

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Sviluppo e ingegnerizzazione di sistemi ibridi a
base di nanoparticelle inorganiche e microalghe
da applicare nella depurazione acque

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Andrea Briadiadori

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa Stefania Albonetti

CORRELATORE

Dott.ssa Magda Blosi

Dott.ssa Ilaria Zanoni

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro di tesi consiste nella produzione e ingegnerizzazione di nuovi sistemi ibridi ottenuti accoppiando nanoparticelle di titania con la microalga *Chlorella Vulgaris*, per applicazione nel settore del risanamento delle acque reflue. Lo studio è stato rivolto all'ottimizzazione del materiale, il quale integra due proprietà: l'attività fotocatalitica sfruttata per la degradazione degli inquinanti organici conferita dalla titania e la capacità di biosorbimento di metalli pesanti tipica della biomassa. I risultati hanno evidenziato effetti sinergici positivi promossi dalla dispersione della microalga sulla superficie dell'ossido ed in grado di migliorare le performance di biorimediazione del materiale. Al fine di favorire l'applicazione industriale del sistema catalitico preparato, i campioni prodotti in sospensione sono stati ingegnerizzati rimuovendo il solvente tramite tecnologia di Spray-Freeze-Drying. Con l'obiettivo di ottimizzare la formulazione e correlare le proprietà chimico-fisiche dei materiali alle performance ottenute, è stata svolta un'approfondita caratterizzazione sia sulle sospensioni (ELS, DLS) che sui prodotti granulati (BET, SEM-FEG, SEM-EDS). Le prestazioni funzionali dei campioni preparati sono state valutate rispetto alla reazione modello di fotodegradazione della Rodamina B e nell'assorbimento del catione rameico.

Abstract

The aim of this work is to produce and engineer new hybrid systems obtained by coupling titania nanoparticles with *Chlorella Vulgaris* microalgae for the application in wastewater treatment. The study was aimed at optimizing the material, which integrates two properties: the photocatalytic activity exploited for the organic pollutants degradation, conferred by TiO_2 and the heavy metals biosorption typical of the biomass. The results showed positive synergistic effects promoted by the microalgae dispersion on the oxide surface so enhancing the bioremediation performance of the material. In order to foster the industrial application of the prepared catalytic system, the suspensions were engineered by removing the solvent by a Spray-Freeze-Drying technology. Moreover, a wide-ranging characterization was carried out both on suspensions (ELS, DLS) and on dried granules (BET, SEM-FEG, SEM-EDS) to optimize the formulation and correlate the physicochemical properties with the functional performances. The functional properties were evaluated by using as probe reaction the photodegradation of Rhodamine B and by assessing the absorption of copper ions.

Indice

| | |
|---|----|
| Capitolo 1 – Scopo della tesi | 1 |
| Capitolo 2 – Introduzione | 3 |
| 2.1 Il problema ambientale..... | 3 |
| 2.2 <i>Chlorella Vulgaris</i> | 4 |
| 2.3 Fotocatalisi | 8 |
| 2.3.1 Nanomateriali | 9 |
| 2.3.2 Biossido di titanio..... | 12 |
| 2.3.3 Fotodegradazione di Rodamina B | 16 |
| 2.4 Granulazione tramite tecnica di Spray-Freeze-Drying | 18 |
| Capitolo 3 – Parte sperimentale | 21 |
| 3.1 Procedura generale | 21 |
| 3.2 Materiali | 22 |
| 3.3 Preparazione dei campioni in sospensione..... | 24 |
| 3.3.1 Campioni con <i>C. Vulgaris</i> congelata..... | 24 |
| 3.3.2 Campioni con <i>C. Vulgaris</i> liofilizzata..... | 25 |
| 3.3.3 Campioni con magnetite..... | 25 |
| 3.3.4 Campioni con silice | 26 |
| 3.4 Preparazione dei campioni granulati | 27 |
| 3.4.1 Trattamento di Spray-Freeze-Drying | 27 |
| 3.5 Test di biorimediazione..... | 29 |
| 3.5.1 Assorbimento di metalli pesanti | 29 |
| 3.5.2 Fotodegradazione di inquinanti organici..... | 31 |
| 3.6 Strumenti e tecniche di caratterizzazione..... | 33 |
| 3.6.1 Tecniche di caratterizzazione dei sistemi in fase sol..... | 33 |
| 3.6.2 Tecniche di caratterizzazione dei sistemi in fase granulata | 39 |
| Capitolo 4 – Risultati e discussione | 43 |
| 4.1 Caratterizzazione delle sospensioni | 43 |
| 4.1.1 Caratterizzazione di <i>C. Vulgaris</i> | 44 |
| 4.1.2 Effetto della tipologia di <i>C. Vulgaris</i> (congelata/liofilizzata)..... | 50 |
| 4.1.3 Studio dell'incremento di concentrazione di <i>C. Vulgaris</i> | 54 |
| 4.1.4 Campioni a tre componenti | 57 |
| 4.1.4.1 Addizione di SiO ₂ nanoparticellare | 58 |

| | | |
|---------------------------------------|---|-----|
| 4.1.4.2 | Addizione di Fe ₃ O ₄ nanoparticellare | 60 |
| 4.2 | Caratterizzazione funzionale dei campioni in sospensione | 62 |
| 4.2.1 | Biosorbimento di Cu ²⁺ | 62 |
| 4.2.2 | Studio dell'attività fotocatalitica..... | 68 |
| 4.2.2.1 | Attività fotocatalitica dei componenti singoli | 68 |
| 4.2.2.2 | Attività fotocatalitica dei campioni <i>C. Vulgaris</i> /TiO ₂ | 72 |
| 4.2.2.3 | Attività fotocatalitica dei campioni <i>C. Vulgaris</i> /TiO ₂ /SiO ₂ | 75 |
| 4.3 | Caratterizzazione dei granulati | 76 |
| 4.3.1 | Misura dell'area superficiale | 79 |
| 4.3.2 | Misura dell'energia di band gap | 82 |
| 4.3.3 | Analisi morfologica dei granulati | 83 |
| 4.3.4 | Analisi di distribuzione dei singoli elementi nel granulato | 87 |
| 4.4 | Caratterizzazione funzionale dei granulati | 90 |
| 4.4.1 | Biosorbimento di Cu ²⁺ | 90 |
| 4.4.2 | Studio dell'attività fotocatalitica..... | 95 |
| Capitolo 5 – Conclusioni | | 98 |
| Bibliografia | | 100 |

Capitolo 1 – Scopo della tesi

Lo scopo di questo lavoro di tesi consiste nello sviluppo di un sistema applicabile nel trattamento terziario delle acque di scarico industriale. Il materiale implementato nel corso dell'attività è un composto ibrido formato da una matrice inorganica a base di nanoparticelle di biossido di titanio accoppiata con microalga della specie *Chlorella Vulgaris*. Nonostante la composizione delle acque reflue sia variabile a seconda del settore industriale coinvolto, per diverse aree industriali è frequente negli effluenti trovare la presenza combinata di metalli pesanti e composti organici (in primis nel settore tessile, ad esempio). Nell'ottica di risanare tali tipologie di effluenti è necessario ideare un materiale che sia in grado di abbattere il contenuto di metalli pesanti e al contempo i composti organici, perciò l'obiettivo è stato quello di studiare e mettere a punto un materiale ibrido dove le nanoparticelle di TiO_2 conferiscano attività fotocatalitica al materiale e la componente biologica a base di biomassa algale consenta l'assorbimento di cationi metallici. La degradazione fotocatalitica di inquinanti organici o coloranti è una possibilità interessante perché prevede di sfruttare la radiazione solare, con range di emissione che coinvolge la regione dell'ultravioletto e parte del visibile, per attivare il fotocatalizzatore TiO_2 e procedere senza necessità di altri reagenti all'ossidazione dei composti organici^[1]. Parallelamente l'assorbimento dei metalli pesanti ad opera di microalghe è un aspetto fondamentale nel settore di biorisanamento delle acque^[2] e porta con sé i vantaggi legati all'elevato grado di sostenibilità della biomassa, la quale a fine ciclo può essere valorizzata tramite la produzione di biocarburanti^[3]. Combinando queste due funzionalità (fotocatalitica/biosorbente) è possibile progettare un materiale in grado di assistere in maniera efficiente e sostenibile il trattamento terziario di acque reflue difficilmente risanabili. Lo schema circolare in *Figura 1.1* esemplifica il razionale del processo del biorisanamento.

L'accoppiamento della microalga con titania ha permesso di indagare potenziali effetti sinergici tra le due fasi in grado di incrementare le performance del materiale.

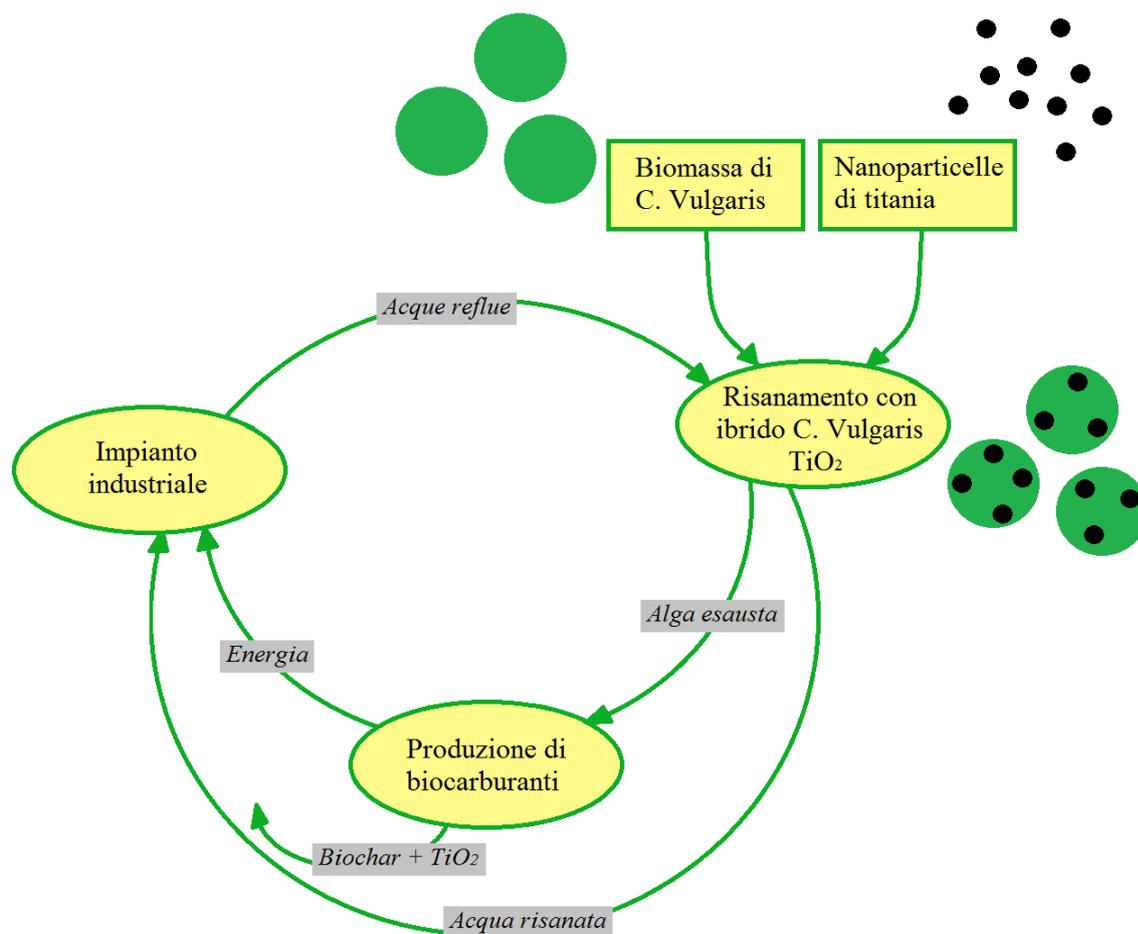


Figura 1.1 – Schema del trattamento terziario proposto per reflui industriali

L'interazione tra i due componenti, biologico e inorganico, è stata promossa seguendo un approccio di self-assembly in sospensione dove le due fasi vengono miscelate e mantenute in contatto per 24h al fine di favorirne l'eterocoagulazione. Nell'ottica di produrre un materiale facilmente maneggiabile con una maggiore stabilità nel tempo è stato rimosso il solvente grazie a un trattamento di granulazione della sospensione ibrida tramite tecnica di Spray-Freeze-Drying^[4]. Si è utilizzata una tecnica a freddo per evitare di degradare la biomassa termolabile.

Il sistema è stato caratterizzato sia a livello di sospensione che di granulato solido e testato dal punto di vista funzionale in termini di biosorbimento di metalli pesanti e attività fotocatalitica. Il biosorbimento è stato valutato attraverso l'assorbimento del catione rameico in soluzione, mentre l'attività fotocatalitica attraverso la fotodegradazione del colorante organico Rodamina B.

Capitolo 2 – Introduzione

2.1 Il problema ambientale

A partire dagli anni 80' si è registrato un incremento del consumo di acqua dell'1% annuo. Questo incremento costante è stato dettato principalmente dalla crescente domanda nei paesi in via di sviluppo e nelle economie emergenti, si può inoltre giustificare da una combinazione di fattori quali la crescita della popolazione globale, lo sviluppo socio-economico e l'evoluzione dei modelli di consumo. Le previsioni mostrano che la domanda d'acqua continuerà ad aumentare ad un ritmo simile fino al 2050, con un aumento compreso tra il 20% e il 30% rispetto al livello attuale.^[5,6]

L'Assemblea Generale delle Nazioni Unite nel 2015 ha redatto un documento nominato *“Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development”* nel quale sono elencati i 17 obiettivi principali da raggiungere per il 2030 in termini di sviluppo sostenibile. Il sesto è rivolto verso i servizi idrici e igienico-sanitari: *“Ensure availability and sustainable management of water and sanitation for all”*^[7]. Nel documento si fa anche riferimento alla riduzione dell'inquinamento dell'acqua in seguito al rilascio di sostanze chimiche e di materiali pericolosi, minimizzando la quantità di acque reflue non trattate. Attualmente una grande parte delle risorse idriche utilizzate in ambito industriale viene scaricata come refluo, in questo scenario lo sviluppo di nuovi trattamenti a basso impatto ambientale per la purificazione delle acque è un fattore cruciale per lo sviluppo sostenibile.

La composizione delle acque reflue industriali determina i requisiti tecnici ed economici per soddisfare le normative internazionali. Gli effluenti del settore tessile, ad esempio, contengono una notevole quantità di cationi metallici tossici, una grande varietà di coloranti e sostanze chimiche pericolose per l'ambiente e per la vita^[8,9]. Il tessile si classifica al terzo posto nel settore manifatturiero in Italia e rappresenta il 10% del valore aggiunto manifatturiero italiano^[10,11]. Nonostante i recenti progressi nella bonifica delle acque reflue^[12,13,14], gli effluenti del tessile rappresentano ancora una sfida difficile, di conseguenza è necessario migliorare le tecniche di purificazione per limitare l'impatto ambientale. Per raggiungere lo standard normativo sono stati studiati diversi trattamenti chimico-fisici^[15,16], tuttavia ad oggi non esiste un processo in grado di trattare completamente le acque reflue tessili. A tale scopo è necessario installare un impianto terziario che completi il processo di purificazione nei confronti di coloranti e metalli

pesanti. Il biorisanamento rappresenta una potenziale tecnologia per il trattamento terziario degli effluenti tessili^[17]. In questo campo sono stati testati diversi microrganismi^[8,18] e le microalghe sono risultate le più promettenti perché utilizzano gli inquinanti presenti nelle acque reflue come nutrienti per crescere, inoltre durante il ciclo di vita accumulano lipidi che possono essere valorizzati in una seconda fase di transesterificazione per la produzione di biocarburanti^[3], contribuendo alla sostenibilità del processo. Studi dettagliati hanno indicato che la biomassa algale sia viva che morta può rimuovere attivamente vari metalli pesanti dall'acqua trattata^[2]. Un'analisi^[19] preliminare di comparazione dei costi ha indicato che i trattamenti a base di alghe possono essere fino a dieci volte più economici rispetto ai metodi di bonifica convenzionali, ma ad oggi non è ancora stata condotta alcuno studio di fattibilità tecnico-economico dettagliato su tale processo. Viste le enormi potenzialità delle microalghe sono attesi nuovi sviluppi che consentano di enfatizzare i vantaggi mostrati rispetto ai metodi convenzionali al fine di raggiungere un'implementazione industriale.

2.2 *Chlorella Vulgaris*

Le microalghe sono alghe di dimensione microscopica che, a seconda della specie, possono variare da pochi ad alcune centinaia di micrometri. Sono specie unicellulari e possono vivere singolarmente o in catene e gruppi, sia in acque dolci che salate. Le microalghe sono fondamentali per la vita sulla terra perché eseguono la fotosintesi e producono circa metà dell'ossigeno atmosferico, contemporaneamente consumano notevoli quantità di CO₂ per crescere in modo fotoautotrofo.^[2]

Una vasta gamma di specie di microalghe viene coltivata in fotobioreattori (*Figura 2.1*) e poi utilizzata a scopi commerciali e di ricerca. I fattori che regolano queste colture sono: la dimensione del fotobioreattore, l'esposizione alla luce e la concentrazione cellulare.^[3,20,21]

La composizione chimica delle microalghe non è costante ma varia a seconda della specie e delle condizioni di coltura^[22,23]. Regolando i fattori ambientali quali temperatura, illuminazione, pH, apporto di CO₂, sale e sostanze nutritive è possibile favorire l'accumulo dei prodotti desiderati nel microorganismo, come ad esempio proteine o lipidi per applicazioni nel campo alimentare o nella produzione di biocarburanti.



Figura 2.1 – Fotobioreattori per la coltura di microalghe

Una delle specie di maggiore interesse sia in ambito alimentare che di ricerca è *Chlorella Vulgaris*^[24], una microalga unicellulare eucariotica verde del genere *Chlorella* che vive in acque dolci. È caratterizzata da un elevato contenuto proteico, motivo per cui viene utilizzata come integratore e additivo alimentare, la composizione valutata sul peso secco della biomassa è data da 42-58% di proteine^[25], 5-40% di lipidi^[26], 12-55% di carboidrati^[27], 1-2% di pigmenti (principalmente clorofilla e carotenoidi) e quantità minori di sali minerali e vitamine^[22,28]. È inoltre una promettente fonte di bioenergia e potrebbe essere una valida alternativa alle attuali colture di biocarburanti come soia, mais o colza in quanto è più produttiva e non compete con la produzione alimentare di base^[29]. Può produrre una quantità di lipidi fino a 20 volte superiore rispetto alle attuali colture utilizzate per la produzione del biodiesel. Possiede anche una discreta quantità di amido per la produzione di bioetanolo. Tuttavia, i biocarburanti microalgali sono ancora lontani dall'essere competitivi con i combustibili fossili per via dei maggiori costi di produzione.^[19,20]

Il risanamento da metalli pesanti di un corso d'acqua tramite microalghe può seguire due meccanismi, il primo comune alla biomassa vivente e non vivente prevede l'assorbimento dei cationi metallici sulla parete cellulare, il secondo invece necessita del microrganismo vivente in quanto consiste nell'accumulo intracellulare. Perciò, può essere utilizzata sia *C. Vulgaris* viva che morta, la differenza risiede nei meccanismi disponibili. Generalmente, in un primo momento i metalli pesanti vengono intrappolati

sulla superficie della cellula, poi nel caso di biomassa vivente attraversano la parete e si accumulano all'interno della cellula, questa attività prende il nome di bioaccumulo.^[2,17,30] Durante questo lavoro di tesi è stato scelto di lavorare con biomassa non vivente per via del più facile mantenimento e maneggiabilità durante il processo. In fase di sospensione sarebbe possibile lavorare con biomassa vivente ma volendo poi granulare il campione attraverso il processo di Spray-Freeze-Drying in azoto liquido, si predilige l'utilizzo di *C. Vulgaris* non vivente.

La parete cellulare ha un ruolo chiave nella cattura dei cationi metallici, la sua composizione a base di carboidrati, proteine e lipidi espone verso l'ambiente esterno gruppi funzionali carichi negativamente che sono in grado di interagire con le specie cationiche in soluzione^[19,22,31]. Nel caso i gruppi, ad esempio le funzionalità carbossiliche, si trovino in forma deprotonata l'interazione che si instaura con il catione metallico è di tipo elettrostatico. A seconda del pH di lavoro le funzionalità saranno protonate o meno.

Un fattore a vantaggio dell'alga viva, la quale è molto più delicata e sensibile alle condizioni operative, è il fatto che può utilizzare gli inquinanti organici come nutrimento per crescere. Quindi coloranti o altre molecole inquinanti diventano fonte di nutrimento per la biomassa in accrescimento e vengono degradate all'interno dei cicli metabolici del microrganismo^[17]. Utilizzando *C. Vulgaris* non vivente questa possibilità è preclusa, ma a favore della scelta vi sono i vantaggi a livello logistico per le condizioni di trasporto della biomassa, per la sua maneggiabilità e le condizioni di lavoro meno restrittive.

Questo progetto è stato condotto con *C. Vulgaris* non vivente sotto forma di sospensione fresca congelata e polvere liofilizzata. La biomassa è stata coltivata in appositi fotobioreattori da Micoperi Blue Growth (Ravenna), il prodotto congelato viene ottenuto per diretto raffreddamento della sospensione estratta dal fotobioreattore di coltura, mentre il prodotto liofilizzato viene sottoposto ad uno step di rimozione del solvente al fine di ottenere una polvere solida conservata sotto vuoto.

Comparata ad altre tecnologie per la rimozione di metalli pesanti (precipitazione come idrossidi, carbonati o solfuri; ossidazione o riduzione chimica; scambio ionico; osmosi inversa; estrazione con solvente; evaporazione; adsorbimento; elettrodeposizione), il biosorbimento tramite microalghe non viventi possiede i seguenti vantaggi^[2,17]:

- Capacità di trattare velocemente larghi volumi
- Alta selettività e specificità per particolari metalli pesanti
- Abilità di rimuovere più metalli pesanti contemporaneamente dal refluo

- Alta affinità ed efficienza
- Spese per reagenti supplementari estremamente contenute
- Non richiede un mezzo e i nutrienti per crescere
- Attività su un ampio range di condizioni chimico-fisiche, quali temperatura, pH e presenza di altri ioni in soluzione, come calcio e magnesio
- Moderato capitale di investimento e bassi costi operativi
- L'utilizzo di una risorsa biologica rinnovabile e abbondante in natura
- È un sistema ecologico (non causa inquinamento secondario)
- Non è soggetto a limitazioni di tossicità correlata ai metalli pesanti
- Possibilità di recupero dei metalli pesanti dalla biomassa e riuso delle microalghe

È importante identificare e valutare il contributo dei singoli gruppi funzionali sull'assorbimento globale di metalli pesanti. Nei sistemi biologici i cationi *hard* (di diametro minore) come ferro, zinco e manganese solitamente formano legami stabili con le funzionalità che includono atomi di ossigeno come OH^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , R-COO^- e $=\text{C}=\text{O}$, mentre i cationi *soft* (di diametro maggiore) come rame, piombo e cadmio formano legami più forti con altri gruppi, quali CN^- , R-S^- , $-\text{SH}^-$, $-\text{NH}_2^-$ e imidazolo.^[2]

Per lo studio del meccanismo con il quale i cationi metallici vengono legati alla superficie algale è necessario determinare quali sono le funzionalità presenti sulla parete cellulare responsabili del biosorbimento. Gli studi sull'argomento riportano che la coordinazione di ioni metallici alla biomassa algale è dettata da diversi gruppi funzionali presenti in proteine, lipidi e carboidrati: ammine, tioeteri, solfidrili, carbossilici, carbonilici, imidazoli, fosfati, fenolici, idrossilici e frazioni ammidiche. Nel contesto algale, l'interazione principale è un'attrazione elettrostatica tra i cationi metallici e i siti negativi come ad esempio gli anioni carbossilato.^[2]

La funzionalità principalmente coinvolta nell'assorbimento di metalli da parte delle microalghe è $-\text{COOH}$, seguita da $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ e anche $-\text{P}_2\text{O}_3$ (Figura 2.2). Il gruppo carbossilico è stato identificato come principale responsabile del biosorbimento di rame (II) e alluminio (III)^[2].

