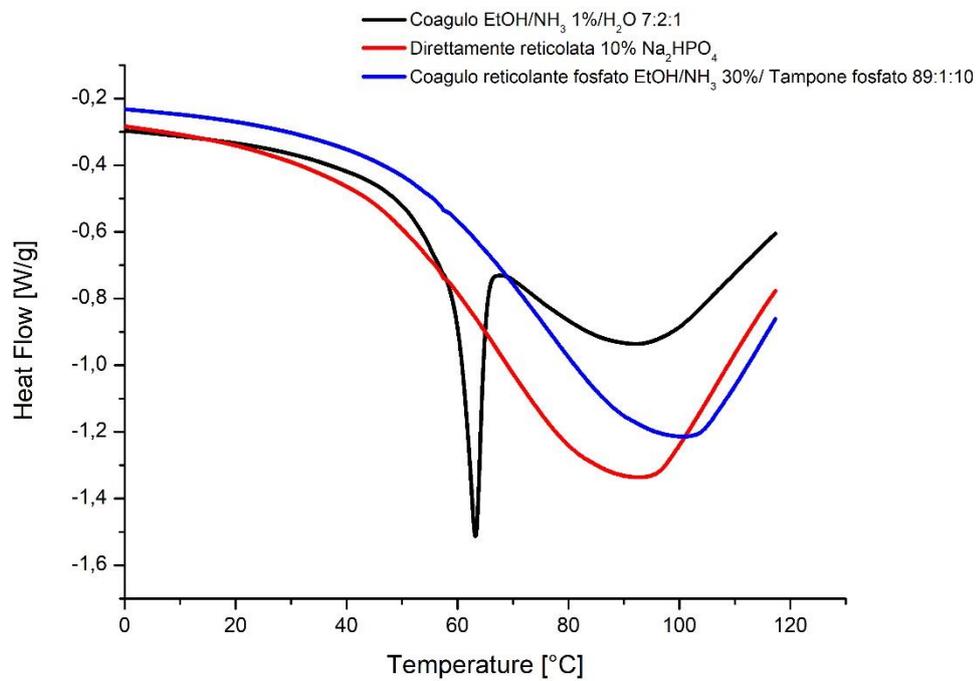


Figura 41 DSC su membrane: profilo nero EtOH/NH<sub>3</sub> 1%/H<sub>2</sub>O, profilo rosso direttamente reticolata 10% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, profilo blu coagulo reticolante EtOH/NH<sub>3</sub> 30%/Tampone fosfato 89:1:10

## 6 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il presente lavoro di tesi ha permesso, quindi, di mettere a punto:

1. una metodica di deacetilazione e di degradazione controllata del chitosano al fine di monitorarne in modo preciso i parametri molecolari;
2. un processo di elettrofilatura di soluzioni di chitosano Sigma Aldrich®/PEO 50/50 individuando la corretta concentrazione di polimero totale (4%w/v per il suddetto chitosano) attraverso un accurato studio reologico; inoltre, sono state anche individuate le condizioni ottimali per processare mediante elettrofilatura soluzioni CS/PEO\_4,5% w/v additivate con AuNP (5,6% v/v di sospensione) per potenziali future applicazioni nella diagnostica medica;
3. un nuovo metodo di trattamento di post-produzione per la stabilizzazione delle membrane ottenute mediante elettrofilatura, che permettesse la coagulazione e la reticolazione contemporaneamente.

Avendo posto una base solida sulla caratterizzazione del chitosano e la sua elettrofilatura, gli sviluppi futuri saranno molteplici:

1. implementare le metodiche di deacetilazione e di degradazione per riuscire ad ottenere DDA% più alti e masse molecolari più basse;
2. riuscire ad identificare una metodica che permetta di individuare a tavolino il corretto quantitativo di AuNP rispetto alla quantità di polimero in soluzione che fornisca una viscosità globale della soluzione idonea al processo di elettrofilatura;
3. ottimizzare il processo di post-produzione della membrana, individuando il sistema migliore per condurre in un unico passaggio il processo di coagulazione e di reticolazione;