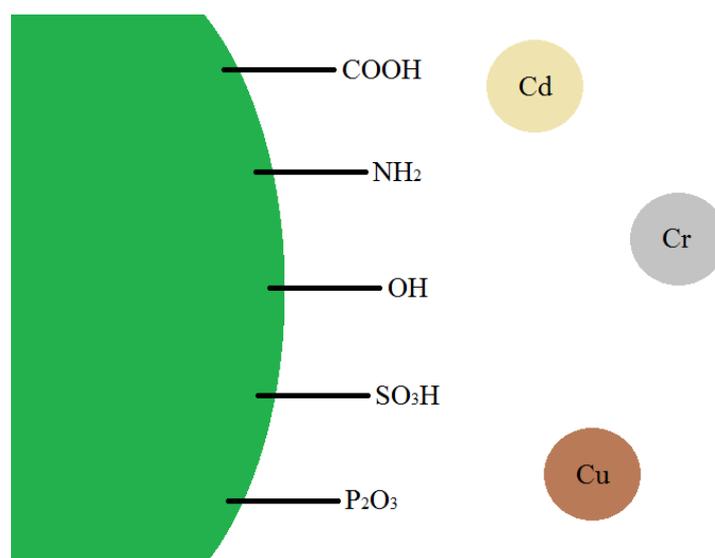


Figura 2.2 – Interazione tra i gruppi funzionali presenti sulla parete cellulare algale che presentano una parziale carica negativa e i metalli pesanti in soluzione (solitamente in forma cationica)

Come conseguenza della differente affinità tra i vari cationi e i diversi gruppi funzionali presenti sulla parete cellulare algale è possibile identificare delle specie di microalga più promettenti per l'applicazione di biosorbimento di metalli pesanti, fra queste *C. Vulgaris* mostra una buona affinità per un'ampia gamma di cationi metallici^[24].

2.3 Fotocatalisi

La fotochimica è una branca della chimica che si occupa delle reazioni indotte dall'interazione tra luce e materia. La fotocatalisi prevede l'utilizzo di un catalizzatore che viene attivato quando irraggiato con una radiazione di opportuna lunghezza d'onda. Si utilizzano materiali semiconduttori caratterizzati dalla presenza di banda di valenza e banda di conduzione, separate da un band gap. Quando un semiconduttore viene irraggiato con una luce a energia pari o superiore al band gap, un elettrone può assorbire l'energia dal fotone e passare dalla banda di valenza a quella di conduzione, lasciando una lacuna di carica positiva nella banda di valenza, *Figura 2.3.*^[32]

Gli elettroni e le lacune così generati migrano verso la superficie del cristallo dove reagiscono con le specie assorbite, accettori o donatori di elettroni. Da questa reazione solitamente si formano specie radicaliche molto reattive che vanno ad attaccare altri componenti del sistema, come possono essere gli agenti inquinanti da degradare.^[33]

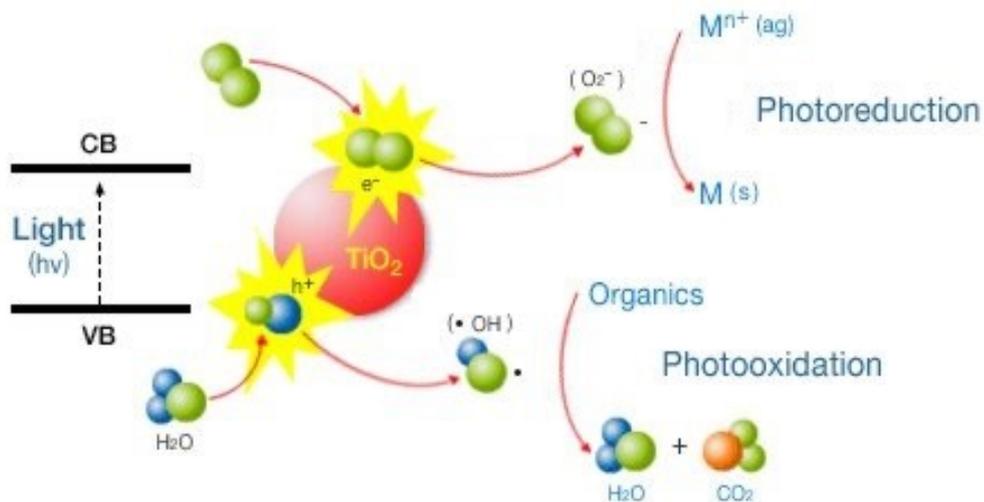


Figura 2.3 – Schema del processo di eccitazione fotoindotta di TiO_2 e conseguente attività fotocatalitica

Le reazioni fotocatalitiche avvengono sulla superficie del catalizzatore, quindi per incrementare l'efficienza è necessario rendere massimo il rapporto superficie/volume. La soluzione ottimale è quella di utilizzare il catalizzatore sotto forma di polvere nanometrica.

2.3.1 Nanomateriali

Una classe di materiali che di recente ha suscitato notevole interesse nella comunità scientifica, è rappresentata dai nanomateriali e dalle nanoparticelle (NPs). La dimensione nanometrica rappresenta un ponte di giunzione tra la scala atomica/molecolare e la scala macroscopica o *bulk*, in cui spesso i materiali non sottostanno alle leggi chimico-fisiche classiche. Le nanoparticelle sono definite tali se posseggono almeno una dimensione tra 1-100nm, in tali condizioni solitamente mostrano comportamenti molto differenti rispetto allo stesso materiale *bulk*.

L'effetto delle dimensioni (*size effect*) rappresenta un aspetto determinante per descrivere il comportamento dei nanomateriali, in quanto ne influenza le caratteristiche strutturali, chimiche, termodinamiche, elettroniche e spettroscopiche^[34,35]. Al diminuire delle dimensioni dei nanomateriali aumenta la percentuale di atomi superficiali, comportando un incremento della reattività, ciò li rende particolarmente adatti per applicazioni catalitiche. Ad esempio, un cristallo delle dimensioni di 1nm espone in superficie circa il 100% degli atomi che lo costituiscono, mentre un cristallo di 10nm ne espone solo il 15%. Vi sono delle correlazioni tra le dimensioni del nanomateriale e le sue proprietà

chimico-fisiche, in termini di proprietà ottiche, elettroniche e magnetiche. Nell'ultimo decennio tale versatilità ha reso i nanomateriali e le nanoparticelle particolarmente interessanti sotto diversi punti di vista, sono stati studiati e applicati in molti ambiti, dall'energia, alla medicina, alla nanoingegneria, all'ottica, alla cosmesi, all'industria alimentare, oltre alle applicazioni in campo catalitico.

Le nanosospensioni colloidali o nanosol sono una forma particolarmente interessante in cui utilizzare i nanomateriali. Questi sistemi contengono particelle insolubili di diametro compreso tra 1-1000nm disperse in un liquido, il solvente. Generalmente le particelle colloidali hanno diametro maggiore rispetto alle molecole del solvente e sono caratterizzate da un elevato rapporto area superficiale/volume, molto maggiore rispetto al medesimo materiale *bulk*, in queste condizioni la superficie ha un controllo significativo sulle proprietà del colloide stesso.

La stabilità di un sistema colloidale è definita dalla capacità delle particelle di rimanere sospese in soluzione nel tempo. I fenomeni di agglomerazione e sedimentazione sono guidati dalla tendenza dei colloidali a ridurre l'energia superficiale e di conseguenza diminuiscono la stabilità della sospensione. I principali meccanismi di stabilizzazione di un sistema colloidale sono di tipo elettrostatico e sterico, *Figura 2.4*:

- Le forze repulsive di natura elettrostatica che agiscono fra le particelle colloidali sono correlate alle interazioni di van der Waals, dovute alla repulsione elettrostatica generata dalla sovrapposizione di regioni di doppio strato elettrico costituite da cariche dello stesso segno
- Le forze repulsive di natura sterica sono dovute alla presenza di polimeri o di altre macromolecole sulla superficie delle particelle disperse, queste macromolecole impediscono l'avvicinamento delle particelle colloidali e quindi ostacolano la loro coagulazione

Nel corso di questo lavoro di tesi il primo obiettivo è stato quello di riuscire ad assemblare un materiale ibrido, costituito da nanoparticelle di titania e cellule di *C. Vulgaris*. Si è seguito un approccio in sospensione perciò è stato indispensabile uno studio di potenziale Zeta per verificare se l'interazione tra le due specie fosse possibile o se vi fossero forze repulsive in grado di impedire il contatto tra alga e titania.

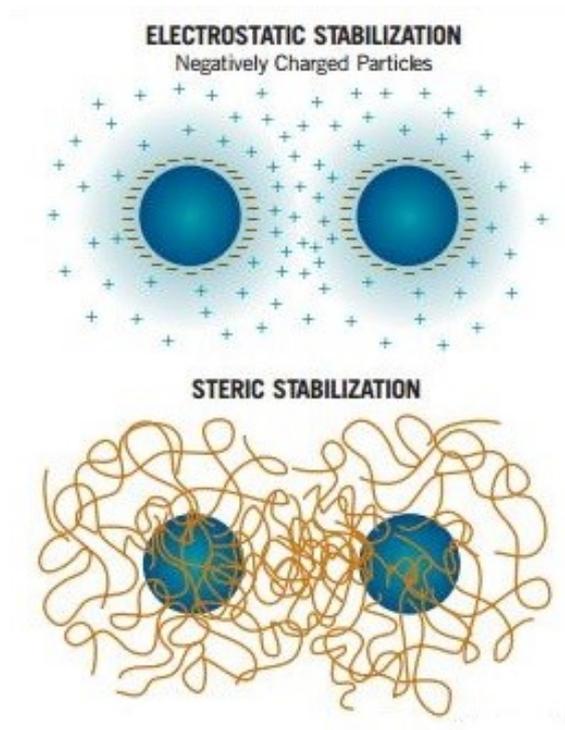


Figura 2.4 – Rappresentazione della stabilizzazione colloidale di tipo elettrostatico e sterico

Le forze di natura elettrostatica diversamente da quelle dettate dall'ingombro sterico, possono essere sia attrattive che repulsive. Quando si tratta della stabilità di una sospensione, si desidera un valore assoluto di potenziale Zeta elevato, in modo da evitare la coagulazione delle particelle, quando invece l'obiettivo è quello di fare interagire particelle diverse si può sfruttare l'attrazione elettrostatica tra cariche negative e positive. Quest'ultima considerazione fa riferimento ad un approccio di eterocoagulazione tramite self-assembly^[36], ovvero quando particelle di carica superficiale opposta vengono messe in sospensione insieme, tendono ad attrarsi e interagire formando un sistema misto. Nel corso della tesi, per esempio, l'obiettivo è stato quello di trovare una regione di pH nella quale le cellule di *C. Vulgaris* e le nanoparticelle di titania possedessero carica superficiale opposta al fine di assemblare il sistema ibrido desiderato.

Operando tramite self-assembly solitamente si ottengono delle strutture core-shell dove la specie di dimensioni minori e presente in maggiore quantità tende a rivestire l'altra, determinando in maniera preponderante le proprietà di superficie. In questo caso *C. Vulgaris* ha dimensioni micrometriche mentre la titania è presente in largo eccesso e in forma nanoparticellare, perciò la situazione più probabile dopo l'interazione è un rivestimento superficiale di titania sulle cellule dell'alga o un inglobamento dell'ossido all'interno delle cellule della biomassa.^[36]

2.3.2 Biossido di titanio

Il biossido di titanio (TiO_2) è un ossido semiconduttore dotato di un'elevata attività fotocatalitica perché può essere chimicamente attivato dalla luce solare, infatti grazie all'assorbimento diretto di fotoni può dare luogo a processi fotochimici di superficie.^[32] L'attività fotocatalitica di TiO_2 è stata oggetto di numerosi studi già a partire dal 1972 in Giappone, ma l'interesse si è intensificato soprattutto negli ultimi anni in quanto TiO_2 si è dimostrato il catalizzatore più efficace nella degradazione di molti inquinanti di interesse. La titania è stata utilizzata anche per altre applicazioni in campo industriale all'interno di processi elettrochimici e come pigmento bianco per pitture e polimeri, le proprietà ottiche ed elettroniche ne consentono l'utilizzo in sensori di gas, in rivestimenti antiriflettenti per celle solari e nei processi di conversione dell'energia fotochimica.

Il biossido di titanio esiste in natura in tre diverse strutture cristalline quali anatase, rutilo e brookite (*Figura 2.5*) oppure in fase amorfa. La brookite possiede una struttura cristallina ortorombica, mentre le altre due forme hanno una struttura tetragonale. Il rutilo e l'anatase sono le forme più diffuse in natura, il rutilo è la forma cristallina termodinamicamente più stabile ed è la più utilizzata industrialmente mentre l'anatase è metastabile ed è la forma più attiva come fotocatalizzatore. Misure sperimentali di spettroscopia ottica hanno dimostrato che l'anatase ha un'energia di band gap più alta del rutilo, in particolare il rutilo possiede E_g pari a 3.03eV e l'anatase 3.18eV. Questo significa che la transizione elettronica, e quindi l'attivazione del materiale come fotocatalizzatore, avviene per l'anatase a lunghezza d'onda $\lambda \leq 388\text{nm}$ ossia nella porzione UVA dello spettro elettromagnetico, mentre per il rutilo a $\lambda \leq 413\text{nm}$ che corrisponde alla regione del violetto.^[37]

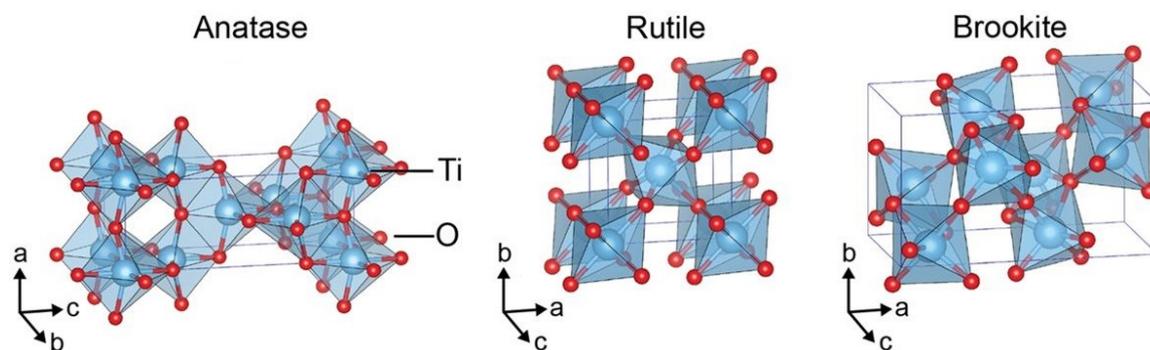


Figura 2.5 – Strutture cristalline del biossido di titanio: anatase, rutilo e brookite

La combinazione di elevato indice di rifrazione e altro grado di trasparenza nella regione dello spettro visibile rende la titania il migliore semiconduttore studiato nel campo della conversione chimica e dell'immagazzinamento dell'energia solare, nonostante il fatto che assorbe solo il 5% della radiazione solare incidente. Infatti, solo una piccola porzione dello spettro solare possiede energia sufficiente a dare luogo alla transizione elettronica dalla banda di valenza alla banda di conduzione, come si può vedere in *Figura 2.6* circa il 5% della radiazione che giunge al suolo è nella regione dell'UV.^[33]

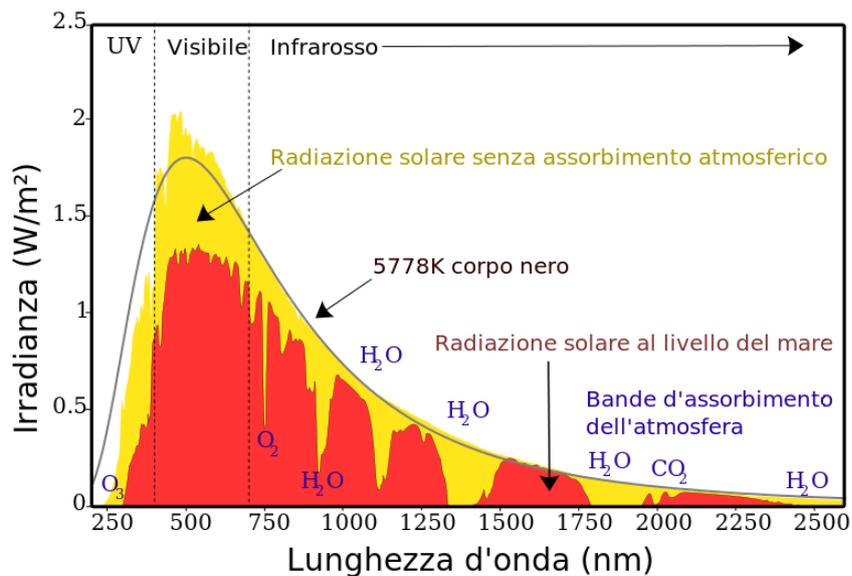


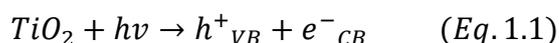
Figura 2.6 – Spettro della radiazione solare

Il biossido di titanio in fase nanometrica, specialmente l'anatasio, presenta notevole attività fotocatalitica se esposto alla luce UV. Durante questo studio è stato utilizzato il prodotto commerciale AEROXIDE® TiO_2 P25 che è costituito da un particolato fine di biossido di titanio puro (99.9%) con elevata superficie specifica e una marcata struttura aggregata e agglomerata. TiO_2 P25 è caratterizzata da una composizione 3:1 anatasio:rutilo, un'area superficiale specifica di circa $50m^2/g$ e la dimensione delle nanoparticelle primarie misurata al microscopio elettronico è mediamente di 20nm.^[38]

Riassumendo, le caratteristiche della titania sono:

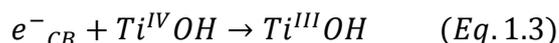
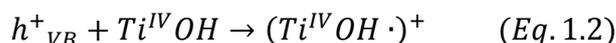
- È un semiconduttore
- Alta porosità e discreta area superficiale
- Elevata attività fotocatalitica
- Basso costo e produzione in larga scala
- Inerzia chimica, non tossicità, biocompatibilità

La fotocatalisi sfrutta l'energia solare per rendere attivi i fotocatalizzatori, questi illuminati da luce con appropriata lunghezza d'onda inducono la formazione di reagenti fortemente ossidanti in grado di decomporre le sostanze organiche e inorganiche presenti. L'attivazione del catalizzatore avviene attraverso l'assorbimento di una radiazione UV che abbia energia uguale o superiore al valore di band gap del semiconduttore, nel caso specifico della titania dev'essere $\geq 3.2\text{eV}$. L'assorbimento di tale radiazione promuove la formazione del sistema buca-elettrone (Eq. 1.1) situati rispettivamente sulla banda di valenza (VB) e sulla banda di conduzione (CB).^[37]



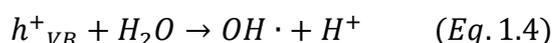
Il sistema fotogenerato può evolvere in tre differenti modi che sono in competizione tra loro: l'intrappolamento del portatore di carica, il trasferimento di carica all'interfaccia dei cristalli o la ricombinazione tra buca ed elettrone.^[32,33]

L'intrappolamento del portatore di carica ha luogo senza la necessità di substrati esterni che possano cedere o acquisire elettroni sulla superficie del catalizzatore, perciò la buca e l'elettrone fotogenerati reagiscono con i gruppi ossidrilici che rivestono la superficie della titania con il seguente meccanismo:

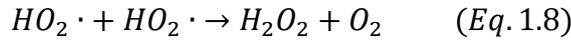
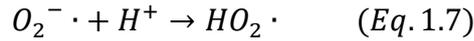
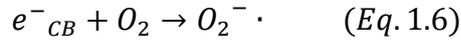


In questo modo (Eq. 1.2) la buca elettronica viene intrappolata sotto forma di radicale ossidrile legato alla superficie del catalizzatore che acquisisce il potere ossidante della buca, mentre l'elettrone fotogenerato viene bloccato anch'esso sulla superficie del catalizzatore ma sotto forma di Ti^{III} che possiede potere riducente (Eq. 1.3).

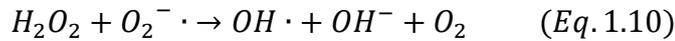
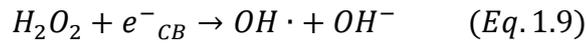
Il secondo meccanismo prevede il trasferimento della buca e dell'elettrone, come tali, sulla superficie del catalizzatore, dove esplicheranno le loro proprietà, rispettivamente ossidanti e riducenti, direttamente su di un substrato:



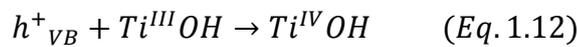
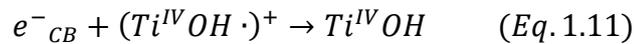
La buca sulla superficie del catalizzatore può ossidare direttamente l'acqua (Eq. 1.4) o gli ioni ossidrilici in soluzione (Eq. 1.5). Quando si lavora in presenza di ossigeno, esso può fungere da accettore di elettroni, reagendo con l'elettrone fotogenerato attraverso il meccanismo seguente:



Il perossido di idrogeno generato si trasforma ulteriormente formando radicali ossidrile che danno il via ai processi degradativi delle sostanze organiche presenti in soluzione acquosa:



Infine, il terzo meccanismo possibile è quello della ricombinazione tra la buca e l'elettrone, che comporta la perdita sotto forma di calore dell'energia fotochimica immagazzinata durante la formazione fotoindotta del sistema buca-elettrone:



Questa ricombinazione riduce l'efficienza dei processi fotocatalitici. Il prevalere di un percorso di reazione sugli altri dipende dai tempi di vita degli intermedi prodotti dai tre differenti processi.

Le crescenti conoscenze sviluppate nell'ambito delle nanoscienze e nanotecnologie relative alla sintesi e all'ingegnerizzazione di nanoparticelle, ha portato grande interesse nello studio ed applicazione della titania nanometrica. Questa presenta le stesse proprietà fotocatalitiche della titania *bulk* ma la nanostruttura la rende molto più reattiva, inoltre

quando si presenta come nanosospensione risulta più favorevole l'interazione con altre particelle o l'applicazione su tessuti e superfici.^[39]

Durante lo studio la componente inorganica del sistema a base di titania è stata implementata separatamente con silice o magnetite entrambe sotto forma di nanosol.

Il biossido di silicio (SiO_2) è un ossido chimicamente inerte, stabile e trasparente alla radiazione UV, viene solitamente utilizzato come isolante elettrico e termico, diversamente dal biossido di titanio non presenta attività fotocatalitica. Studi precedenti hanno dimostrato che il sistema misto titania-silice consente di ottenere performance fotocatalitiche superiori^[40,41]. L'aumento della fotoattività dettato dall'interazione tra titania e silice è stato attribuito al maggiore adsorbimento del substrato organico e alla maggiore area superficiale. Sono state studiate particelle di $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ supportate su gel per la fotodegradazione di coloranti organici^[42,43], che sono i principali inquinanti prodotti dalle industrie tessili, questi sistemi potrebbero essere incorporati come additivi nelle matrici dei cementi per ottenere edifici autopulenti o eliminare gli inquinanti nocivi presenti nell'ambiente urbano^[44]. In questo lavoro di tesi per la sintesi dei materiali a base di titania-silice si è utilizzata la tecnica di eterocoagulazione in sospensione, già studiata in altri lavori^[36].

La magnetite (Fe_3O_4) è un ossido misto di Fe^{II} e Fe^{III} che trova impiego come pigmento nero, ma la proprietà più interessante di questo ossido è quella magnetica. Infatti, è stato introdotto nella formulazione con la titania per attribuire proprietà magnetiche al sistema e consentirne un recupero più agevole dopo l'utilizzo.

2.3.3 Fotodegradazione di Rodamina B

La reazione modello utilizzata in questo lavoro è la reazione di degradazione della Rodamina B (RhB), un colorante organico molto utilizzato in diversi studi^[1,36,45] in quanto presenta una cinetica di degradazione di pseudo I ordine. Nelle reazioni di I ordine la velocità di reazione dipende dalla concentrazione di un solo reagente elevata ad un esponente pari ad 1.

$$r = -k[C] \quad (\text{Eq. 1.13})$$

k rappresenta la costante cinetica del processo, maggiore è il valore di questa costante più velocemente avviene la reazione. Integrando l'Eq. 1.13 si ottiene la seguente equazione cinetica:

$$\ln \frac{C_0}{C} = kt \quad (\text{Eq. 1.14})$$

Il risultato è una funzione lineare del tempo e lavorando con Rodamina B, che presenta massimo di assorbimento nel visibile a 554nm è possibile monitorare l'andamento della reazione per via spettrofotometrica. Infatti, sfruttando la legge di Lambert Beer, la quale esprime la diretta proporzionalità tra l'assorbanza di una specie in soluzione e la sua concentrazione è sufficiente misurare l'assorbanza in funzione del tempo e grazie alla seguente equazione si può calcolare la costante cinetica della reazione:

$$\ln \frac{A_0}{A} = kt \quad (\text{Eq. 1.15})$$

Il vantaggio principale nell'utilizzo di RhB, che ne ha determinato un largo impiego nello studio di processi e cinetiche di fotodegradazione, è proprio la sua natura di colorante. Presenta un picco di assorbimento nel visibile a 554nm perciò è molto facile seguirne la degradazione per via spettrofotometrica registrando gli spettri di assorbimento al progredire del tempo di reazione. Anche visivamente si può osservare la decolorazione graduale da rosso intenso, a roseo fino ad incolore una volta che la reazione è giunta a compimento.

Di seguito in *Figura 2.7* viene rappresentata la struttura molecolare della Rodamina B ed il suo spettro di assorbimento. Presenta una struttura aromatica simile a quella di diversi inquinanti organici presenti nelle acque, la similarità nella struttura con i veri target dello studio costituisce un ulteriore motivo per la scelta di RhB come molecola modello.

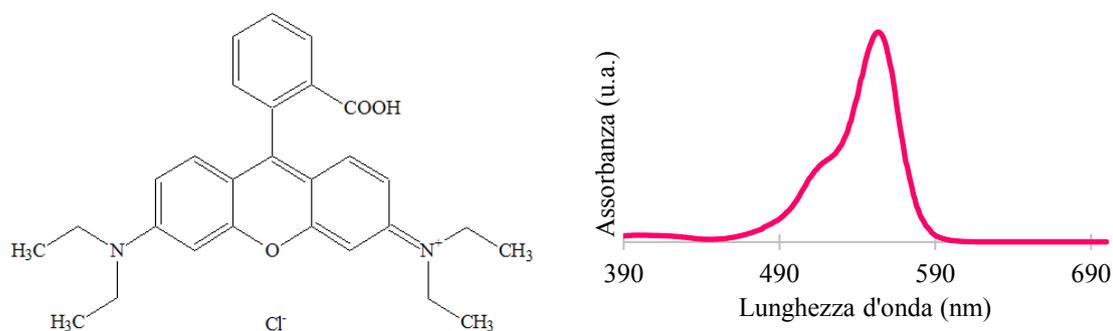


Figura 2.7 – Struttura molecolare e spettro di assorbimento nel visibile di Rodamina B

In presenza di perossido di idrogeno e delle altre specie radicaliche sviluppate sulla superficie della titania grazie all'esposizione ad una radiazione UV, si avvia la reazione di degradazione della struttura cromofora della Rodamina B^[46]. Questa rottura dello scheletro della molecola porta all'ottenimento di prodotti di reazione incolori, di conseguenza si osserva la progressiva decolorazione della soluzione, con relativo riscontro sull'intensità del picco negli spettri di assorbimento. Il meccanismo^[1] della reazione di degradazione viene riportato in *Figura 2.8*.

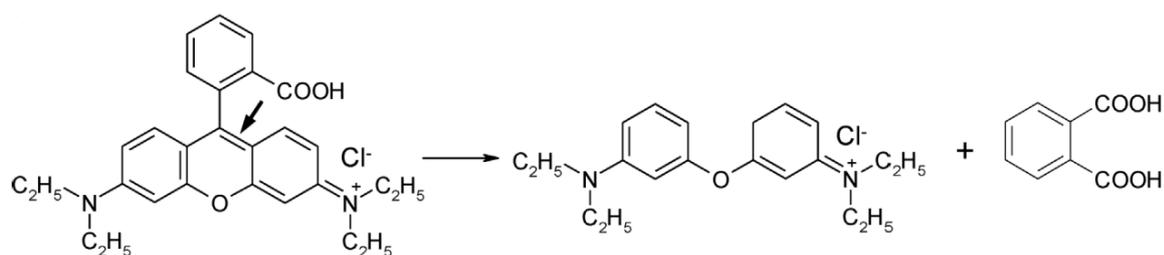


Figura 2.8 – Meccanismo di fotodegradazione della struttura cromofora della Rodamina B

L'attacco avviene sulle molecole di RhB che si sono adsorbite sulla superficie della titania o che si trovano in prossimità di essa, perché le specie radicaliche sono altamente instabili e reattive, quindi non hanno tempo di vita sufficiente per diffondere in soluzione e reagire qui con il substrato. Questo attacco porta alla rottura dei legami facenti parte dello scheletro di RhB, di conseguenza si interrompe la coniugazione alla base della struttura cromofora, perciò si osserva la perdita di colore della soluzione.

2.4 Granulazione tramite tecnica di Spray-Freeze-Drying

La tecnica di Spray-Freeze-Drying^[4] è un processo tecnologico che consente di ottenere un prodotto solido granulato partendo da una sospensione, si possono ottenere particelle di dimensione compresa tra 100nm e 1000µm. Si sviluppa su due fasi, in un primo momento la sospensione viene nebulizzata e lo spray ottenuto viene istantaneamente congelato (*Figura 2.9*), successivamente segue uno step di liofilizzazione durante il quale avviene la rimozione del solvente. Si differenzia dalle tecniche classiche di Spray-Drying in quanto la rimozione del solvente non avviene per evaporazione somministrando calore, ma si lavora al di sotto del punto triplo del solvente (generalmente acqua) e tramite una rampa di pressione e temperatura viene rimosso per liofilizzazione^[47]. Questo costituisce un notevole vantaggio quando si lavora con materiali termolabili o per i quali non è permesso un trattamento ad alta temperatura, come nel caso di biomassa algale.

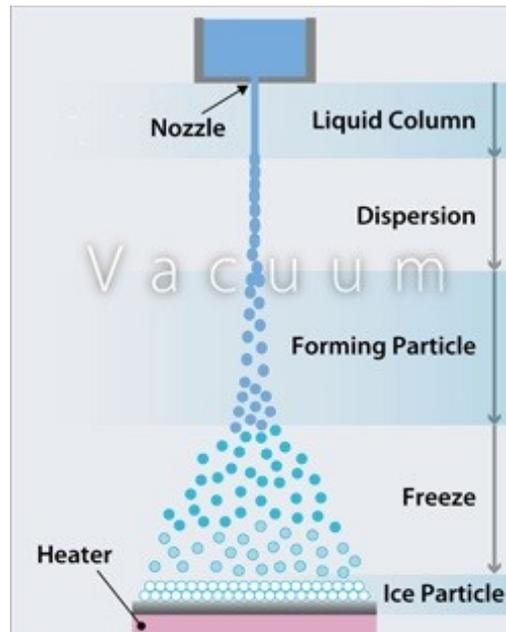


Figura 2.9 – Primo step del processo di Spray-Freeze-Drying, produzione dello spray e istantaneo congelamento delle particelle

Lo Spray-Freeze-Drying viene anche utilizzato come tecnica di microincapsulamento^[48], in cui un materiale di *core* viene rivestito da un *coating* superficiale. Questa tecnica consente di:

- Proteggere sostanze sensibili all'ambiente esterno
- Mascherare proprietà organolettiche delle sostanze
- Ottenere un rilascio mirato e controllato nel tempo
- Maneggiare in maniera sicura materiali tossici

La tecnica trova ampio spazio nelle applicazioni in campo alimentare e farmaceutico dove per conservare i valori nutrizionali degli alimenti e i principi attivi dei farmaci risulta fondamentale lavorare a bassa temperatura, inoltre i vantaggi correlati al microincapsulamento di farmaci e alimenti incrementano la validità del processo all'interno di questi settori industriali.

Il processo di granulazione, in questo lavoro, viene utilizzato come tecnica di ingegnerizzazione di nanosospensioni per ottenere granulati micrometrici che siano in grado di esplicitare un'elevata reattività, grazie al mantenimento di una strutturazione a livello nanometrico^[4]. I vantaggi dell'utilizzo delle polveri micrometriche rispetto all'utilizzo diretto delle nanosospensioni colloidali sono: la possibilità di separare facilmente il catalizzatore dall'ambiente di reazione, la maggiore durata del catalizzatore,

la riduzione dei problemi di natura ambientale e la riduzione dei costi di gestione. Oltre a questi vantaggi relativi alla catalisi eterogenea vi sono benefici a livello di sicurezza.

I maggiori svantaggi dello Spray-Freeze-Drying sono costituiti da:

- Elevato consumo energetico
- Lungo tempo del processo
- Ottenimento di una struttura porosa

Quest'ultimo è da considerarsi uno svantaggio solo nel caso in cui è desiderato proteggere o isolare una sostanza microincapsulata, nell'applicazione voluta di granulazione del catalizzatore costituisce invece un vantaggio perché consente di mantenere una nanostruttura e di conseguenza un'elevata area superficiale.

Il vantaggio principale invece, come già citato, è quello di poter lavorare con sostanze molto sensibili al calore, come *C. Vulgaris*, ed evitare trasferimenti di fase durante la granulazione che possono portare alla formazione di gradienti di composizione all'interno della capsula con fenomeni indesiderati quali la segregazione di fasi e l'agglomerazione.

Comparata allo Spray-Drying la tecnica di Spray-Freeze-Drying è fino a 30-50 volte più costosa a causa dello step in liofilizzatore, dove gli alti consumi energetici per mantenere basse temperature e pressioni, combinati alle lunghe tempistiche dello step (48h) determinano un sensibile innalzamento dei costi^[47]. Per questi motivi la tecnica è destinata ad applicazioni ad alto valore aggiunto come possono essere ad esempio nell'ambito farmaceutico, cosmetico, alimentare o chimico.

Capitolo 3 – Parte sperimentale

3.1 Procedura generale

Durante le sintesi e i test sono stati utilizzati prodotti commerciali senza ulteriori purificazioni. Le procedure sono state condotte in condizioni di temperatura e pressione ambiente (25°C, 1atm) in aria, eccetto dove diversamente indicato.

La prima fase del processo, schematizzato in *Figura 3.1*, è l'accoppiamento a livello di sospensione della microalga *C. Vulgaris* con la componente inorganica. Il mix appena prodotto viene messo in agitazione su rulli rotanti per 24h al fine di massimizzare le interazioni tra biomassa e componente inorganica.

Tipicamente le sospensioni sono state caratterizzate mediante misure DLS ed ELS per determinare il diametro medio della popolazione e il potenziale di doppio strato elettrico, mentre il diametro medio delle cellule di *C. Vulgaris* di partenza è stato determinato tramite immagini al microscopio ottico.

Con l'obiettivo di supportare la biomassa e migliorare la processabilità dei composti ottenuti, su diversi campioni è stato rimosso il solvente granulando la sospensione tramite tecnica di Spray-Freeze-Drying. In questo modo è possibile preparare polveri micrometriche che conservano la tipica nanostruttura^[4]. La caratterizzazione delle polveri ottenute prevede la determinazione dell'area superficiale tramite BET e della morfologia e della distribuzione dei componenti all'interno dei granuli tramite SEM ed EDS.

I campioni prodotti sono stati testati dal punto di vista delle proprietà funzionali sia in forma di sospensione che di granulato. Sono stati valutati in particolare: l'assorbimento di metalli pesanti disciolti in acqua, utilizzando come metallo di riferimento il rame (Cu^{2+}) e l'attività fotocatalitica testata mediante fotodegradazione di Rodamina B (RhB). Infine, le tecniche spettrofotometriche UV-Vis e FT-IR sono state utilizzate per la caratterizzazione di base della materia prima algale, in particolare via UV-Vis è possibile evidenziare i picchi di assorbimento della clorofilla e via FT-IR i picchi di interesse dei gruppi funzionali della parete cellulare responsabili del biosorbimento.

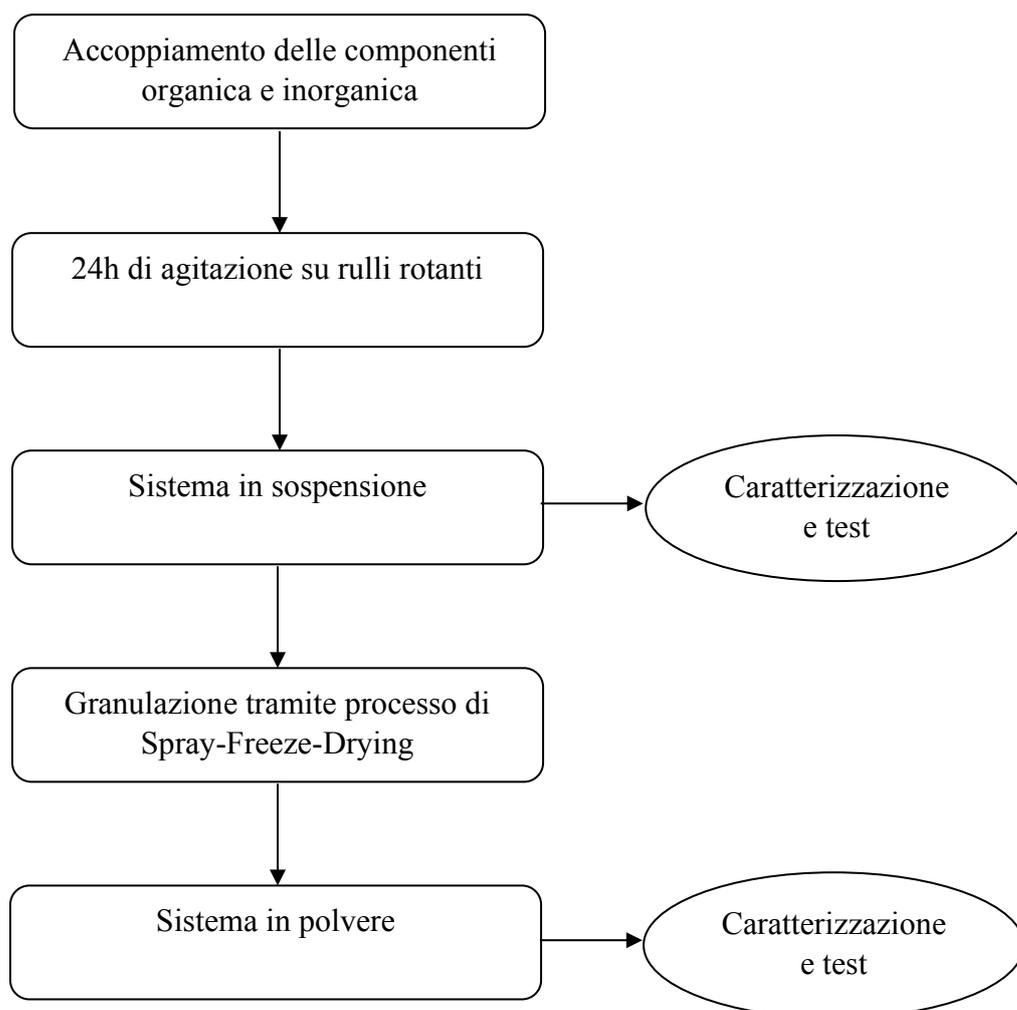


Figura 3.1 – Schema del processo di produzione dei sistemi di biorimediazione a base di *C. Vulgaris*/TiO₂

3.2 Materiali

La biomassa algale di *C. Vulgaris* è stata acquistata presso Micoperi Blue Growth (Ravenna) in due diverse forme:

- **Congelata**: sospensione di *C. Vulgaris* direttamente estratta dal fotobioreattore a concentrazioni comprese tra 0.1 e 0.8 g/L e successivamente congelata
- **Liofilizzata**: polvere di *C. Vulgaris* liofilizzata dall'azienda a partire dalla biomassa concentrata

Il biossido di titanio selezionato è un prodotto commerciale AEROXIDE®P25 (Evonik), che viene sospeso in acqua per la preparazione dei sistemi misti TiO₂/*C. Vulgaris*. Oltre al biossido di titanio si sono accoppiati alla biomassa anche silice (SiO₂) e magnetite (Fe₃O₄), la prima aggiunta per implementare le proprietà fotocatalitiche e la seconda per indurre proprietà magnetiche utili a migliorare la fase di recupero delle polveri.

Di seguito in *Tabella 3.1* sono riportate le materie prime e i reagenti utilizzati durante l'attività sperimentale.

Tabella 3.1 – Materiali utilizzati

| Materiale | Fornitore | Stato | Caratteristiche |
|---|-------------------------|-------------------------------|--|
| <i>Chlorella Vulgaris</i> | Micoperi Blue Growth | Congelato | Stock1 Conc. 0.18g/L Stock2 Conc. 0.72g/L |
| <i>Chlorella Vulgaris</i> | Micoperi Blue Growth | Liofilizzato | |
| Biossido di titanio, TiO ₂ P25 | Evonik Degussa | Solido | Nanopolvere |
| Biossido di silicio, SiO ₂ LUDOX HS-40 | Grace Davidson | Nanosospensione colloidale | pH = 9.7 Conc. 40%wt |
| Magnetite, Fe ₃ O ₄ | Colorobbia S.p.A. | Nanosospensione | Conc. 0.2%wt Fe ₃ O ₄ PEG-PLGA |
| Rodamina B | Sigma-Aldrich | Solido | Contenuto di colorante ~95% |
| Cloruro rameico, CuCl ₂ | Sigma-Aldrich | Solido | Purezza 99% |
| Rame, Cu | CPAchem | Soluzione | Standard per ICP Cu 1000mg/L Matrice HNO ₃ 2%wt |
| Acido cloridrico, HCl | Titolchimica | Soluzione | Conc. 37%wt |
| Idrossido di sodio, NaOH | Sigma-Aldrich | Pellets | Purezza ≥97% |
| Acido nitrico, HNO ₃ | Titolchimica | Soluzione | Conc. 65%wt |
| Perossido di idrogeno, H ₂ O ₂ | Sigma-Aldrich | Soluzione | Conc. 30%wt |
| Argento nitrato, AgNO ₃ | Sigma-Aldrich | Solido | Purezza ≥99% |
| Idrossietilcellulosa etossilato, quaternarizzato | SoftCAT | Solido | |

3.3 Preparazione dei campioni in sospensione

I componenti fondamentali dei materiali preparati sono *C. Vulgaris* e titania, rispettivamente per la capacità di assorbire metalli pesanti e per le proprietà fotocatalitiche. Durante lo studio sono state modificate tre variabili: il contenuto in peso di biomassa, la forma della biomassa aggiunta (fresca congelata o liofilizzata) e la composizione della frazione inorganica.

Tabella 3.2 – Campioni preparati e testati

| Campione | Conc. solido totale (g/L) | <i>C. Vulgaris</i> %wt | TiO₂ %wt | SiO₂ %wt | Fe₃O₄ %wt |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|--|
| TCV0.01 cong | 30.0036 | 0.01 | 99.99 | | |
| TCV0.06 cong | 30.018 | 0.06 | 99.94 | | |
| TCV0.6 cong | 30.18 | 0.60 | 99.40 | | |
| TCV6 cong | 3 | 6.00 | 94.00 | | |
| TSCV0.01 cong | 30.0036 | 0.01 | 25.00 | 74.99 | |
| TSCV0.06 cong | 30.018 | 0.06 | 24.98 | 74.96 | |
| TCV0.03Fe0.3 cong | 60.22 | 0.03 | 99.63 | | 0.33 |
| TCV0.06 liof | 30.018 | 0.06 | 99.94 | | |
| TCV9 liof | 66 | 9.09 | 90.91 | | |
| TCV8Fe0.8 liof | 65.5 | 7.63 | 91.60 | | 0.76 |

La Tabella 3.2 mostra i campioni preparati e le rispettive caratteristiche in termini di concentrazione di solido totale in sospensione, contenuto percentuale dei singoli componenti e tipologia di *C. Vulgaris* impiegata (fresca congelata o liofilizzata). Le sigle utilizzate per identificare i campioni prevedono l'utilizzo di *T* per titania, *CV* per *C. Vulgaris*, *Fe* per magnetite e *S* per silice seguiti dal contenuto percentuale di alga e dalle diciture *cong* e *liof* a seconda della forma della biomassa utilizzata: congelata o liofilizzata. Dove presente è indicato il contenuto percentuale di magnetite.

3.3.1 Campioni con *C. Vulgaris* fresca congelata

La formulazione base è costituita da *C. Vulgaris* fresca congelata e titania. Il primo step è la preparazione della sospensione di *C. Vulgaris*, l'alga conservata in freezer a -18°C viene scongelata ed opportunamente diluita. Quindi si procede con la preparazione della nanosospensione di titania in acqua, mantenuta sotto agitazione magnetica, la quale viene

poi aggiunta goccia a goccia alla sospensione di *C. Vulgaris*, sempre mantenute in agitazione al fine di evitare fenomeni di precipitazione. Ottenuta la sospensione mista segue una lenta e costante miscelazione per mezzo di rulli rotanti allo scopo di massimizzare l'interazione tra fase inorganica e biomassa. Il campione così ottenuto è pronto per essere testato.

Tabella 3.3 – Preparativa per 100mL di campione

| Campione | <i>C. Vulgaris</i> cong (mL) | TiO₂ (g) |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------------|
| TCV0.01 cong | 2* | 3 |
| TCV0.06 cong | 10* | 3 |
| TCV0.6 cong | 18** | 3 |
| TCV6 cong | 25** | 0.282 |

*Stock 1 a 0.18g/L

**Stock 2 a 0.72g/L

3.3.2 Campioni con *C. Vulgaris* liofilizzata

La sequenza operativa per la produzione dei campioni partendo da alga liofilizzata è identica alla precedente, l'unica differenza è nel primo passaggio di preparazione della sospensione algale. In questo caso è sufficiente pesare il quantitativo desiderato di polvere di *C. Vulgaris* e sospenderlo in acqua. Gli step seguenti fino all'ottenimento del campione sono descritti nel Capitolo 3.3.1.