4. Condurre l'opportuna caratterizzazione meccanica e dinamico-meccanica oltreché di biocompatibilità sulle membrane ottenute e verificarne il reale funzionamento in diagnostica medica.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- (1) Linthorst, J. A. An Overview: Origins and Development of Green Chemistry. *Found Chem* 2010, 12 (1), 55–68. <https://doi.org/10.1007/s10698-009-9079-4>.
- (2) Silva, A. C. Q.; Silvestre, A. J. D.; Vilela, C.; Freire, C. S. R. Natural Polymers-Based Materials: A Contribution to a Greener Future. *Molecules* 2022, 27 (1), 94. <https://doi.org/10.3390/molecules27010094>.
- (3) Haider, S.; Haider, A. *Electrospinning and Electro spraying: Techniques and Applications*; BoD – Books on Demand, 2019.
- (4) Rim, N. G.; Shin, C. S.; Shin, H. Current Approaches to Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. *Biomed. Mater.* 2013, 8 (1), 014102. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/1/014102>.
- (5) Liu, Y.; Hao, M.; Chen, Z.; Liu, L.; Liu, Y.; Yang, W.; Ramakrishna, S. A Review on Recent Advances in Application of Electrospun Nanofiber Materials as Biosensors. *Current Opinion in Biomedical Engineering* 2020, 13, 174–189. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2020.02.001>.
- (6) Jiang, T.; James, R.; Kumbar, S. G.; Laurencin, C. T. Chitosan as a Biomaterial. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*; Elsevier, 2014; pp 91–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00005-3>.
- (7) *Katayoon Kalantari, Amalina M. Afifi, Hossein Jahangirian, Thomas J. Webster, Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer – Review, Carbohydrate Polymers, Volume 207, 2019, Pages 588-600, ISSN 0144-8617, https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.011.*
- (8) Sapountzi, E.; Braiek, M.; Vocanson, F.; Chateaux, J.-F.; Jaffrezic-Renault, N.; Lagarde, F. Gold Nanoparticles Assembly on Electrospun Poly(Vinyl Alcohol)/Poly(Ethyleneimine)/Glucose Oxidase Nanofibers for Ultrasensitive Electrochemical Glucose Biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2017, 238, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.062>.
- (9) Londhe, S.; Haque, S.; Patra, C. R. Chapter 8 - Silver and Gold Nanoparticles: Potential Cancer Theranostic Applications, Recent Development, Challenges, and Future Perspectives. In *Gold and Silver Nanoparticles*; Sahoo, S., Hormozi-Nezhad, M. R., Eds.; Micro and Nano Technologies; Elsevier, 2023; pp 247–290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99454-5.00006-8>.
- (10) Crini, G. Historical Review on Chitin and Chitosan Biopolymers. *Environ Chem Lett* 2019, 17 (4), 1623–1643. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00901-0>.
- (11) Morin-Crini, N.; Lichtfouse, E.; Torri, G.; Crini, G. Applications of Chitosan in Food, Pharmaceuticals, Medicine, Cosmetics, Agriculture, Textiles, Pulp and Paper, Biotechnology, and Environmental Chemistry. *Environ Chem Lett* 2019, 17 (4), 1667–1692. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00904-x>.