Tabella 3.4 – Preparativa per 100mL di campione

| Campione | <i>C. Vulgaris</i> liof (g) | TiO₂ (g) |
|-----------------|------------------------------------|----------------------------|
| TCV0.06 liof | 0.018 | 3 |
| TCV9 liof | 0.6 | 6 |

3.3.3 Campioni con magnetite

La magnetite viene aggiunta al sistema alga-titanio sia sui campioni prodotti da biomassa fresca congelata che liofilizzata. La procedura è molto simile alle precedenti, prevede l'aggiunta in agitazione costante del sol di magnetite opportunamente diluito alla sospensione di *C. Vulgaris*/TiO₂. Una volta ottenuta la sospensione a tre componenti la si pone in lenta agitazione su rulli rotanti per 24h.

Tabella 3.5 – Preparativa per 100mL di campione

| Campione | <i>C. Vulgaris</i> | TiO₂ (g) | Fe₃O₄ (g)* |
|-------------------|---------------------------|----------------------------|---|
| TCV8Fe0.8 liof | 0.5g | 6 | 25 |
| TCV0.03Fe0.3 cong | 11.1mL** | 6 | 10 |

*Massa di sospensione di Fe₃O₄ 0.2%wt

** Stock 1 a 0.18g/L

3.3.4 Campioni con silice

La silice è stata introdotta per incrementare l'attività fotocatalitica della titania, infatti precedenti studi^[36] hanno dimostrato che la presenza di silice in rapporto TiO₂-SiO₂ 1:3 migliora sensibilmente le performance fotocatalitiche. Il primo step è la preparazione della sospensione acquosa di titania ottenuta pesando e disperdendo in acqua la polvere, mentre la sospensione di silice viene preparata per diluizione del prodotto commerciale, in seguito alla regolazione del pH tramite resina a scambio cationico Dowex 50 WX8 20-50 (LennTech), che viene portato dal valore di partenza di 9.7 a circa 4. Mantenendo sotto agitazione magnetica si procede all'aggiunta goccia a goccia della sospensione di silice in quella di titania. Al mix contenente i due ossidi vengono aggiunti corpi macinanti costituiti da sfere di zirconia di diametro 5mm, quindi il campione viene sottoposto a trattamento di ball-milling per 24h su rulli rotanti. La rotazione dei corpi macinanti permette di creare delle regioni ad alta energia in corrispondenza delle zone di impatto tra le sfere, favorendo l'interazione tra titania e silice. La seconda fase prevede l'aggiunta della sospensione di ossidi inorganici alla biomassa, perciò si prepara la sospensione di *C. Vulgaris* sciogliendo la quantità desiderata di materiale congelato e diluendolo in acqua. Si gocciola la sospensione di titania-silice in quella di alga, entrambe mantenute sotto agitazione magnetica. Il campione così ottenuto viene posizionato su rulli rotanti per 24h.

Tabella 3.6 – Preparativa per 100mL di campione

| Campione | <i>C. Vulgaris</i> (mL)* | TiO₂ (g) | SiO₂ (g)** |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| TSCV0.01 cong | 0.5 | 0.75 | 5.625 |
| TSCV0.06 cong | 2.5 | 0.75 | 5.625 |

*Stock 2 a 0.72g/L

**Massa di sospensione di SiO₂ 40%wt

3.4 Preparazione dei campioni granulati

Le sospensioni sono state granulate tramite Spray-Freeze-Drying e sui campioni solidi ottenuti sono stati ripetuti i test di biosorbimento e fotocatalitici al fine di valutare l'impatto del processo di granulazione sull'attività del sistema.

3.4.1 Trattamento di Spray-Freeze-Drying

Lo strumento utilizzato per granulare le sospensioni è Lab-scale Granulator LS-2, riportato in *Figura 3.2*.



Figura 3.2 – Lab-scale Granulator LS-2

Il funzionamento dell'apparecchiatura consiste nel nebulizzare in azoto liquido la sospensione mantenuta in agitazione da una pompa peristaltica impostata a 40rpm. Il fluido giunge ad un ugello del diametro di 100 μ m, al quale è collegato un flusso di azoto a 0.4bar che permette di nebulizzare la sospensione. Lo spray generato giunge poi all'interno di un bagno di azoto liquido alla temperatura di -196°C, mantenuto in agitazione magnetica, dove viene istantaneamente congelato e successivamente liofilizzato all'interno del liofilizzatore LYO GT 2, SRK System Technik GMBH, schematizzato in *Figura 3.3*. Nella camera di liofilizzazione la sublimazione inizia ad una pressione di 1.5mbar e una temperatura di -1°C per una durata di circa 48h al termine delle quali si produce il granulato.

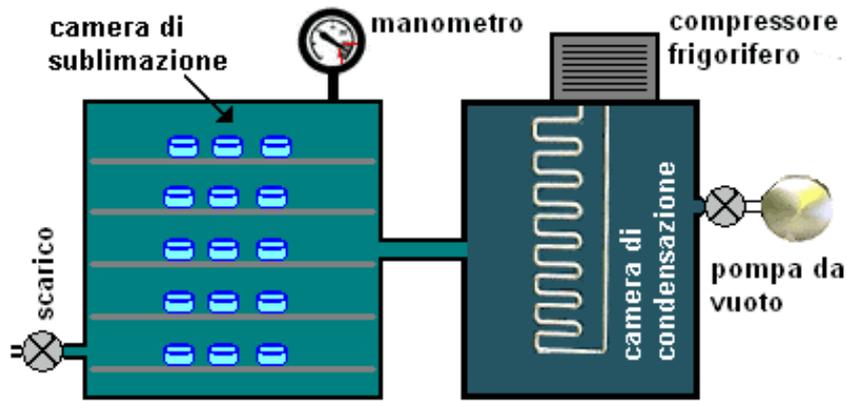


Figura 3.3 – Schema di un liofilizzatore

Durante la liofilizzazione è fondamentale che la temperatura rimanga inferiore agli 0°C sino a quando la pressione non raggiunge i 6mbar, valore caratteristico del punto triplo dell'acqua (Figura 3.4) ed importante per evitare la fusione del ghiaccio che potrebbe portare ad un collasso della struttura creata. La presenza di acqua liquida, infatti, comporterebbe l'aggregarsi delle microsferiche e la distruzione della nanostruttura interna al granulo, andando a determinare un drastico calo di area superficiale e quindi a deprimere l'attività del sistema.

Al fine di preservare la struttura di *C. Vulgaris*, composto termolabile, è stata scelta la tecnica di Spray-Freeze-Drying per granulare i campioni invece di altre tecniche che sfruttano le alte temperature per la rimozione del solvente.

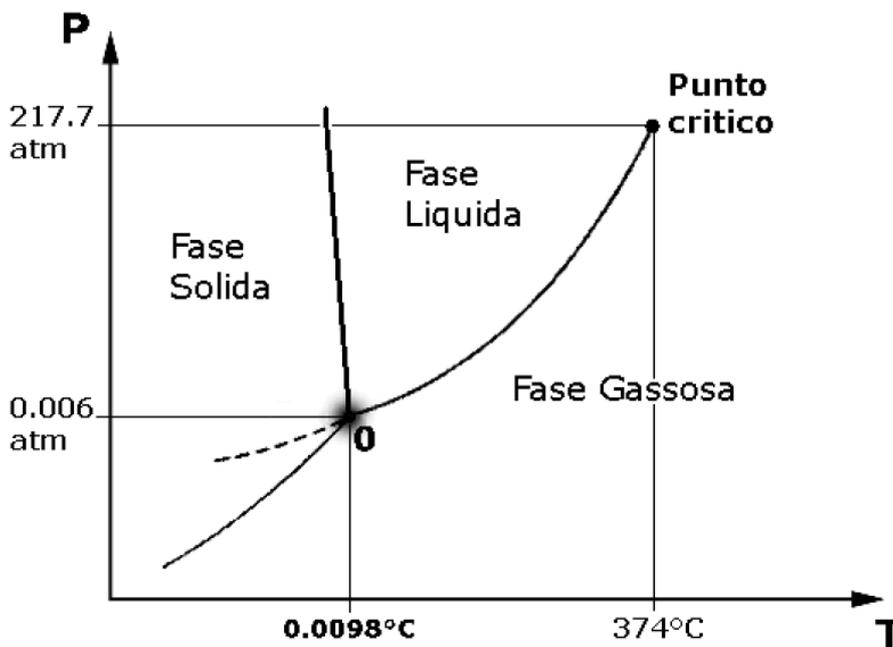


Figura 3.4 – Diagramma di stato H_2O

3.5 Test di biorimediazione

L'attività dei campioni preparati nell'ambito della risanazione di reflui acquosi industriali è stata studiata sotto due punti di vista. La rimozione di metalli pesanti, principalmente a carico della biomassa algale di *C. Vulgaris* e la fotodegradazione di inquinanti organici condotta ad opera della titania.

3.5.1 Assorbimento di metalli pesanti

La categoria dei metalli pesanti è stata rappresentata dal catione rameico Cu^{2+} , per via della sua disponibilità e del basso rischio nella manipolazione rispetto ad altri metalli facenti parte della famiglia di altrettanto interesse in questo ambito, quali nichel, cadmio e cromo. Si è preparata una soluzione acquosa di partenza a 1000ppm di Cu^{2+} partendo dal sale di cloruro rameico CuCl_2 . Questa soluzione è stata conservata in frigorifero a 4°C e la concentrazione è stata periodicamente controllata tramite analisi elementare ICP. Il sistema per la conduzione dei test, riportato in *Figura 3.5*, è costituito da un agitatore magnetico sul quale viene posizionata una piastra metallica contenente 15 locazioni per i campioni. Tale piastra consente di sottoporre tutti gli alloggiamenti allo stesso campo magnetico in modo da mantenere un'identica velocità di agitazione. Si lavora a 300rpm, inoltre il sistema consente la regolazione della temperatura, che durante i test viene mantenuta in condizioni ambiente, $25\pm 1^\circ\text{C}$.

La selezione del pH di lavoro ottimale^[49,50] deve tener conto del punto isoelettrico, riportato in letteratura^[51] circa a pH 2, utile per garantire la stabilità della sospensione. I pH elevati garantiscono la stabilità e anche l'attività dei gruppi funzionali, tuttavia possono compromettere lo stato della biomassa e indurre la precipitazione degli idrossidi metallici, riducendo la disponibilità del catione per il biosorbimento. Nel caso della soluzione di Cu^{2+} 10ppm a 25°C ($K_{ps}=2.2\cdot 10^{-20}$), utilizzata nei test di biosorbimento, l'idrossido rameico $\text{Cu}(\text{OH})_2$ inizia a precipitare a pH 6, pertanto si è optato per un pH di lavoro di pH 4.5 utile a garantire la stabilità, ma non troppo acido e ostile per l'alga.

Il primo set di prove è finalizzato alla caratterizzazione delle materie prime per poter poi fare valutazioni sui campioni. Quindi sono state analizzate le sospensioni di *C. Vulgaris* sia congelata che liofilizzata, titania, silice e magnetite. Dove titania e silice sono state testate sia come nanosospensione che come sospensione del prodotto granulato tramite Spray-Freeze-Drying. Per limitazioni correlate alla concentrazione della materia prima^[22], il test su *C. Vulgaris* fresca congelata viene eseguito ad una concentrazione di

campione 0.018g/L, il liofilizzato e la magnetite 0.5g/L, tutti gli altri test sono eseguiti a 2.5g/L.



Figura 3.5 – Set up sperimentale per la conduzione dei test di assorbimento di Cu^{2+}

Le proprietà di assorbimento del catione rameico sono state valutate su tutti i campioni prodotti, sia a livello di sospensione acquosa che di polvere granulata. Le condizioni sperimentali prevedono l'analisi di un volume di 8mL, contenente 10ppm di inquinante, le concentrazioni di campione sopra riportate, pH 4.5 (regolato con HCl 0.01M), temperatura 25°C e agitazione a 300rpm. Al fine di valutare l'andamento del processo di assorbimento^[52] nel breve e lungo periodo sono stati eseguiti test della durata di 1 e 24 ore, al termine delle quali il campione viene prelevato integralmente, trasferito in filtro con limite di peso molecolare nominale (NMWL) di 3kDa e ultracentrifugato a 4500rpm per 40 minuti. In questo modo si separa il solido contenente il rame assorbito dalla biomassa, dal liquido contenente la restante frazione non ritenuta. La componente liquida viene analizzata tramite ICP-OES per determinare la concentrazione di Cu^{2+} , lo strumento utilizzato è Agilent Technologies 5100 ICP-OES con montato autocampionatore Agilent Technologies SPS 3. Prima di procedere con l'analisi ICP è necessario eseguire un pretrattamento del campione al fine di garantire che analita e matrice siano digeriti in modo da ottimizzare la misura. La procedura di pretrattamento, normalizzata per l'intero lavoro, prevede l'aggiunta di 1mL di HNO_3 65%wt e 2mL di

H₂O₂ 30%wt ogni 10mL di campione da trattare. L'acido nitrico provvede a massimizzare la ionizzazione del rame, mentre l'acqua ossigenata a degradare l'eventuale componente organica che è riuscita ad attraversare il filtro durante l'ultrafiltrazione. I campioni così trattati sono pronti per la lettura della concentrazione del rame tramite ICP, allo stesso modo vengono trattati anche gli standard prodotti per costruire la retta di taratura. Tali soluzioni vengono preparate per diluizione dello standard per ICP di Cu (1000mg/L) in matrice di HNO₃ 2%wt, i punti della retta sono: 10mg/L, 1mg/L, 0.1mg/L, 0.05mg/L e il bianco costituito da acqua. Ogni campione è stato analizzato in triplice copia e le letture sono il risultato della media di sei linee di emissione del rame: 213.598nm, 222.778nm, 223.009nm, 224.700nm, 324.754nm, 327.395nm.

3.5.2 Fotodegradazione di inquinanti organici

Le proprietà fotocatalitiche della titania conferiscono al sistema la possibilità di degradare inquinanti organici quando attivato da una radiazione luminosa nel range dell'UV-Vis. Questa analisi consente di valutare quelle che sono le proprietà di fotodegradazione dei sistemi prodotti e di confrontarle con il fotocatalizzatore di riferimento, TiO₂ P25^[38].

Il test viene condotto in camera oscurata in modo da sottoporre il campione ad un irraggiamento controllato, dovuto alla sola lampada utilizzata Osram Ultra-Vitalux 300W che produce un mix di radiazioni simulanti la luce solare, i test sono stati effettuati a una potenza misurata di 50W/m².

Sperimentalmente si lavora con becher da 600mL e un volume di campione in analisi di 200mL contenente il catalizzatore e l'inquinante modello in fase acquosa. Tutti i sistemi prodotti sono stati testati come fotocatalizzatori sia sotto forma di sospensione che di granulato.

Il colorante organico impiegato come inquinante modello è la Rodamina B (RhB), un composto solubile in acqua di colore rosso intenso (*Figura 3.6*) facilmente monitorabile per via spettrofotometrica. A inizio esperimento si verifica che la sola soluzione di RhB irraggiata non sia soggetta a fenomeni di fotolisi.

In ogni analisi sui campioni si lavora mantenendo costante la quantità di titania, infatti si introduce nel batch di reazione un quantitativo di catalizzatore corrispondente ad un contenuto di TiO₂ pari a 20mg dispersi in 200mL. Quindi si aggiunge il colorante organico selezionato come inquinante modello fino ad ottenere una concentrazione finale di RhB pari a 0.007g/L.



Figura 3.6 – Soluzione di Rodamina B 0.07g/L

Il batch di reazione così ottenuto viene mantenuto al buio per 30 minuti, al fine di raggiungere l'equilibrio dei possibili fenomeni che intercorrono, quali solubilizzazione, assorbimento e interazioni tra le specie presenti. La reazione di fotodegradazione viene campionata mediante prelievo di aliquote da 3mL analizzate allo spettrofotometro monoraggio Hach Lange DR3900, previa rimozione delle particelle di catalizzatore per mezzo di passaggio su filtro da siringa a $0.22\mu\text{m}$. Lo spettro viene registrato nel range di lunghezza d'onda del visibile, compreso tra 390-700nm, l'analita RhB presenta il massimo di assorbimento a 554nm. Tipicamente i test sono condotti per una durata di 60 minuti durante i quali si eseguono campionamenti intervallati da 5 o 10 minuti, in questo modo è possibile monitorare l'andamento cinetico della reazione, che segue il comportamento di una cinetica di pseudo I ordine (Eq. 2.1) dove l'acqua è sia reagente che solvente, quindi è presente in largo eccesso rispetto a RhB e la sua concentrazione non varia significativamente durante il corso della reazione. Si determina la percentuale di degradazione totale della RhB, in quanto secondo la legge di Lambert-Beer (Eq. 2.2) la concentrazione è direttamente proporzionale all'assorbanza.

$$\ln \frac{C_0}{C} = kt \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Dove C_0 e C sono rispettivamente la concentrazione di RhB al tempo 0 e al tempo t , in una cinetica di pseudo I ordine la costante cinetica k dipende dalla concentrazione di un solo reagente e l'unità di misura è $[\text{min}^{-1}]$.

$$A = \varepsilon bC \quad (\text{Eq. 2.2})$$

La legge di Lambert-Beer mette in relazione l'assorbanza A e la concentrazione dell'analita C [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], con ε [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] coefficiente di assorbimento molare e b [cm] lunghezza del cammino ottico.

Vista la diretta proporzionalità tra assorbanza e concentrazione è possibile usufruire dell'Eq. 2.3 per la valutazione della costante cinetica e dell'Eq. 2.4 per determinare la percentuale di conversione del reagente.

$$\ln \frac{A_0}{A} = kt \quad (\text{Eq. 2.3})$$

$$X_{RhB} = \frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2.4})$$

Ne consegue che per via spettrofotometrica è possibile determinare la costante cinetica e la conversione legate ai diversi catalizzatori. È perciò possibile il confronto dei vari campioni in base alla percentuale di fotodegradazione dell'inquinante, valutata rispetto al calo di assorbanza del campione mentre la costante cinetica del processo viene determinata per via grafica come pendenza della retta ottenuta nel grafico $\ln(A_0/A)$ in funzione di t .

3.6 Strumenti e tecniche di caratterizzazione

Di seguito vengono riportati gli strumenti e le tecniche utilizzate per caratterizzare le proprietà chimico-fisiche di interesse dei campioni prodotti. Sono state svolte misure durante ogni step del processo di produzione e verranno suddivise come tecniche per la caratterizzazione di sospensioni o di solidi.

3.6.1 Tecniche di caratterizzazione dei sistemi in fase sol

Le proprietà di interesse a livello di sospensione sono il potenziale Zeta e la dimensione delle particelle. Lo studio del potenziale Zeta è fondamentale sotto due aspetti, la previsione della stabilità di una sospensione e la possibilità di accoppiare due o più sospensioni. È stata inoltre eseguita la determinazione qualitativa dell'assorbanza della

clorofilla nella regione del visibile e da parte dei gruppi funzionali presenti sulla parete cellulare algale nella regione dell'infrarosso.

Misura del potenziale Zeta – ELS (Electrophoretic Light Scattering)

La misura del potenziale Zeta delle particelle in sospensione è stata effettuata con lo strumento Zetasizer nano ZPS, Malvern Instrument, UK, lo strumento è progettato per lo studio della distribuzione granulometrica di sospensioni colloidali, perciò con dimensioni comprese tra 1-1000nm, ma è in grado di rilevare particelle fino a 10000nm. La tecnica ELS consente di misurare la mobilità elettroforetica, la quale viene convertita nel valore di potenziale Zeta grazie all'equazione di Smoluchowski. Il campione opportunamente diluito (0.1-0.5g/L) viene introdotto in una apposita cella di volume circa 0.7mL contenente due elettrodi ai quali viene applicato un campo elettrico, le particelle in sospensione risentono di tale campo elettrico e migrano verso l'elettrodo che possiede carica opposta. La migrazione avviene con una certa velocità, definita mobilità elettroforetica, che dipende dal valore assoluto del potenziale Zeta delle particelle.

La misura del potenziale Zeta fornisce un'indicazione sulla stabilità colloidale del sistema, infatti un valore elevato comporta una maggiore stabilità della sospensione in quanto è all'origine di forze di repulsione elettrostatica che impediscono l'aggregazione delle particelle. Quando il potenziale Zeta è basso invece le forze attrattive prevalgono sulle repulsive e quindi sono più probabili fenomeni come coagulazione e flocculazione. In genere, una sospensione viene definita stabile dal punto di vista elettrostatico quando il valore assoluto del potenziale Zeta è maggiore di 25mV.

Lo strumento è munito di un titolatore automatico, Malvern MPT-2 Multipurpose Titrator, Malvern Instrument, UK, utilizzato per seguire titolazioni del potenziale Zeta in funzione del pH. Queste titolazioni sono utili per valutare le regioni di pH nelle quali il campione è stabile o meno. Un dato di interesse che solitamente viene determinato durante l'arco della titolazione è il punto isoelettrico (IEP, IsoElectric Point), che rappresenta il pH per il quale il valore delle cariche elettriche delle particelle viene neutralizzata, ciò corrisponde ad un valore di potenziale Zeta di 0mV e quindi si ha la massima destabilizzazione del sistema. La titolazione richiede 10mL di campione opportunamente diluito (0.1-0.5g/L), e utilizza come titolante acido HCl 0.1M e HCl 0.01M e come titolante basico NaOH 0.1M e NaOH 0.01M. Il pH viene costantemente monitorato con il pH-metro in linea (MV 114-SC, Malvern Instrument).

Di seguito in *Figura 3.7* viene riportato un esempio di grafico ottenuto da una titolazione di potenziale Zeta in funzione del pH.

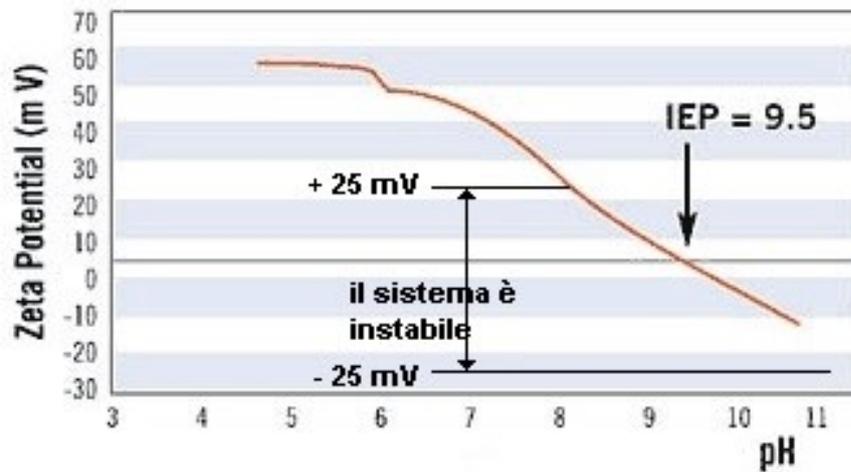


Figura 3.7 – Esempio di grafico di titolazione potenziale Zeta/pH e individuazione del punto isoelettrico

Misura del diametro idrodinamico – DLS (Dynamic Light Scattering)

Al fine di ottenere un profilo della distribuzione del diametro idrodinamico di particelle in sospensione ed un valore medio della popolazione, si sfrutta la dispersione dinamica della luce. Quando una radiazione luminosa colpisce una particella di diametro paragonabile alla sua lunghezza d'onda si disperde in tutte le direzioni. Utilizzando una sorgente monocromatica e coerente, quale un laser, si possono osservare delle fluttuazioni dipendenti dal tempo e dall'intensità di scattering. Queste fluttuazioni sono dovute al moto browniano tipico delle particelle in sospensione. Lo strumento utilizza una funzione di autocorrelazione la quale tende a decadere esponenzialmente con l'avanzare del tempo a causa del moto delle particelle, dopo un lungo periodo non vi è più correlazione tra l'intensità di dispersione dello stato iniziale e finale. La velocità di decadenza di questa correlazione dipende dalla velocità di diffusione delle particelle sottoposte a moto browniano e di conseguenza dalla loro dimensione secondo l'equazione *Eq. 2.5*. È perciò possibile determinare una distribuzione di diametro idrodinamico.

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \mu \cdot d_p} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

Dove D è la velocità di diffusione, k la costante di Boltzman, T la temperatura, μ la viscosità e d_p il diametro delle particelle. Lo strumento consente la misura della velocità di diffusione, quindi note temperatura e viscosità è possibile determinare la dimensione delle particelle in sospensione. Solitamente per sistemi sufficientemente diluiti la viscosità è approssimabile a quella del mezzo, in questo caso acqua.

Lo strumento per la misura del diametro idrodinamico tramite Dynamic Light Scattering è lo stesso utilizzato per l'Electrophoretic Light Scattering, ovvero Zetasizer nano ZPS, (Malvern Instrument, UK) e lavora in modalità back scattering, con angolo di misura 173° . Tipicamente, la misura viene effettuata su circa 1mL di campione opportunamente diluito (0.1-0.5g/L) e posizionato nell'apposita cuvetta.

Misura del diametro cellulare – Microscopia ottica

Il diametro cellulare di *C. Vulgaris* è stato determinato mediante analisi al microscopio ottico delle sospensioni di biomassa. Lo strumento utilizzato è il microscopio digitale 3D Hirox RH-2000, che monta una lampada LED ad alta intensità con una temperatura di colore di 5700K, con ampio range di ingrandimento tra 35x e 5000x.

Spettroscopia UV-Vis

È stato utilizzato lo spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 750 per eseguire misure di assorbanza nel range 250-800nm sulle sospensioni di *C. Vulgaris* e *C. Vulgaris*/titania allo scopo di visualizzare i due picchi di assorbimento della clorofilla-A che cadono a 680nm e 440nm.

La clorofilla è un ormai ben noto pigmento di colore verde, presente nei cloroplasti delle cellule vegetali e negli organismi procarioti che realizzano la fotosintesi clorofilliana. La struttura è costituita da un eterociclo porfirinico al centro del quale è coordinato uno ione magnesio e dall'anello parte una lunga catena idrofoba. Negli eucarioti sono presenti più tipi di clorofilla, queste presentano alcune differenze nella struttura che si riflettono nello spettro di assorbimento della radiazione solare, come riportato in *Figura 3.8*.

In *C. Vulgaris* lo spettro di assorbimento è dominato da clorofilla-A, infatti i picchi cadono a 680nm e 440nm.

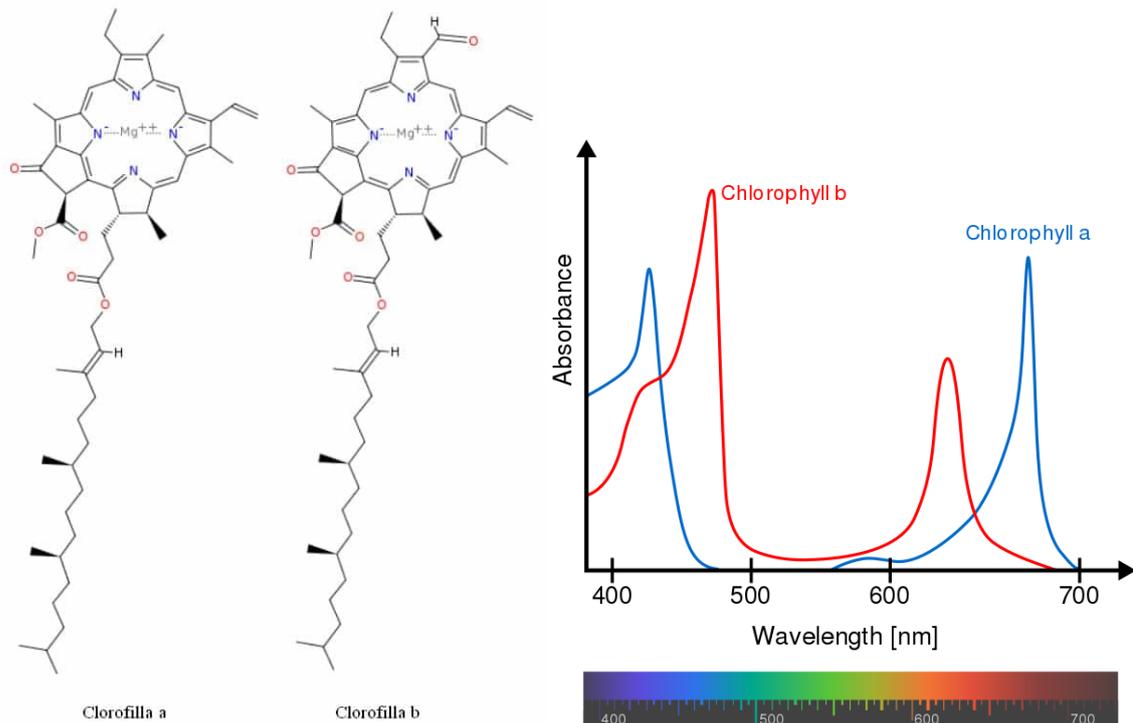


Figura 3.8 – Struttura e spettri di assorbimento di clorofilla-A e clorofilla-B

Spettroscopia FT-IR ATR

Sono state eseguite misure di riflettanza totale attenuata su *C. Vulgaris* nella regione dell'IR tra $1800-900\text{cm}^{-1}$ dove cadono gli assorbimenti dei gruppi funzionali caratteristici della parete cellulare algale. Questi gruppi funzionali^[17] sono i responsabili del fenomeno di assorbimento di metalli pesanti, infatti tramite meccanismo di scambio sono capaci di legare cationi metallici sostituendo gli ioni H^+ presenti (Figura 3.9).

Lo strumento utilizzato è Thermo Scientific Nicolet iS5 con in camera di misura montato l'accessorio iD7 ATR che consente la misura in riflettanza totale attenuata, come cristallo ad alto indice di rifrazione si usa una punta di diamante.

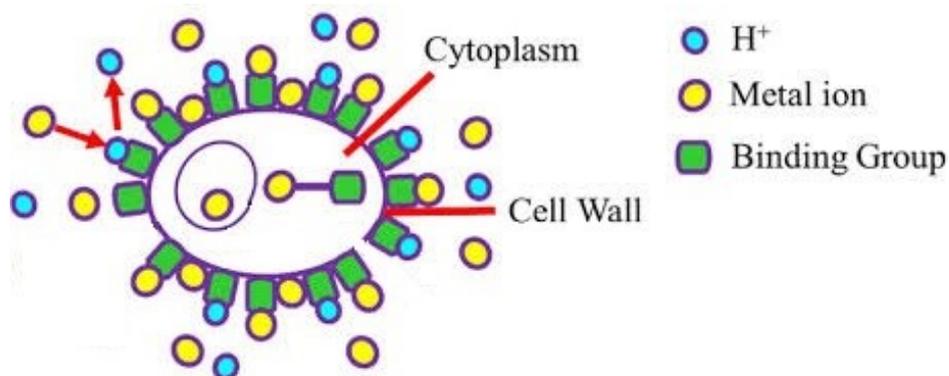


Figura 3.9 – Biosorbimento di ioni metallici

In questa tecnica il campione viene messo a diretto contatto con l'elemento ad alto indice di rifrazione, nel caso di campioni liquidi bastano poche gocce, se invece il campione è solido va pressato sul cristallo al fine di minimizzare la presenza di aria che distorcerebbe il risultato. È fondamentale che il cristallo abbia indice di rifrazione maggiore del campione così che superando l'angolo critico si dà origine al fenomeno dell'onda evanescente che penetra nel campione per uno spessore di 0.5-2 μ m a seconda della lunghezza d'onda del fascio incidente, dell'angolo di incidenza e degli indici di rifrazione di campione e cristallo, poi dopo un numero di riflessioni che dipende dall'angolo di incidenza viene raccolto dal rivelatore posizionato direttamente a contatto con il cristallo.

Spettroscopia ottica di emissione al plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-OES)

La spettrometria ad emissione atomica accoppiata induttivamente al plasma d'argon (Inductively Coupled Plasma) con rivelatore ottico (Optic Emission Spectroscopy) è una tecnica utilizzata per la determinazione di elementi inorganici presenti in matrici diverse ed è attualmente una delle metodologie più frequentemente utilizzata nella determinazione dei metalli pesanti a concentrazioni dell'ordine dei μ g/L (ad esempio Cu, Zn, Pb, Al). Lo strumento è costituito da una torcia per ICP dove viene generato il plasma e introdotto il campione nebulizzato in argon, la parte ottica raccoglie e quantifica l'intensità luminosa emessa dagli elementi analizzati. Lo stato di plasma viene generato all'interno della torcia per scarica priva di elettrodi nel gas argon e viene mantenuto dall'energia accoppiata ad esso da parte di un generatore di radiofrequenza (27MHz). Si possono raggiungere temperature comprese tra i 6000-10000°C, condizione in cui tutti gli elementi presenti nel campione vengono eccitati. Quando gli elettroni tornano allo stato fondamentale, per via diretta o attraverso livelli energetici intermedi, avviene l'emissione di quanti di energia luminosa che genera uno spettro di emissione a diverse lunghezze d'onda. Ogni riga dello spettro corrisponde ad una particolare transizione elettronica e ogni elemento possiede un proprio spettro di emissione caratteristico, utile per un'analisi qualitativa. L'intensità di una riga spettrale dipende dalla probabilità della transizione e dal numero di atomi che sono in grado di effettuarla, in questo modo è possibile mettere in relazione l'intensità del segnale con la concentrazione dell'analita al fine di eseguire un'analisi quantitativa. Tutte le radiazioni emesse vengono raccolte da uno spettrometro che normalmente lavora nella regione compresa tra ultravioletto e vicino infrarosso (170-800nm).

Il campione viene prelevato tramite una pompa peristaltica e inviato in camera di nebulizzazione, lo spray ottenuto viene condotto in torcia grazie ad una corrente di argon carrier. La torcia, inserita all'interno delle spire che producono il campo magnetico, è costituita da tre tubi concentrici in materiale refrattario non conduttore (quarzo). L'argon che produce il plasma entra dal condotto più esterno tangenzialmente, l'argon che trasporta il campione giunge alla fiamma dal tubo più interno, la sezione intermedia contiene una corrente ausiliaria di argon.

Per la determinazione del rame nei test di biosorbimento si utilizza lo strumento Agilent Technologies 5100 ICP-OES con montato autocampionatore Agilent Technologies SPS 3.

3.6.2 Tecniche di caratterizzazione dei sistemi in fase granulata

La caratterizzazione dei prodotti post trattamento di Spray-Freeze-Drying prevede la determinazione dell'area superficiale tramite tecnica BET e la valutazione delle dimensioni dei granuli, la loro micro e nano struttura ed anche la distribuzione dei vari elementi all'interno del granulo tramite analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) e spettrometria a dispersione di energia (EDS). Un'ulteriore caratterizzazione di interesse per le proprietà fotocatalitiche è la misura del band gap.

Misura dell'area superficiale – Analisi BET

L'area superficiale specifica (SSA) è l'area complessiva della superficie delle particelle contenute nell'unità di massa dal campione ed è espressa in m^2/g . L'adsorbimento fisico e reversibile di un gas inerte come l'azoto è una delle tecniche più note ed utilizzate per la determinazione della SSA. Le molecole di N_2 tendono a formare un sottile strato adsorbito che ricopre la superficie, sulla base della teoria di Brunauer, Emmett e Teller (BET) si può determinare il numero di molecole necessarie a ricoprire con un monostato la polvere e ricavare il valore della superficie specifica. La misura si effettua sotto vuoto e la temperatura viene mantenuta a -196°C grazie ad un bagno di azoto liquido. È fondamentale sottolineare che l'adsorbimento di N_2 è di tipo fisico e che di conseguenza il campione risulta inalterato dall'analisi, rendendo la tecnica non distruttiva. Lo strumento utilizzato è il Termo Scientific Surfer che prima di svolgere l'analisi compie un pretrattamento termico sul campione al fine di eliminare eventuali tracce di umidità residua. Per questa attività di ricerca è stato messo a punto un pretrattamento ad hoc compatibile con la biomassa algale. Infatti, sono stati eseguiti test in stufa per simulare il comportamento di *C. Vulgaris* in temperatura ed è stato verificato che un pretrattamento

a 100°C per 2h è sufficiente a rimuovere l'umidità residua e non comporta danni evidenti alla struttura algale.

Microscopia elettronica a scansione ad emissione di campo (SEM-FEG)

Lo studio morfologico e la stima delle dimensioni dei granuli ottenuti tramite Spray-Freeze-Drying sono stati effettuati con microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo SEM-FEG Carl Zeiss Sigma NTS GmbH (Oberkochen, Germany). Lo strumento sfrutta un fascio di elettroni primari focalizzati che colpisce il campione. La sorgente è un monocristallo di tungsteno dal quale sono estratti elettroni per effetto di campo e poi accelerati da una differenza di potenziale variabile tra 0.1-30KeV, successivamente un sistema di lenti focalizza il fascio sul campione. Durante l'interazione tra il fascio primario e gli atomi costituenti il campione vengono emesse altre specie come elettroni secondari e retrodiffusi, che sono catturati da un rivelatore e convertiti in impulsi elettrici che vengono monitorati in tempo reale. Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo. Per ridurre l'interazione tra gli elettroni del fascio e le molecole di gas dell'atmosfera, si opera in alto vuoto all'interno della camera del microscopio ($P=10^{-4}$ - 10^{-5} mbar).

La fase di preparativa del campione prevede la deposizione di una piccola quantità di polvere su un adesivo al carbonio fissato ad un apposito stub di alluminio. Nel caso di sistemi conduttivi il campione è già pronto per l'analisi, in caso di sistemi isolanti o poco conduttivi è necessario ricoprire la polvere, tramite processo di sputtering, con un sottile strato metallico. Pertanto, i granulati prodotti sono stati rivestiti con uno strato di 5nm di oro, al fine di aumentare la conducibilità del sistema evitando accumuli di carica elettrostatica ed ottenendo in analisi immagini più nitide.

Analisi al microscopio elettronico a scansione con spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (SEM-EDS)

Alcuni dei campioni preparati per l'analisi al SEM-FEG sono stati analizzati anche al microscopio elettronico a scansione abbinato ad una sonda per la spettroscopia a raggi X a dispersione di energia. Questa analisi sfrutta i raggi X caratteristici dei singoli elementi prodotti dall'impatto tra il fascio di elettroni primari ed il campione in osservazione, in questo modo è possibile mappare il campione analizzato e verificare l'omogeneità della distribuzione dei vari elementi che lo costituiscono, relativamente ad un'area macroscopica della superficie o ad un punto specifico. Nel caso in questione si prendono i

singoli granuli e si valuta la distribuzione di titanio, carbonio e dove presenti silicio e ferro.

Il microscopio elettronico a scansione utilizzato è EVO 50 EP (LEO ZEISS) e come microsonda a dispersione di energia INCA ENERGY 350 dotata di un sistema INCASmartMap. Si sfrutta l'interazione tra un fascio di elettroni accelerati grazie ad un anodo posizionato vicino al filamento di tungsteno da cui sono emessi e il campione che viene colpito da tale fascio. La differenza di potenziale applicata al fine di accelerare gli elettroni è pari a 20kV ed il tempo di acquisizione dello spettro EDS è 60 secondi.

Misura dell'energia di band gap – Spettroscopia UV-Vis in riflettanza diffusa

La misura dell'energia di band gap dei materiali semiconduttori viene eseguita mediante spettroscopia ottica in riflettanza diffusa. Lo strumento utilizzato è Perkin Elmer Lambda 750 abbinato alla sfera integratrice per la misura in riflettanza diffusa Perkin Elmer 100nm Int. Sphere. Si vuole verificare se l'aggiunta di *C. Vulgaris* possa modificare il band gap della titania, in seguito si valuta anche l'influenza della magnetite e della silice. Il range di lunghezza d'onda analizzato è 800-250nm e la velocità di acquisizione è 1nm/s, lo strumento viene tarato misurando il bianco, costituito da una piastra di polvere di bario solfato (BaSO₄) che è il materiale che costituisce le pareti interne della sfera integratrice, perciò vi corrisponde un valore di riflettanza pari al 100%. Successivamente sono state analizzate le varie polveri compattate in un apposito portacampione.

Al fine di ricavare gli spettri con i valori di band gap espressi in elettronvolt, le curve di riflettanza in funzione della lunghezza d'onda sono state elaborate mediante l'equazione di Kubelka-Munk^[53], Eq. 2.6, e successivamente secondo il metodo grafico di Tauc. Kubelka-Munk consente di convertire gli spettri in riflettanza diffusa R in un valore funzione di essa α .

$$\alpha = \frac{(1 - R)^2}{2R} \quad (\text{Eq. 2.6})$$

La conversione del valore di lunghezza d'onda [nm] in energia del fascio luminoso [eV] avviene come riportato in Eq. 2.7 attraverso una costante e costituisce l'ascissa del grafico di Tauc.

$$h\nu = \frac{1239.7}{\lambda} \quad (\text{Eq. 2.7})$$

$$Y = (\alpha \cdot hv)^{\frac{1}{n}} \quad (Eq. 2.8)$$

Il risultato dell'Eq. 2.8 viene utilizzato come ordinata nel grafico di Tauc, dove n è un coefficiente caratteristico del materiale e correlato alla tipologia di transizione tra banda di valenza e banda di conduzione, che può essere diretta o indiretta. Per una transizione diretta n vale 0.5 mentre per una transizione indiretta n vale 2. È stato dimostrato sperimentalmente che per nanoparticelle di titania di dimensione inferiore a 10nm la transizione è di tipo diretto, mentre per nanoparticelle commerciali di dimensione superiore, come TiO₂ P25, la transizione è di tipo indiretto^[54]. Il valore corretto di band gap (E_g) viene estrapolato graficamente prolungando il tratto lineare della funzione fino all'intercetta con l'asse delle ascisse ($Y=0$), come riportato nell'esempio in *Figura 3.10*.

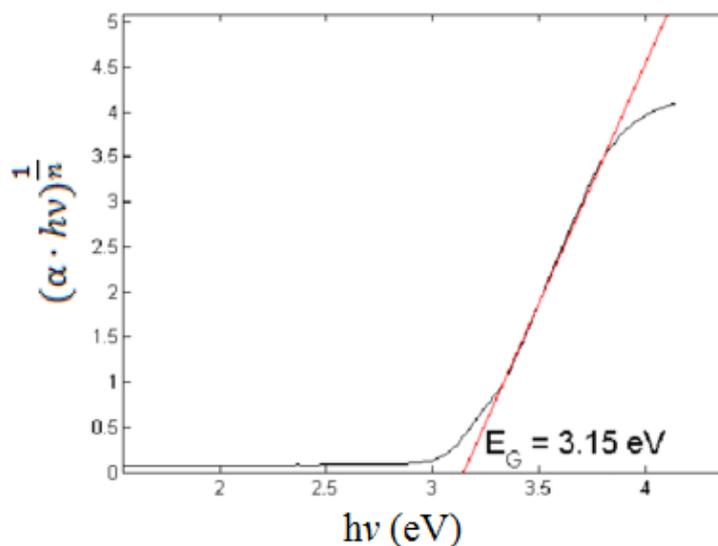


Figura 3.10 – Grafico di Tauc con estrapolazione del valore di energia di band gap

Capitolo 4 – Risultati e discussione

Questo lavoro di tesi ha avuto come finalità la preparazione e ingegnerizzazione di sistemi catalitici ibridi a base di nanoparticelle inorganiche e microalghe, da applicare nel settore della depurazione delle acque. Come già anticipato nel Capitolo 3, il processo si articola nei seguenti step:

- Preparazione e caratterizzazione delle sospensioni
- Preparazione e caratterizzazione dei granulati
- Caratterizzazione funzionale (test di biosorbimento di metalli, test fotocatalitico)

4.1 Caratterizzazione delle sospensioni

Il primo materiale preparato e caratterizzato è stata la biomassa. *C. Vulgaris* è stata studiata in due diverse forme:

- **Congelata**: sospensione di *C. Vulgaris* direttamente estratta dal fotobioreattore a concentrazioni comprese tra 0.1 e 0.8 g/L^[22] e poi congelata (*Figura 4.1*)
- **Liofilizzata**: polvere di *C. Vulgaris* liofilizzata a partire dalla biomassa concentrata (*Figura 4.2*)

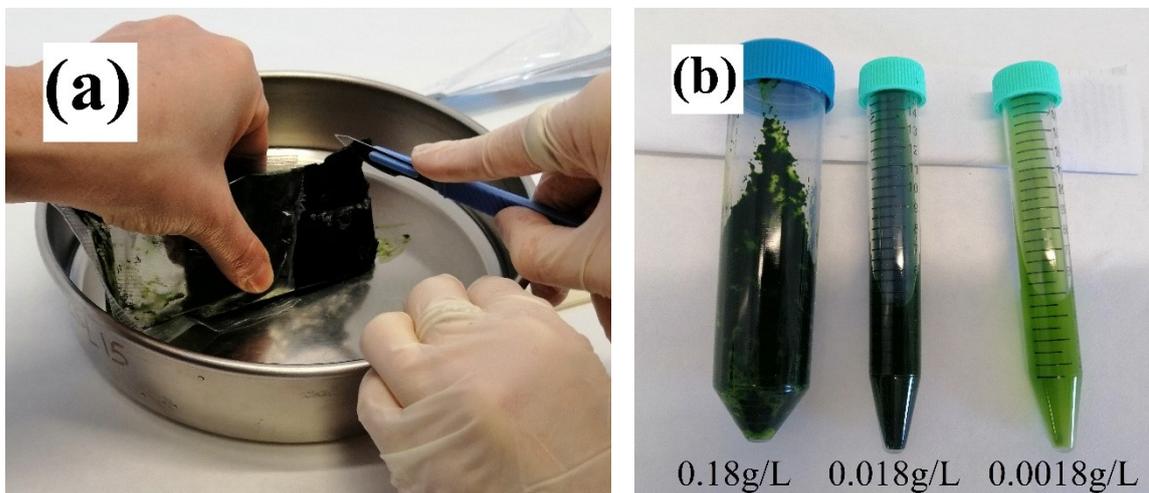


Figura 4.1 – Immagini di C. Vulgaris: (a) stock di alga fresca congelata 0.18g/L, (b) alga congelata post scongelamento a concentrazione di stock 0.18g/L e successivamente diluita 10 e 100 volte



Figura 4.2 – Polvere di *C. Vulgaris* liofilizzata

In particolare, *C. Vulgaris* è stata sottoposta a microscopia ottica, spettroscopia UV-Vis e FT-IR ATR per verificare rispettivamente il diametro cellulare, la presenza dei picchi di assorbimento della clorofilla-A nella regione del visibile e l'assorbimento dei gruppi funzionali presenti sulla parete cellulare algale nella regione dell'infrarosso. Segue lo studio delle proprietà colloidali (potenziale Zeta e diametro idrodinamico) delle sospensioni preparate.