- (12) Mohan, K.; Ganesan, A. R.; Ezhilarasi, P. N.; Kondamareddy, K. K.; Rajan, D. K.; Sathishkumar, P.; Rajarajeswaran, J.; Conterno, L. Green and Eco-Friendly Approaches for the Extraction of Chitin and Chitosan: A Review. *Carbohydrate Polymers* 2022, 287, 119349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119349>.
- (13) Xingke Li, Wenshui Xia, *Effects of concentration, degree of deacetylation and molecular weight on emulsifying properties of chitosan*, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 48, Issue 5, 2011, Pages 768-772, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.02.016>.
- (14) Loleny Tavares, Elí Emanuel Esparza Flores, Rafael Costa Rodrigues, Plinho Francisco Hertz, Caciano Pelayo Zapata Noreña, *Effect of deacetylation degree of chitosan on rheological properties and physical chemical characteristics of genipin-crosslinked chitosan beads*, *Food Hydrocolloids*, Volume 106, 2020, 105876, ISSN 0268-005X, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105876>.
- (15) Chang, S.-H.; Wu, C.-H.; Tsai, G.-J. Effects of Chitosan Molecular Weight on Its Antioxidant and Antimutagenic Properties. *Carbohydrate Polymers* 2018, 181, 1026–1032. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.047>.
- (16) Joydeep Dutta, Priyanka. *A facile approach for the determination of degree of deacetylation of chitosan using acid-base titration | Elsevier Enhanced Reader*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09924>.
- (17) Czechowska-Biskup, Renata, et al. "Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparision of methods." *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 17 (2012): 5-20.
- (18) Zam, Z. Z.; Muin, F.; Fataruba, A. Identification of Chitosan Beads from Coconut Crab Patani Variety Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). *J. Phys.: Conf. Ser.* 2021, 1832 (1), 012014. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1832/1/012014>.
- (19) Kasaai, M. R. A Review of Several Reported Procedures to Determine the Degree of N-Acetylation for Chitin and Chitosan Using Infrared Spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 2008, 71 (4), 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.009>.
- (20) C.S. Hundschell, F. Jakob, A.M. Wagemans, *Molecular weight dependent structure of the exopolysaccharide levan*, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 161, 2020, Pages 398-405, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.019>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020334589>).
- (21) Elodie Alinat, Nathalie Delaunay, Xavier Archer, Pierre Gareil, *Correlating molar masses of nitrocelluloses with their intrinsic viscosities measured using capillary electrophoresis instrumentation*, *Carbohydrate Polymers*, Volume 128, 2015, Pages 99-104, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.013>.
- (22) Yaraki, Mohammad Tavakkoli, and Yen Nee Tan. "Metal nanoparticles-enhanced biosensors: synthesis, design and applications in fluorescence enhancement and surface-enhanced Raman scattering." *Chemistry—An Asian Journal* 15.20 (2020): 3180-3208..

- (23) Zeng, S.; Yong, K.-T.; Roy, I.; Dinh, X.-Q.; Yu, X.; Luan, F. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics* 2011, 6 (3), 491–506. <https://doi.org/10.1007/s11468-011-9228-1>.
- (24) Hudson, S. D.; Chumanov, G. Bioanalytical Applications of SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy). *Anal Bioanal Chem* 2009, 394 (3), 679–686. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2756-2>.
- (25) Tucker N, Stanger JJ, Staiger MP, Razzaq H, Hofman K. The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 2012;7(2\_suppl). doi:10.1177/155892501200702510.
- (26) Rošic, R.; Pelipenko, J.; Kocbek, P.; Baumgartner, S.; Bešter-Rogač, M.; Kristl, J. The Role of Rheology of Polymer Solutions in Predicting Nanofiber Formation by Electrospinning. *European Polymer Journal* 2012, 48 (8), 1374–1384. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.05.001>.
- (27) Li, Z.; Wang, C. Effects of Working Parameters on Electrospinning. In *One-Dimensional nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*; Li, Z., Wang, C., Eds.; SpringerBriefs in Materials; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 15–28. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-36427-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-36427-3_2).
- (28) Doderò, A.; Brunengo, E.; Alloisio, M.; Sionkowska, A.; Vicini, S.; Castellano, M. Chitosan-Based Electrospun Membranes: Effects of Solution Viscosity, Coagulant and Crosslinker. *Carbohydrate Polymers* 2020, 235, 115976. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115976>.
- (29) Sun, K.; Li, Z. H. Preparations, Properties and Applications of Chitosan Based Nanofibers Fabricated by Electrospinning. *Express Polym. Lett.* 2011, 5 (4), 342–361. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.34>.
- (30) Aglietto, M.; Bongiovanni, R.; Mariani, A. *Caratterizzazione di materiali polimerici. Tecniche per polimeri in soluzione*; Edizioni Nuova Cultura, 2014.
- (31) Malkin, A. Ya.; Isayev, A. I. 6 - Applications of Rheology. In *Rheology (Fourth Edition)*; Malkin, A. Ya., Isayev, A. I., Eds.; ChemTec Publishing, 2022; pp 403–460. <https://doi.org/10.1016/B978-1-927885-93-2.50014-4>.
- (32) Yasser Zare, Sang Phil Park, Kyong Yop Rhee, *Analysis of complex viscosity and shear thinning behavior in poly (lactic acid)/poly (ethylene oxide)/carbon nanotubes biosensor based on Carreau–Yasuda model, Results in Physics, Volume 13, 2019, 102245, ISSN 2211-3797, https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102245*.
- (33) Demartini, A. Preparazione e Caratterizzazione Di Biomateriali per Applicazioni in Campo Biomedicale. Tesi di dottorato, XVII ciclo, di Genova, 2005.
- (34) El-Hafian, E. A.; Elgannoudi, E. S.; Mainal, A.; Yahaya, A. H. B. Characterization of Chitosan in Acetic Acid: Rheological and Thermal Studies. *Turkish Journal of Chemistry* 2010. <https://doi.org/10.3906/kim-0901-38>.
- (35) An, J.; Zhang, H.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Yuan, X. Preparation and Antibacterial Activity of Electrospun Chitosan/Poly(Ethylene Oxide) Membranes Containing Silver Nanoparticles. *Colloid Polym Sci* 2009, 287 (12), 1425–1434. <https://doi.org/10.1007/s00396-009-2108-y>.