4.1.1 Caratterizzazione di *C. Vulgaris*

Analisi morfologica al microscopio – La sospensione di *C. Vulgaris* fresca congelata a concentrazione 0.18g/L mostra un diametro cellulare di $3.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$, misurato tramite microscopia ottica (Figura 4.3-d), è un dato concorde con quanto disponibile in letteratura, dove si attestano valori tra $2\text{-}10 \mu\text{m}$ ^[22] e più comunemente tra $3\text{-}6 \mu\text{m}$ ^[55]. Le foto consentono inoltre di osservare la forte colorazione verde dovuta all'elevato contenuto di clorofilla presente in *C. Vulgaris*. Infatti, le specie facenti parte del genere *Chlorella* sono caratterizzate da uno dei più alti contenuti in clorofilla fra le microalghe. L'immagine in Figura 4.4, evidenzia per il campione TCV0.06 cong, una elevata omogeneità di distribuzione tra le fasi miscelate: *C. Vulgaris* e titanina. La distribuzione dell'alga risulta essere uniforme con alcune regioni a più alta concentrazione dovute alla formazione di aggregati pluricellulari. La dispersione di *C. Vulgaris* ad opera della fase inorganica potrebbe essere promettente nell'ottica dell'utilizzo per la rimediazione di reflui, in quanto consente di incrementare la superficie di parete cellulare esposta aumentando i siti disponibili per lo scambio con i metalli pesanti.

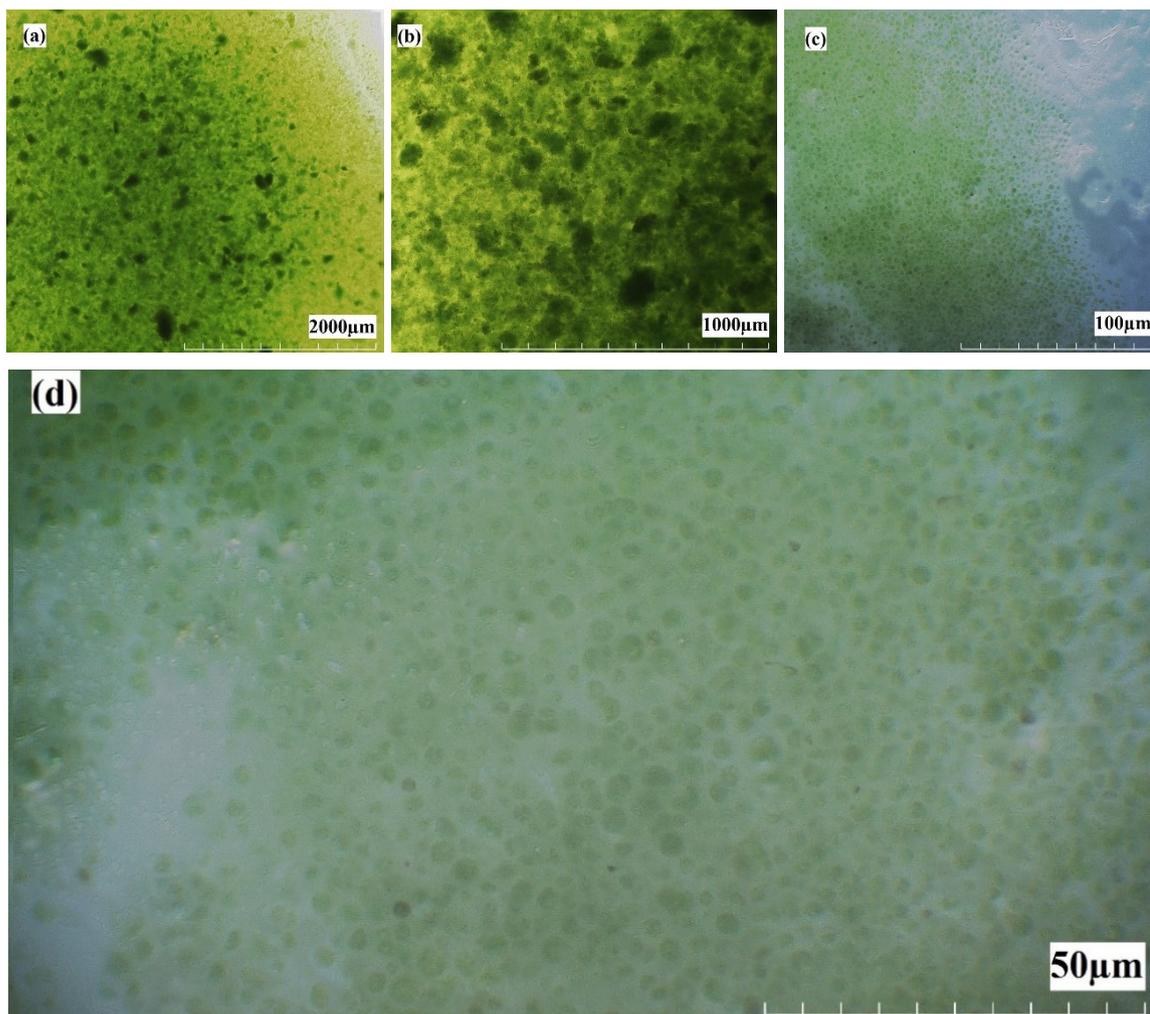


Figura 4.3 – Immagini a microscopio ottico della sospensione di *C. Vulgaris congelata*

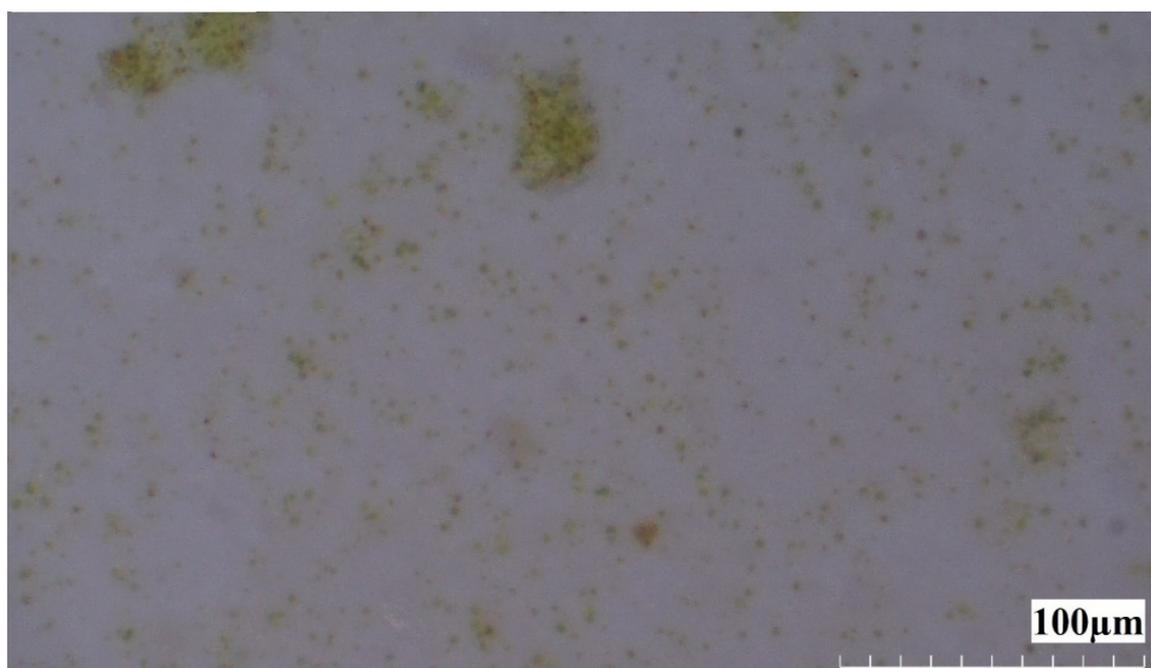


Figura 4.4 – Immagine a microscopio ottico del campione TCV0.06 cong

Per *C. Vulgaris* liofilizzata si riportano le immagini acquisite mediante microscopio elettronico SEM-FEG (Figura 4.5).

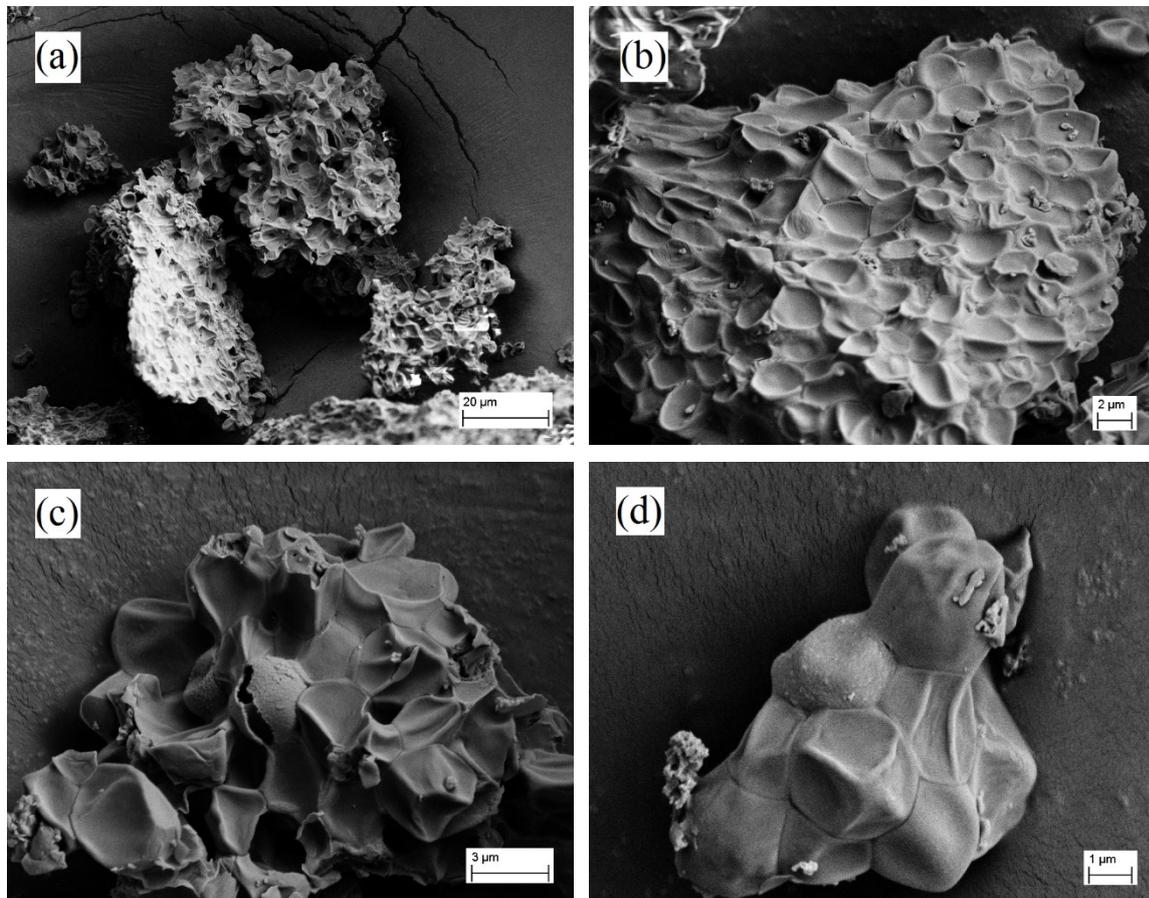


Figura 4.5 – Immagini degli aggregati di *C. Vulgaris* liofilizzata

La biomassa liofilizzata è costituita da aggregati pluricellulari con dimensione fino a decine di micrometri, questa coagulazione porta ad un calo di area superficiale (vedi analisi BET pag. 79). Avendo meno parete cellulare disponibile per il biosorbimento è possibile prevedere un calo di performance rispetto alla biomassa fresca congelata. La morfologia degli aggregati è variabile e le singole unità cellulari sono disidratate, quindi non si presentano con la classica forma sferoidale di *C. Vulgaris*, osservata al microscopio ottico per l'alga fresca. I coaguli appaiono particolarmente compatti e ciò giustifica la mancata dispersione in acqua che si è osservata durante i test.

Analisi FT-IR ATR – La caratterizzazione FT-IR ATR si è focalizzata nella regione 1800-900 cm^{-1} tipica dei moti vibrazionali dei gruppi funzionali presenti sulla parete cellulare algale. L'obiettivo è quello di verificare qualitativamente quanto la presenza della fase inorganica influenzi i gruppi funzionali della biomassa. Occorre sottolineare che in

termini di concentrazione in peso la titania è sempre in abbondante eccesso rispetto a *C. Vulgaris*.

Di seguito in *Tabella 4.1* vengono riportati i principali gruppi funzionali responsabili del biosorbimento di metalli pesanti^[19].

Tabella 4.1 – Principali gruppi funzionali responsabili del biosorbimento di metalli pesanti da parte di C. Vulgaris

| Binding group | Structural formula | pK _a | HSAB classif. | Ligand atom | Occurrence in selected biomolecules |
|--------------------|--|-----------------|---------------|-------------|-------------------------------------|
| Hydroxyl | -OH | 9.5-13 | Hard | O | PS, UA, SPS, AA |
| Carbonyl (ketone) | >C=O | - | Hard | O | Peptide bond |
| Carboxyl | $\begin{array}{c} \text{-C=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ | 1.7-4.7 | Hard | O | UA, AA |
| Sulfhydryl (thiol) | -SH | 8.3-10.8 | Soft | S | AA |
| Sulfonate | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-S=O} \\ \\ \text{O} \end{array}$ | 1.3 | Hard | O | SPS |
| Thioether | >S | - | Soft | S | AA |
| Amine | -NH ₂ | 8-11 | Int. | N | Cto, AA |
| Secondary amine | >NH | 13 | Int | N | Cti, PG, peptide bond |
| Amide | $\begin{array}{c} \text{-C=O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ | - | Int | N | AA |
| Imine | =NH | 11.6-12.6 | Int | N | AA |
| Imidazole | $\begin{array}{c} \text{-C-N-H} \\ \quad \\ \text{H-C-N} \end{array}$ | 6.0 | Soft | N | AA |
| Phosphonate | $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{-P=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ | 0.9-2.1 | Hard | O | PL |
| Phosphodiester | $\begin{array}{c} >\text{P=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ | 6.1-6.8 | Hard | O | TA, LPS |
| | | 1.5 | Hard | O | TA, LPS |

PS = polysaccharides; UA = uronic acids; SPS = sulfated PS; Cto = chitosan; PG = peptidoglycan; AA = amino acids; TA = teichoic acid; PL = phospholipids; LPS = lipoPS.

In *Tabella 4.1* è riportato il valore di pK_a dei gruppi funzionali presi in considerazione. A valori di pH superiori al pK_a la funzionalità si trova in forma dissociata ed è proprio in tali condizioni che è massima la capacità di assorbire metalli pesanti, il catione metallico prende il posto dello ione H⁺ liberato in soluzione, compensando la carica negativa rimasta sulla superficie cellulare^[2,17]. A seconda del pH di lavoro ci si può trovare sopra o sotto i vari pK_a, è perciò importante selezionare opportunamente le condizioni operative. I risultati ottenuti dall'analisi FT-IR ATR sulla sospensione di *C. Vulgaris* fresca congelata 0.18g/L e sul campione TCV0.06 cong sono riportati in *Figura 4.6*.

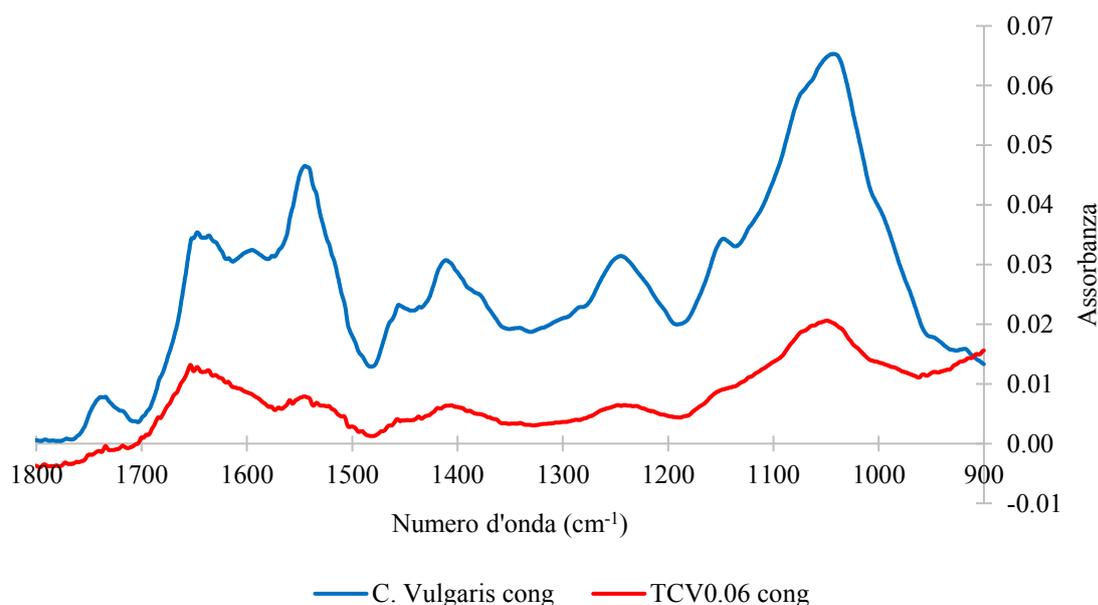


Figura 4.6 – Spettri FT-IR ATR dei campioni *C. Vulgaris* congelata e TCV0.06 cong

Lo spettro della sola alga è in accordo con i dati riportati in letteratura^[56] salvo qualche differenza in termini di intensità relativa dei picchi. La regione 1800-1500 cm^{-1} è dominata dall'assorbimento dello scheletro peptidico, i picchi a 1455 cm^{-1} e 1390 cm^{-1} possono essere assegnati comunemente alle vibrazioni CH_2/CH_3 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$, $\text{N}-\text{H}$ principalmente appartenenti alle strutture proteiche che rappresentano una componente significativa della parete cellulare. Si osserva inoltre un doppio picco a 1079-1038 cm^{-1} probabilmente imputabile alla vibrazione di stretching $\text{C}-\text{O}$ della funzionalità alcolica dei carboidrati, uno dei componenti principali della parete cellulare delle alghe verdi. Altri picchi comuni nelle alghe verdi cadono a 1623 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ stretching), 1548 cm^{-1} ($\text{C}-\text{N}$ stretching, deformazione $\text{N}-\text{H}$), 1243 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$ stretching nei fenoli). Una volta che *C. Vulgaris* viene miscelata con titania si nota un netto calo dell'intensità dei picchi di assorbimento, dovuto alla diminuzione della concentrazione di microalga che viene diluita 10 volte nel campione TCV0.06 cong rispetto alla sospensione di sola alga congelata. Tuttavia, i picchi rilevati nel campione ibrido sono ben distinguibili, e consistenti con quelli della sola biomassa.

Analisi UV-Vis – Al fine di verificare l'impatto che l'esposizione ad una intensa radiazione luminosa UV ha sulla struttura della biomassa di *C. Vulgaris* sono state effettuate misure FT-IR ATR prima e dopo l'esposizione per 60 minuti alla radiazione emessa dalla lampada utilizzata per i test fotocatalitici. Sono state testate una sospensione contenente solo *C. Vulgaris* fresca congelata e una a base di *C. Vulgaris* liofilizzata e

TiO₂ (TCV9 liof). I risultati evidenziati in *Figura 4.7* mostrano picchi invariati e sovrapponibili dopo esposizione alla luce, dimostrando che la radiazione UV non altera la struttura molecolare della biomassa anche in presenza di TiO₂.

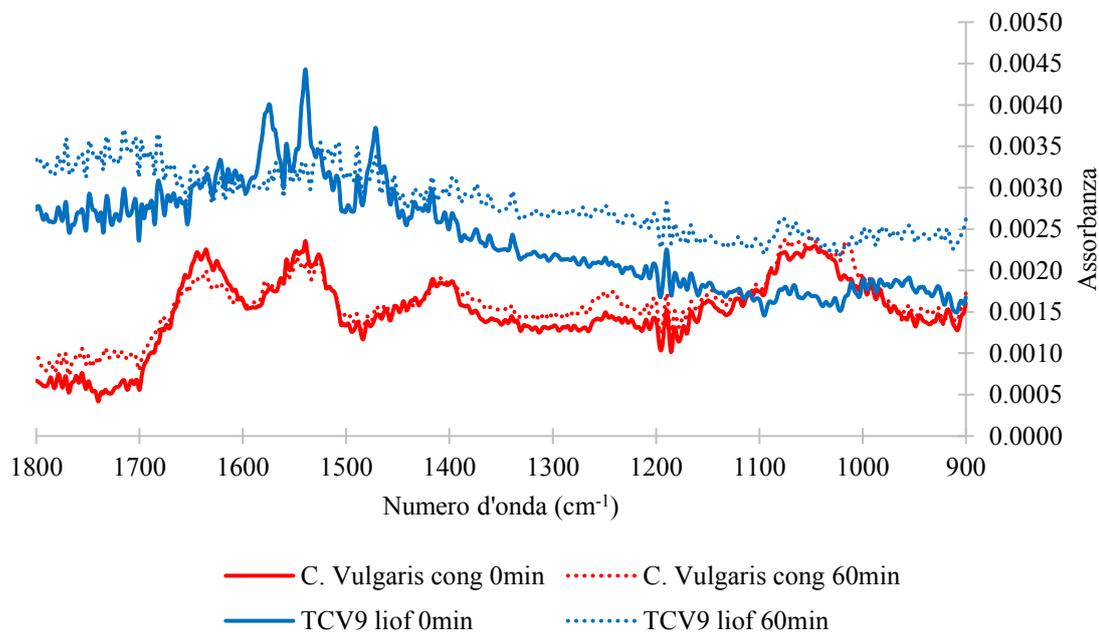


Figura 4.7 – Spettri FT-IR ATR prima e dopo 60 minuti di irraggiamento UV sui campioni C. Vulgaris congelata e TCV liof

La studio UV-Vis è stato eseguito sui campioni *C. Vulgaris* congelata e TCV0.06 cong., gli spettri di assorbimento registrati sono riportati in *Figura 4.8*. In accordo con la letteratura^[57], nel campione di biomassa si distinguono i picchi tipici di *C. Vulgaris* posizionati a 680nm e 440nm, riconducibili all'assorbimento della porzione rossa e blu dello spettro visibile e caratteristici dell'anello porfirinico della clorofilla. Sebbene, la presenza di titania innalzi la linea di base lungo il range del visibile e incrementi l'assorbimento nella regione del vicino ultravioletto, è possibile distinguere anche nel campione misto i due tipici picchi di *C. Vulgaris*.

Dopo le analisi preliminari FT-IR ATR e UV-Vis è possibile affermare che le due componenti principali dei sistemi in produzione, biomassa algale e nanoparticelle di titania, possono convivere senza riportare danni alla struttura di *C. Vulgaris*.

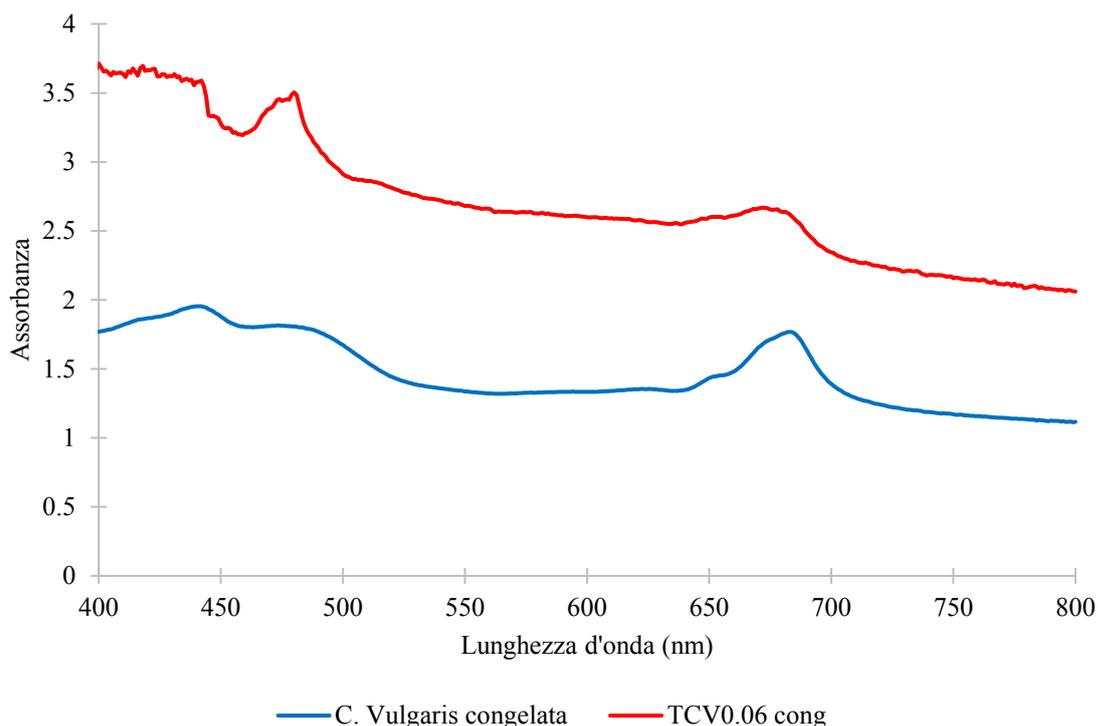


Figura 4.8 – Spettri di assorbimento UV-Vis di *C. Vulgaris congelata* e TCV0.06 cong

4.1.2 Sistemi TiO₂/*C. Vulgaris*: effetto del tipo di biomassa (congelata/liofilizzata)

L'analisi del diametro idrodinamico mediante DLS su questi campioni fornisce in generale misure con un ampio errore associato, dovuto principalmente alla presenza della componente micrometrica (microalga) che supera il range dimensionale ottimale dello strumento. Tuttavia, i risultati permettono di effettuare alcuni confronti tra i campioni in sospensione, rispetto allo stato di aggregazione. In aggiunta, lo studio del potenziale Zeta dei precursori e dei campioni prodotti è fondamentale per meglio investigare la stabilità colloidale dei sistemi e le cariche superficiali, identificando eventuali interazioni di natura elettrostatica tra biomassa e fase inorganica al pH di lavoro, che sono alla base del processo di eterocoagulazione. Tali interazioni sono importanti ai fini della successiva granulazione per assicurare la massima omogeneità di composizione della polvere.

In *Tabella 4.2* sono riportati i dati di diametro idrodinamico e di potenziale Zeta puntuale, misurati ai pH naturali per le materie prime e per i campioni misti biomassa/TiO₂.

Tabella 4.2 – Valori di pH, potenziale Zeta e diametro idrodinamico dei singoli componenti e dei campioni misti *C. Vulgaris*/TiO₂

| Campione | Conc. <i>C. Vulgaris</i> (%wt) | pH | Potenziale Zeta (mV) | Diametro idrodinamico (nm) |
|-------------------------|---|-----------|---------------------------------------|---|
| <i>C. Vulgaris</i> cong | 100 | 6.1 | -30±1 | 3690±60 |
| <i>C. Vulgaris</i> liof | 100 | 6.5 | -23±1 | 18000±6000 |
| TiO ₂ | 0 | 5.6 | +28.5±0.4 | 480±40 |
| TCV0.06 cong | 0.06 | 6.0 | -25.3±0.5 | 1700±200 |
| TCV0.06 liof | 0.06 | 5.6 | +10±0.4 | 426±4 |

Il diametro cellulare di *C. Vulgaris* fresca congelata misurato tramite DLS risulta essere intorno a 3.7µm ed è concorde con quanto determinato dalle immagini al microscopio ottico (3.8µm). Nel caso della biomassa liofilizzata, a causa della formazione di aggregati pluricellulari in fase di liofilizzazione, si raggiungono diametri medi molto superiori, pari a circa 18µm. I valori di potenziale Zeta puntuale sono negativi per entrambe le forme, in accordo con la natura dei gruppi funzionali superficiali, con un valore assoluto più basso per la forma liofilizzata (-23mV contro -30mV) che è in linea con il corrispondente stato più aggregato.

Come atteso, anche il diametro idrodinamico della TiO₂ P25 risulta maggiorato di un ordine di grandezza rispetto alle dimensioni delle particelle primarie osservate al microscopio elettronico, poiché è tipico delle nanopolveri ossidiche trovarsi in forma aggregata. Il potenziale Zeta positivo pari a +29mV e il pH naturale dell'ossido sono in linea con la letteratura^[36].

Dal punto di vista dimensionale i campioni compositi biomassa/TiO₂, evidenziano una netta differenza tra la presenza di alga in forma congelata o liofilizzata, consistente con il comportamento osservato anche dalle misure di potenziale Zeta e dalle curve di titolazione potenziale Zeta/pH. In particolare, a parità di concentrazione di alga TCV0.06 cong mostra un diametro idrodinamico di 1.7µm, estremamente influenzato dalla presenza dell'alga nonostante la sua bassa concentrazione in peso (Figura 4.9), mentre il campione TCV0.06 liof mostra al contrario un diametro comparabile a quello della titania, probabilmente dovuto ad una massiccia precipitazione dell'alga, evidenziando in maniera indiretta la non interazione tra le fasi in presenza di biomassa liofilizzata (Figura 4.10).

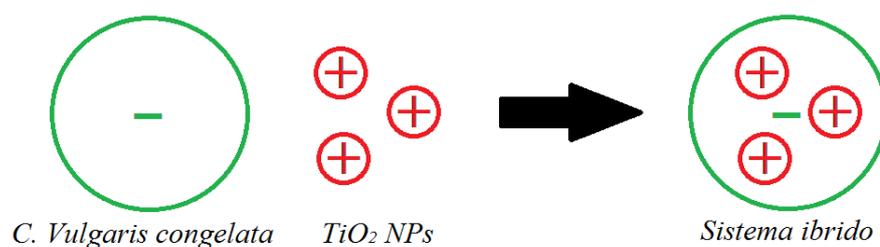


Figura 4.9 – Schema dell'interazione in sospensione tra *C. Vulgaris* fresca congelata e nanoparticelle di TiO_2

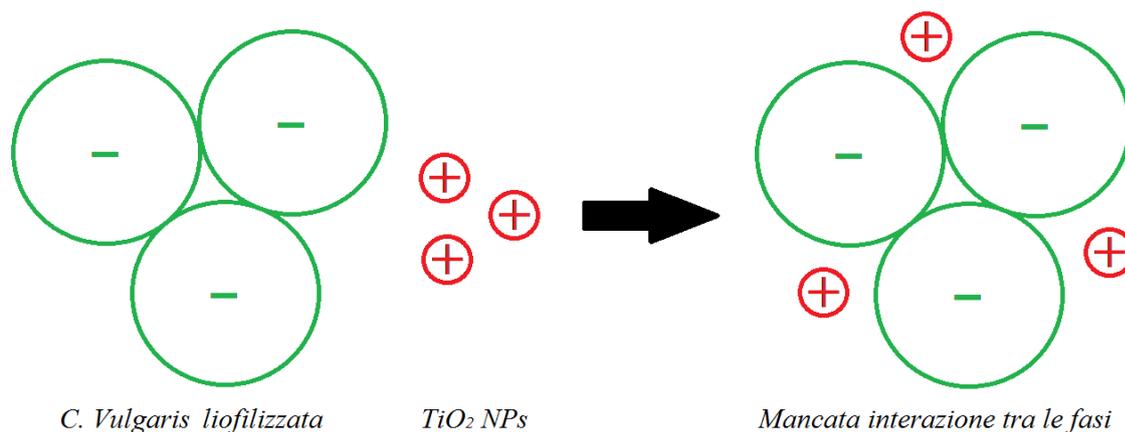


Figura 4.10 – Schema della mancata interazione in sospensione tra *C. Vulgaris* liofilizzata in sospensione e nanoparticelle di TiO_2

I potenziali Zeta osservati per questi due campioni confermano un'elevata influenza di *C. Vulgaris* congelata sulla carica superficiale della miscela, infatti è sufficiente lo 0.06%wt di biomassa per spostare massicciamente il potenziale Zeta a valori negativi (-25mV) molto simili a quella della sola microalga. In contrasto, il comportamento del campione contenente *C. Vulgaris* liofilizzata mostra un potenziale Zeta di +10mV, leggermente abbassato rispetto alla sola TiO_2 per la presenza della biomassa, ma ancora positivo.

Le curve di titolazione potenziale Zeta/pH forniscono i punti isoelettrici delle sospensioni, oltre ad una più ampia visione dell'andamento della carica superficiale al variare del pH. In *Figura 4.11* sono riportate le curve ottenute dalla titolazione del campione TCV0.06 cong e dei suoi componenti analizzati singolarmente, ovvero *C. Vulgaris* in forma congelata e TiO_2 . La sola biomassa fresca congelata possiede punto isoelettrico posizionato a 1.4 unità di pH, questo risultato è di poco inferiore al valore riportato in letteratura^[51] per *C. Vulgaris* (circa 2), ma trattandosi di biomassa il dato dipende dai sistemi di coltivazione e dall'alimentazione del fotobioreattore^[2]. La curva di titolazione potenziale Zeta/pH dell'alga mostra un potenziale negativo lungo tutto

l'intervallo di pH esplorato. Il potenziale Zeta negativo dell'alga è associato ad una carica superficiale negativa che aumenta in valore assoluto per valori di pH più elevati, comportamento in linea con la presenza dei gruppi funzionali superficiali in forma dissociata. Il punto isoelettrico della titania è posizionato a pH 6.5, a pH inferiori il potenziale risulta positivo, fino a raggiungere +30mV, mentre diventa negativo per pH superiori, raggiungendo un potenziale di -40mV. I sistemi ibridi $TiO_2/C.Vulgaris$ mostrano un pH naturale di circa 6, che corrisponde ad un range dove *C. Vulgaris* ha già raggiunto il plateau di potenziale negativo, mentre la titania è ancora positiva (circa +10mV).

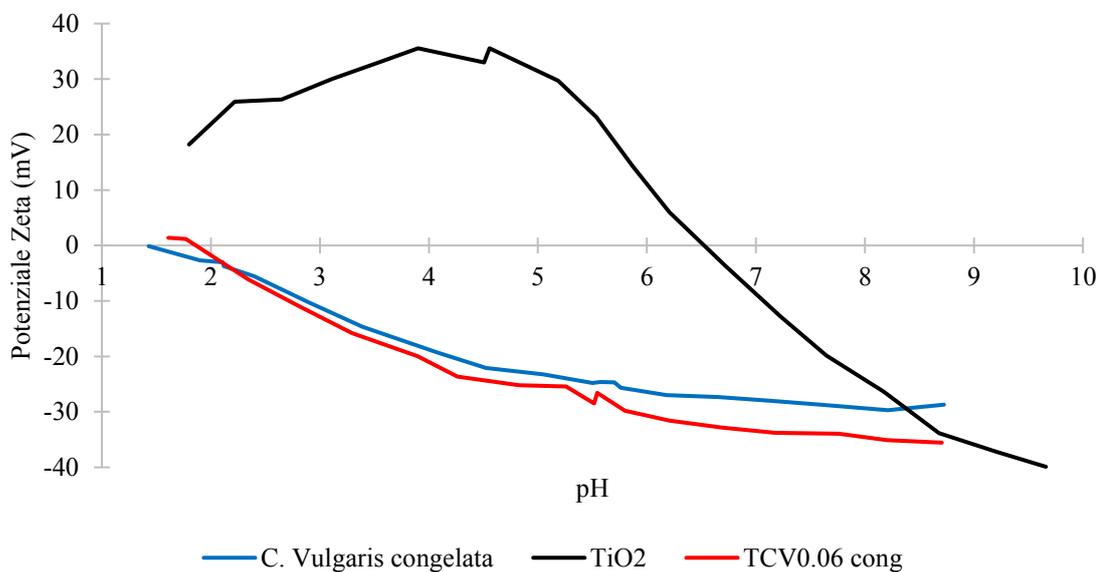


Figura 4.11 – Titolazione potenziale Zeta/pH di *C. Vulgaris congelata*, TiO_2 e TCV0.06 cong

Pertanto, con l'obiettivo di creare materiali compositi o ibridi e massimizzare l'interazione tra biomassa e nanoparticelle inorganiche, è stato possibile utilizzare un approccio self-assembly di eterocoagulazione colloidale che sfrutta l'interazione di natura elettrostatica tra le particelle di carica opposta. La curva potenziale Zeta/pH del sistema misto a base di *C. Vulgaris* fresca congelata (TCV0.06 cong) evidenzia l'andamento tipico della sola alga, nonostante la presenza di biomassa sia molto bassa e pari allo 0.06%wt. Si può ipotizzare, infatti, che la quantità di *C. Vulgaris* aggiunta sia sufficiente per conferire al sistema le proprietà superficiali dell'alga e rivestire la titania. In realtà, sebbene solitamente secondo gli approcci di self-assembly è la particella più piccola che tende a rivestire quella di dimensioni maggiori, in questo caso è la microalga, di diametro maggiore a determinare il potenziale Zeta del campione e a ricoprire la

titania, probabilmente inglobando le nanoparticelle inorganiche. Il comportamento osservato indica un'intima interazione tra *C. Vulgaris* e TiO_2 , tale da poter considerare il sistema prodotto come un sistema ibrido: organico/inorganico.

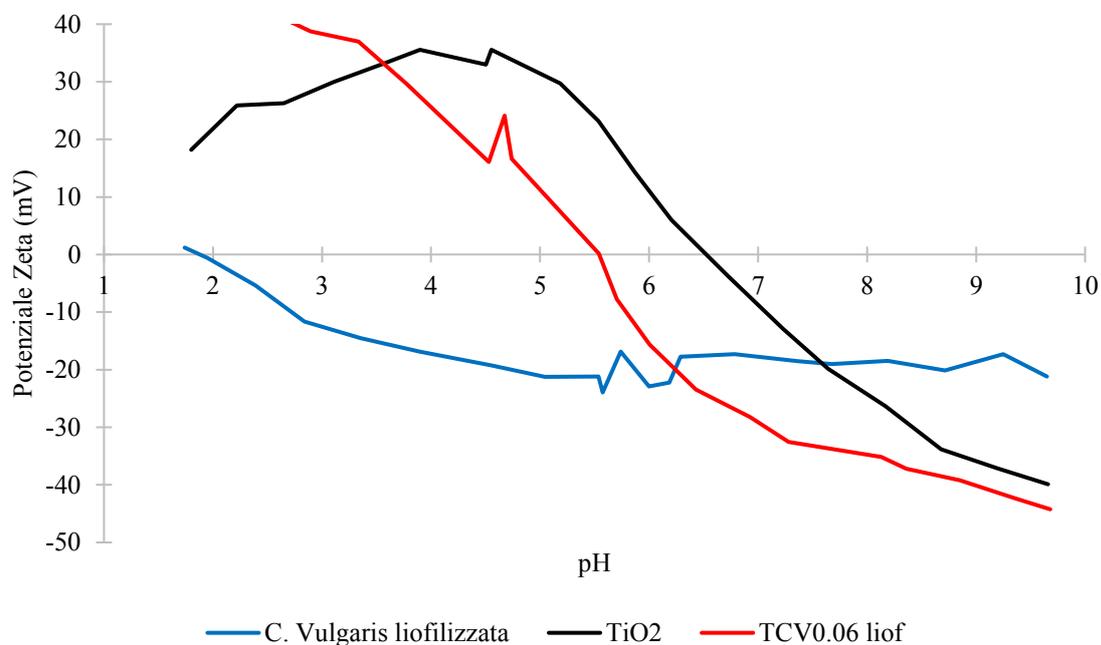


Figura 4.12 – Titolazione potenziale Zeta/pH di *C. Vulgaris* liofilizzata, TiO_2 e TCV0.06 liof

Nel caso in cui si utilizzi la biomassa in forma liofilizzata, che si presenta come una polvere micro e macro aggregata è difficile ottenere una dispersione omogenea dell'alga nella matrice di titania. La Figura 4.12 mostra, come in questo caso la curva potenziale Zeta/pH del campione TCV0.06 liof appaia molto simile a quella della sola titania (punto isoelettrico a pH 5.5), nonostante il contenuto in peso sia lo stesso impiegato per il campione con biomassa congelata. È evidente che la biomassa in forma liofilizzata sia meno superficialmente esposta perché aggregata e meno reattiva di quella fresca. Pertanto, sulla base di tali risultati si escludono fenomeni di ricoprimento superficiale o inglobamento tra biomassa e fase inorganica.

4.1.3 Studio dell'incremento di concentrazione di *C. Vulgaris*

Sono state esplorate diverse concentrazioni di biomassa, la Tabella 4.3 mostra i campioni preparati e le concentrazioni corrispondenti.

C. Vulgaris in forma liofilizzata ha consentito di incrementare il contenuto in peso di biomassa più agevolmente, fino a raggiungere il 9%wt rispetto al solido totale sospeso, in

quanto è sufficiente preparare una sospensione più concentrata. Invece, per il prodotto congelato, estratto in forma di sospensione dal bioreattore, si è vincolati dalla concentrazione della materia prima e si è arrivati al 6%wt.

Tabella 4.3 – Valori di pH, potenziale Zeta e diametro idrodinamico dei singoli componenti e dei sistemi misti titania/*C. Vulgaris* congelata

| Campione | Conc. <i>C. Vulgaris</i> (%wt) | pH | Potenziale Zeta (mV) | Diametro idrodinamico (nm) |
|-------------------------|---|-----------|---------------------------------------|---|
| <i>C. Vulgaris</i> cong | 100 | 6.1 | -30±1 | 3690±60 |
| TiO ₂ | 0 | 5.6 | +28.5±0.4 | 480±40 |
| TCV0.01 cong | 0.01 | 6.0 | -26.9±0.3 | 4500±100 |
| TCV0.06 cong | 0.06 | 6.0 | -25.3±0.5 | 1700±200 |
| TCV0.6 cong | 0.6 | 5.8 | -31.1±0.9 | 1200±300 |
| TCV6 cong | 6 | 6.5 | -29.3±0.9 | 1400±100 |

Come previsto, i campioni con *C. Vulgaris* fresca congelata hanno diametro inferiore a quello dell'alga perché viene mediato con la titania, e si distribuiscono intorno a 1.5µm, indipendentemente dall'aumento di concentrazione. Vi è un'eccezione per il campione TCV0.01 cong a 4.5µm, è il campione a più basso contenuto di alga ed è quello che mostra dimensioni maggiori, vi è la possibilità che la lettura di un macroaggregato abbia reso la misura più elevata. I potenziali Zeta misurati sui campioni con biomassa fresca congelata si confermano negativi già a basso contenuto di alga (0.01-0.06%wt), con un leggero aumento in valore assoluto tra -25mV e -31mV per concentrazioni maggiori (0.6-6%wt), in generale questi campioni tendono ad assumere proprietà paragonabili a quelle della sospensione di microalga che tipicamente raggiunge un plateau circa a -30mV.

Tabella 4.4 – Valori di pH, potenziale Zeta e diametro idrodinamico dei singoli componenti e dei sistemi misti titania/*C. Vulgaris* liofilizzata

| Campione | Conc. <i>C. Vulgaris</i> (%wt) | pH | Potenziale Zeta (mV) | Diametro idrodinamico (nm) |
|-------------------------|---|-----------|---------------------------------------|---|
| <i>C. Vulgaris</i> liof | 100 | 6.5 | -23±1 | 18000±6000 |
| TiO ₂ | 0 | 5.6 | +28.5±0.4 | 480±40 |
| TCV0.06 liof | 0.06 | 5.6 | +10±0.4 | 426±4 |
| TCV9 liof | 9 | 6.1 | -20.4±0.2 | 3400±300 |

Nel caso dell'aumento di concentrazione di *C. Vulgaris* liofilizzata si assiste ad un aumento del diametro idrodinamico medio, intorno ai 3 μ m, valore mediato dalla presenza dei macroaggregati tipici della forma liofilizzata. Come già osservato dalle curve di titolazione, il potenziale Zeta dei sistemi con *C. Vulgaris* liofilizzata sembra rispecchiare la media delle due fasi in sospensione, senza fenomeni di ricoprimento o interazione superficiale tra i componenti. Solo aumentando la concentrazione di biomassa fino al 9%wt (TCV9 liof) si osserva un potenziale Zeta negativo di -20mV, tipico dell'alga.

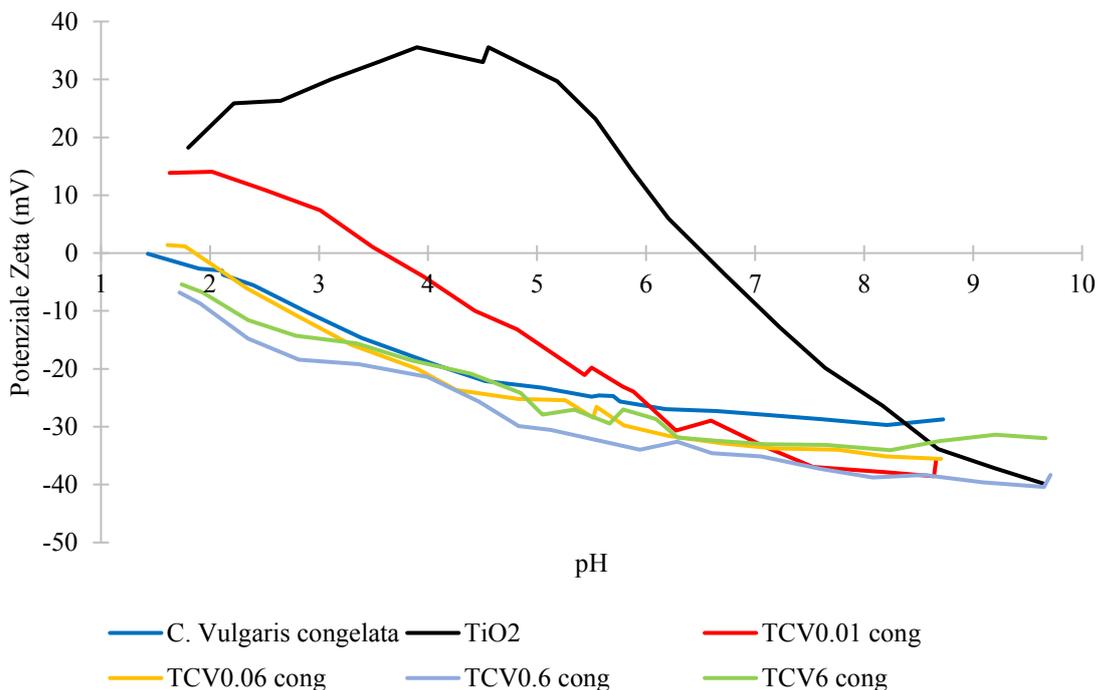


Figura 4.13 – Titolazione potenziale Zeta/pH di *C. Vulgaris* congelata, TiO₂ e dei sistemi misti titania/*C. Vulgaris* congelata: TCV0.01 cong, TCV0.06 cong, TCV0.6 cong e TCV6 cong

Dalle curve si osserva l'effetto della concentrazione di biomassa fresca congelata sul ricoprimento della fase inorganica. Infatti, il campione TCV0.01 cong che ha il contenuto di alga inferiore (0.01%wt) mostra solo un parziale ricoprimento della fase inorganica, con uno shift del punto isoelettrico da 6.5 a 3.6, ma mostrando per bassi pH una curva traslata verso valori di potenziale positivo. Come già evidenziato, per il campione TCV0.06 cong, con una concentrazione di biomassa pari allo 0.06%wt, si osserva il ricoprimento totale di TiO₂ mediante la completa sovrapposizione della curva a quella della sola alga e spostamento del punto isoelettrico a pH < 2. A concentrazione di biomassa fresca crescente, TCV0.6 cong e TCV6 cong si conferma il ricoprimento della

fase inorganica, come provato dagli andamenti delle curve sovrapponibili a quelli di *C. Vulgaris* congelata e al campione TCV0.06 cong.