- (36) Wang, W.; Bo, S.; Li, S.; Qin, W. Determination of the Mark-Houwink Equation for Chitosans with Different Degrees of Deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules* 1991, *13* (5), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(91\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90027-R).
- (37) Scarabelli, L.; Sánchez-Iglesias, A.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Lett.* 2015, *6* (21), 4270–4279. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b02123>.
- (38) Hendel, T.; Wuithschick, M.; Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Rademann, K.; Polte, J. In Situ Determination of Colloidal Gold Concentrations with UV–Vis Spectroscopy: Limitations and Perspectives. *Anal. Chem.* 2014, *86* (22), 11115–11124. <https://doi.org/10.1021/ac502053s>.

## APPENDICE

In appendice si riportano i risultati relativi alle caratterizzazioni eseguite sul chitosano Sigma Aldrich®:

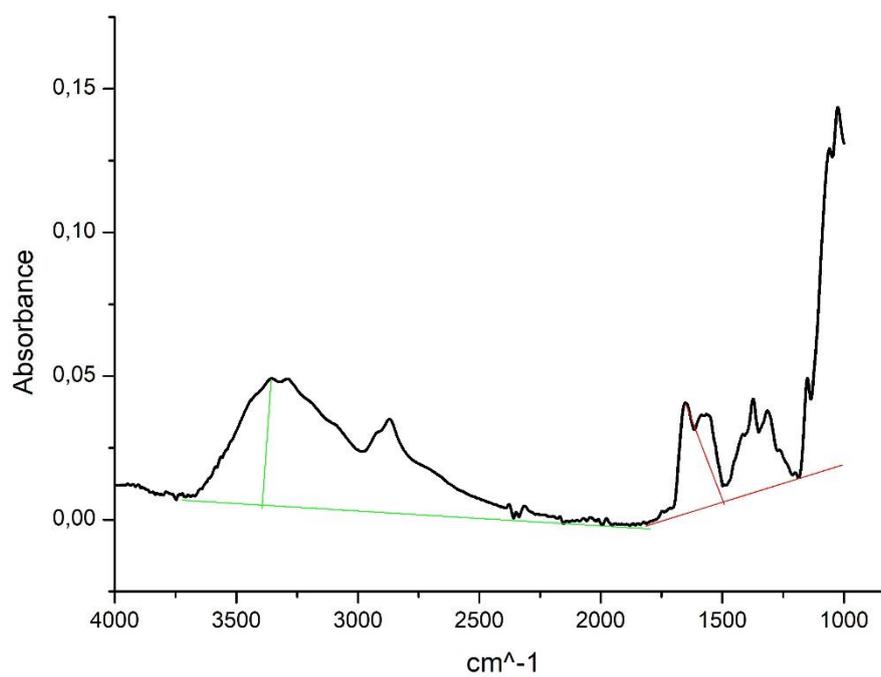


Figura 42 Spettro FT-IR del chitosano Sigma Aldrich® elaborato mediante il metodo Moore e Roberts. DDA%= 38,5%

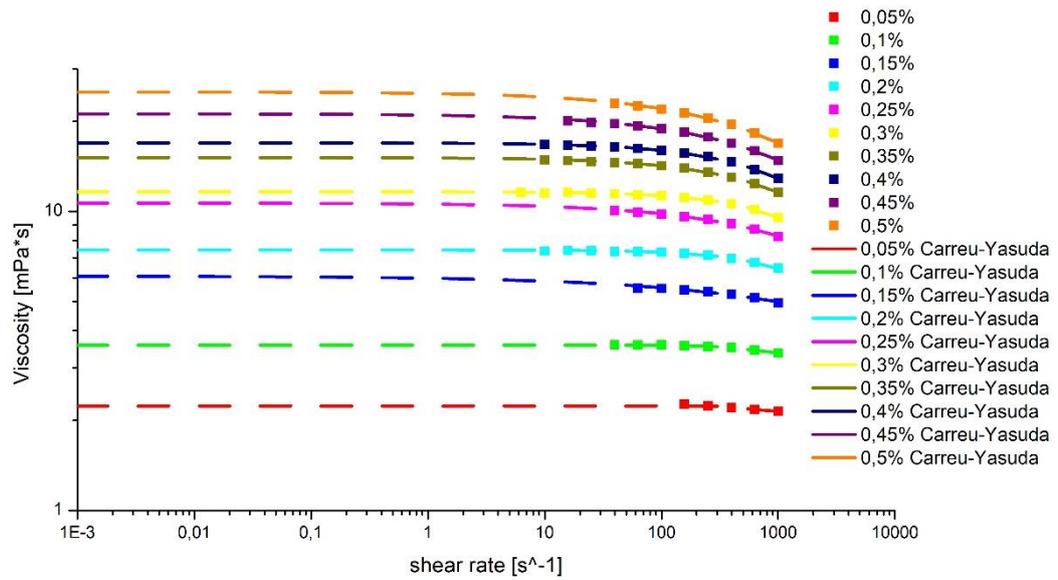


Figura 43 Prove reologiche eseguite sulle soluzioni diluite di chitosano Sigma Aldrich® al fine di determinare  $\eta_0$

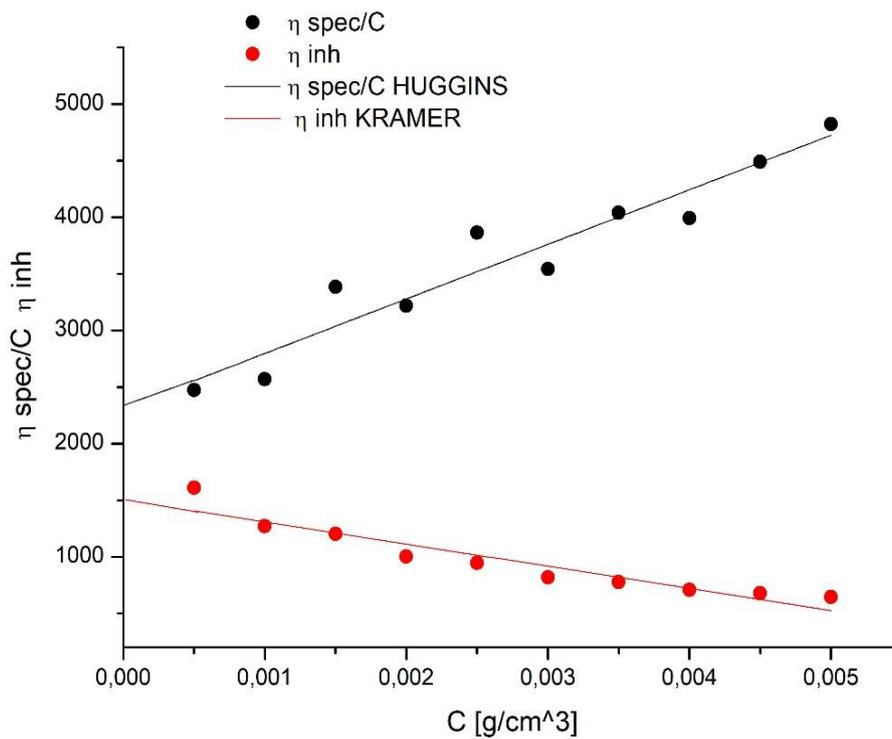


Figura 44 Elaborazione delle prove reologiche mediante le relazioni di Huggins e Kramer per ricavare  $[\eta]$ .