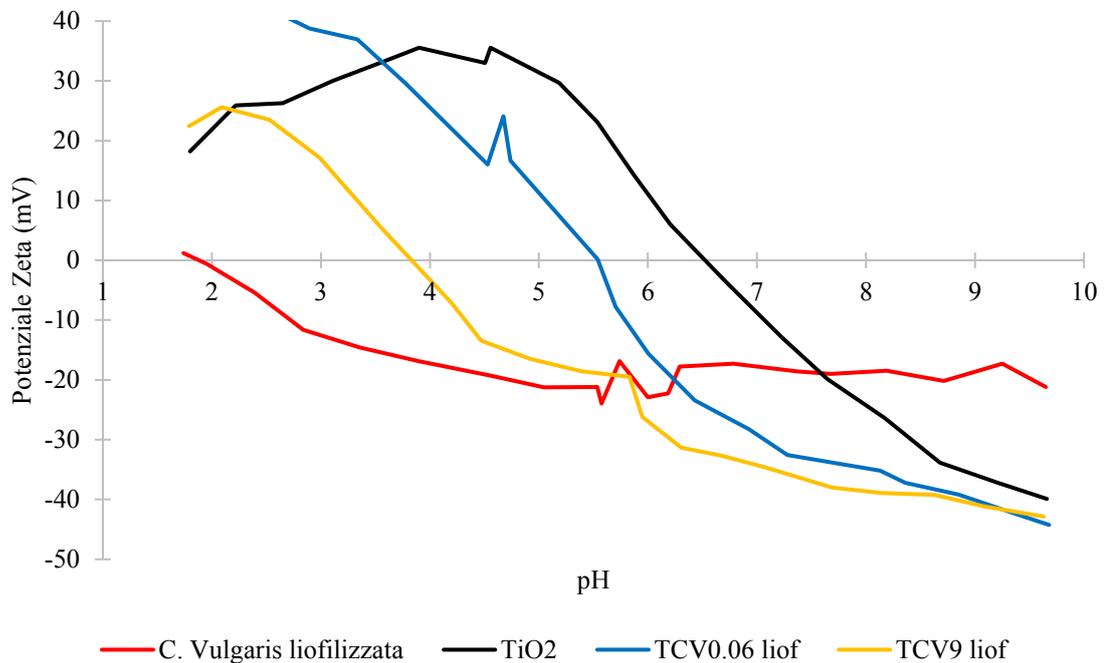


Figura 4.14 – Titolazione potenziale Zeta/pH di *C. Vulgaris* liofilizzata, TiO_2 e dei sistemi misti titania/*C. Vulgaris* liofilizzata: TCV0.06 liof e TCV9 liof

In presenza di *C. Vulgaris* liofilizzata le curve raccolte mostrano uno shift verso potenziali negativi proporzionale alla quantità di alga aggiunta, ma senza raggiungere la completa sovrapposizione alla curva dell'alga. Nonostante il considerevole aumento di concentrazione di biomassa raggiunto nel campione TCV9 liof (pari al 9%wt) esso mostra valori di potenziale più positivi nel primo tratto della curva rispetto all'andamento della sola biomassa liofilizzata.

Questi risultati suggeriscono che solo i campioni con biomassa fresca congelata sembrano interagire con la parte inorganica, ricoprendola già a concentrazioni dello 0.06%wt e potrebbero essere più promettenti nell'applicazione di biosorbimento di metalli pesanti poiché in grado di esporre una superficie di parete cellulare maggiore.

4.1.4 Campioni a tre componenti

Nell'ottica di preparare fotocatalizzatori impiegabili nel trattamento delle acque reflue si è proceduto con la preparazione di campioni a tre componenti, inserendo nei sistemi *C. Vulgaris*/titania, rispettivamente nanoparticelle di silice (SiO_2) e di magnetite (Fe_3O_4)

con l'obiettivo di implementare le funzionalità dei fotocatalizzatori. In particolare, la silice è stata selezionata per la capacità di migliorare le performance fotocatalitiche della TiO_2 , mentre la magnetite per conferire proprietà magnetiche al sistema utili per una eventuale rimozione magnetica del fotocatalizzatore.

4.1.4.1 Addizione di SiO_2 nanoparticellare

I campioni con silice sono stati prodotti solo con alga congelata, in quanto è la più promettente tra le forme disponibili, il contenuto di *C. Vulgaris* utilizzato è identico ai corrispettivi campioni preparati senza silice, la differenza sta nella componente inorganica che è ripartita tra i due ossidi ($\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$).

Tabella 4.5 – Valori di pH, potenziale Zeta e diametro idrodinamico dei singoli componenti, dei sistemi misti titania/silice/*C. Vulgaris* congelata e a confronto i corrispettivi sistemi titania/*C. Vulgaris*

| Campione | Conc. (%wt) | | | pH | Potenziale Zeta (mV) | Diametro idrodinamico (nm) |
|-------------------------|-------------|------------------|------------------|-----|----------------------|----------------------------|
| | Alga | TiO ₂ | SiO ₂ | | | |
| <i>C. Vulgaris</i> cong | 100 | 0 | 0 | 6.1 | -30±1 | 3690±60 |
| TiO ₂ | 0 | 100 | 0 | 5.6 | +28.5±0.4 | 480±40 |
| SiO ₂ | 0 | 0 | 100 | 4.0 | -29.6±0.3 | 14±1 |
| TCV0.01 cong | 0.01 | 99.99 | 0 | 6.0 | -26.9±0.3 | 4500±100 |
| TCV0.06 cong | 0.06 | 99.94 | 0 | 6.0 | -25.3±0.5 | 1700±200 |
| TSCV0.01 cong | 0.01 | 25 | 74.99 | 5.8 | -37±1 | 270±1 |
| TSCV0.06 cong | 0.06 | 24.98 | 74.96 | 5.6 | -35.2±.08 | 281±6 |

Il prodotto commerciale a base di SiO_2 utilizzato (Ludox HS-40, Grace Davidson) ha un pH naturale di 9.7. Poiché a pH così elevato anche la sospensione di TiO_2 presenta potenziale Zeta negativo (-40mV), è stato necessario abbassare il pH della silice a 4 mediante resina a scambio cationico massimizzando così l'interazione elettrostatica tra TiO_2 e SiO_2 (Figura 4.15) e mantenendo il diametro idrodinamico sotto ai 20nm nonostante il cambio di pH.

La curva del potenziale Zeta/pH del campione titania/silice ottenuto T1S3 (sospensione costituita dal 25%wt di TiO_2 e 75%wt di SiO_2) è riportata in Figura 4.15 e mostra un andamento perfettamente sovrapponibile a quella della SiO_2 , e ancora più negativa rispetto a *C. Vulgaris*.

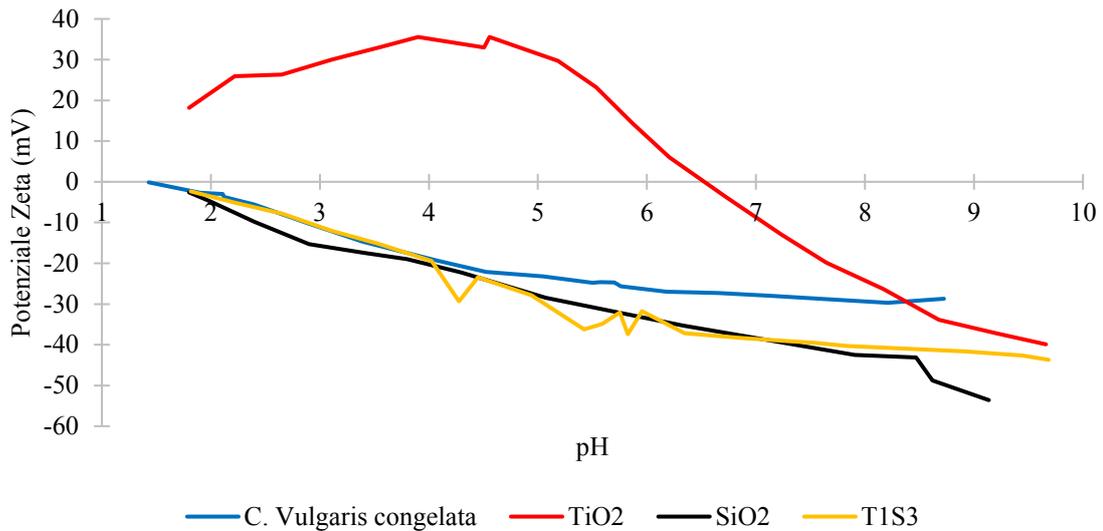


Figura 4.15 – Titolazioni potenziale Zeta/pH di *C. Vulgaris congelata*, TiO_2 , SiO_2 e T1S3

Dalla miscelazione del campione T1S3 con *C. Vulgaris congelata*, agevolata dalle 24h di agitazione sui rulli, si sono preparati i campioni a tre componenti TSCV0.01 cong e TSCV0.06 cong. SiO_2 a pH 4 mostra un potenziale di circa -30mV, introducendo al mix titania-alga un componente più acido il pH si abbassa rispetto ai rispettivi campioni privi di SiO_2 , e il potenziale diventa ulteriormente negativo contrariamente al trend generale. Ciò può essere spiegato osservando la curva di titolazione della silice, che in questa regione di pH mostra valori di potenziale più negativi rispetto all'alga, di conseguenza i campioni con silice mostrano curve più negative, con plateau a -40mV (Figura 4.16).

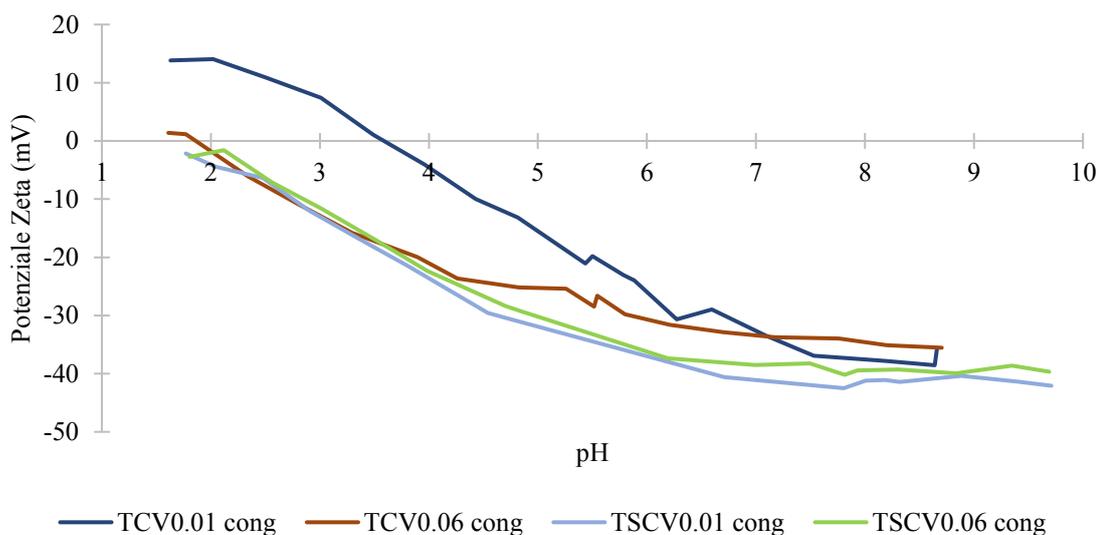


Figura 4.16 – Titolazioni potenziale Zeta/pH dei campioni con silice TSCV0.01 cong, TSCV0.06 cong e dei corrispettivi campioni senza silice TCV0.01 cong e TCV0.06 cong

4.1.4.2 Addizione di Fe₃O₄ nanoparticellare

Come anticipato la magnetite è stata aggiunta al fine di indurre proprietà magnetiche nel materiale finale e permettere un migliore recupero del fotocatalizzatore.

Le concentrazioni di Fe₃O₄ inserite nei campioni sono appositamente molto basse, allo scopo di esplorare l'effetto della presenza di una fase magnetica. Nonostante ciò, ponendo un magnete in prossimità delle sospensioni, si osserva la migrazione del campione veicolata dal campo magnetico. I risultati ottenuti sono principalmente finalizzati a verificare la compatibilità di Fe₃O₄ con il sistema *C. Vulgaris*-TiO₂.

Tabella 4.6 – Valori di pH, potenziale Zeta e diametro idrodinamico dei singoli componenti e dei sistemi misti titania/magnetite/*C. Vulgaris*

| Campione | Conc. (%wt) | | | pH | Potenziale | Diametro idrodinamico (nm) |
|--------------------------------|-------------|------------------|--------------------------------|-----|------------|----------------------------|
| | Alga | TiO ₂ | Fe ₃ O ₄ | | Zeta (mV) | |
| <i>C. Vulgaris</i> cong | 100 | 0 | 0 | 6.1 | -30±1 | 3690±60 |
| <i>C. Vulgaris</i> liof | 100 | 0 | 0 | 6.5 | -23±1 | 18000±6000 |
| TiO ₂ | 0 | 100 | 0 | 5.6 | +28.5±0.4 | 480±40 |
| Fe ₃ O ₄ | 0 | 0 | 100 | 4.4 | -34±1 | 290±20 |
| TCV8Fe0.8 liof | 7.63 | 91.60 | 0.76 | 6.3 | -21.4±0.9 | 2900±100 |
| TCV0.03Fe0.3 cong | 0.03 | 99.63 | 0.33 | 6.0 | -31.4±0.4 | 2600±200 |

Il diametro idrodinamico di Fe₃O₄ è di 290nm, valore maggiorato rispetto al diametro reale determinato per microscopia (circa 40nm) poiché influenzato dalla presenza degli stabilizzanti polimerici a base di PEG-PLGA e da una parziale aggregazione dovuta all'invecchiamento della sospensione. La sua carica superficiale misurata al pH naturale di 4.4 è negativa e pari a -34mV. Dall'accoppiamento con il sistema TiO₂/biomassa si ottengono dimensioni cellulari maggiorate, intorno a 2.5µm, e valori di potenziale Zeta in linea con la concentrazione e tipologia di massa algale.

Di seguito sono riportate le curve di titolazione dei campioni contenenti magnetite. Il nanosol di magnetite mostra punto isoelettrico a pH 2.4 e un plateau di potenziale Zeta a circa -40mV. L'andamento della carica superficiale è simile a quello di *C. Vulgaris*, questo potrebbe ostacolare l'eterocoagulazione, ma sperimentalmente si osserva una buona omogeneizzazione delle sospensioni a tre componenti (*C. Vulgaris*/TiO₂/Fe₃O₄).

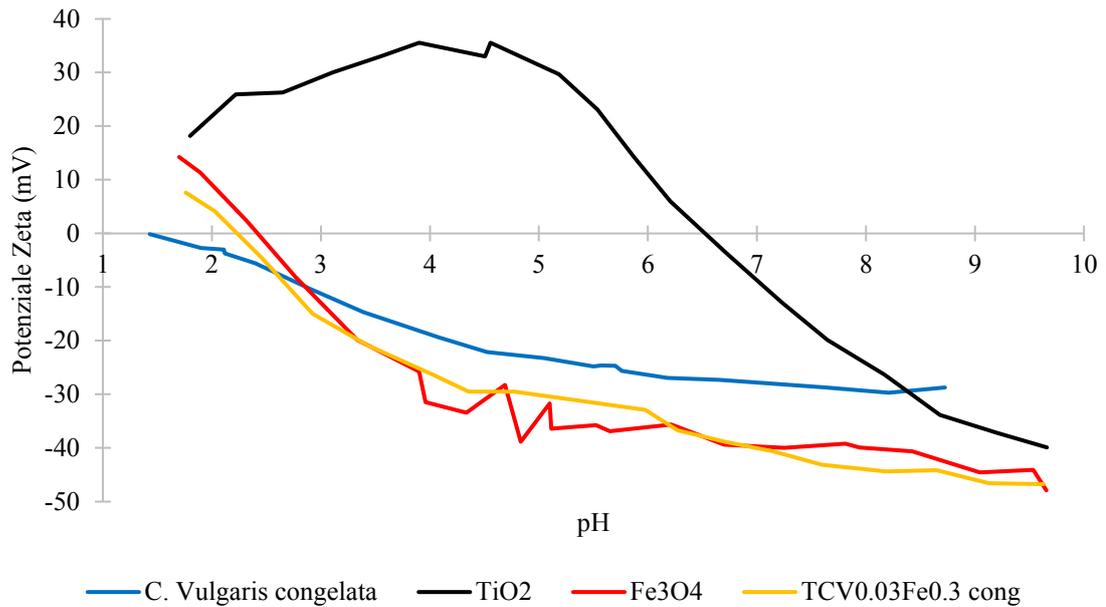


Figura 4.17 – Curve di titolazione potenziale Zeta/pH di *C. Vulgaris congelata*, TiO_2 , Fe_3O_4 e $TCV0.03Fe0.3$ cong

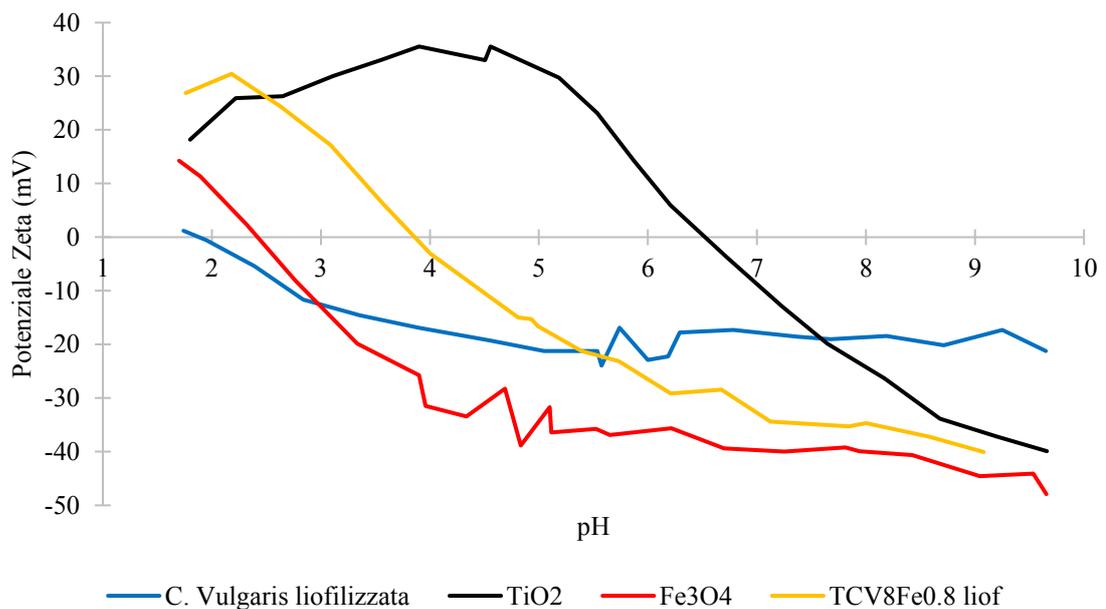


Figura 4.18 – Curve di titolazione potenziale Zeta/pH di *C. Vulgaris liofilizzata*, TiO_2 , Fe_3O_4 e $TCV8Fe0.8$ liof

Da questi campioni emerge nuovamente che dal punto di vista della carica superficiale, il fattore determinante sembra essere la tipologia di alga aggiunta. Infatti, il campione $TCV0.3Fe0.3$ cong (Figura 4.17) si comporta in modo analogo a $TCV0.06$ cong e $TCV8Fe0.8$ liof (Figura 4.18) mostra un andamento simile al campione ad elevata

concentrazione di biomassa liofilizzata (TCV9 liof). In generale, l’inserimento di magnetite non sembra ostacolare l’approccio di self-assembly finora seguito o modificare il potenziale superficiale. Verrà in seguito verificato l’impatto sul biosorbimento e sulla fotodegradazione.

4.2 Caratterizzazione funzionale dei campioni in sospensione

I campioni ibridi biomassa/fase inorganica preparati sono stati caratterizzati dal punto di vista funzionale mediante test di biosorbimento di metalli pesanti e di fotocatalisi, con l’obiettivo di investigare l’influenza della composizione e delle caratteristiche chimico-fisiche e colloidali sulla performance del materiale.

4.2.1 Biosorbimento di Cu^{2+}

I test di biosorbimento sono stati condotti secondo la procedura descritta nella parte sperimentale.

In prima battuta sono stati analizzati i componenti utilizzati per la produzione dei campioni allo scopo di determinare come possono contribuire all’assorbimento del rame. L’attività di *C. Vulgaris* come biosorbitore di metalli pesanti è nota e riportata in letteratura^[49,52], mentre per titania, silice e magnetite non è attesa un’attività significativa.

Tabella 4.7 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} misurati sui singoli componenti. I risultati sono riportati in assorbimento percentuale e in $\text{mgCu}^{2+}/\text{g}_{\text{campione}}$

| Campione | Assorbimento % | Assorbimento ($\text{mgCu}^{2+}/\text{g}_{\text{campione}}$) |
|---------------------------------|-----------------------|--|
| <i>C. Vulgaris</i> congelata | 95.55 | 103 |
| <i>C. Vulgaris</i> liofilizzata | 73.48 | 15.31 |
| TiO_2 | 18.10 | 0.78 |
| Fe_3O_4 | 27.75 | 5.48 |
| SiO_2 | 14.75 | 0.58 |

In Tabella 4.7 sono riportati i risultati ottenuti sui singoli componenti espressi come percentuale di assorbimento del rame totale e in milligrammi di rame assorbiti per grammo di campione.

Il dato di maggiore interesse è l’assorbimento relativo all’unità di massa del campione. La sospensione di *C. Vulgaris* fresca congelata mostra un assorbimento di 103mg/g dato

consistente con la letteratura dove sono riportati risultati per condizioni sperimentali analoghe compresi tra 40mg/g e 110mg/g^[2,17]. Per il campione di biomassa liofilizzata si ottiene un risultato quasi un ordine di grandezza inferiore, pari a 15mg/g, dato coerente con il comportamento evidenziato dalle precedenti caratterizzazioni, che hanno dimostrato come il trattamento di liofilizzazione comporti la formazione di aggregati pluricellulari indesiderati, riducendo la superficie disponibile per il biosorbimento. Come atteso, titania e silice risultano praticamente inerti con assorbimenti inferiori a 1mg/g. La magnetite, invece, mostra un assorbimento limitato, ma non trascurabile e pari a 5.48mg/g che però può essere attribuito principalmente al sequestro del catione rameico da parte dello stabilizzante polimerico PEG-PLGA che avvolge le nanoparticelle. Tuttavia, nei campioni preparati con Fe₃O₄ questo contributo è invece trascurabile in quanto il suo contenuto è inferiore all'1%.

Tabella 4.8 – Valori di assorbimento di Cu²⁺ misurati sui campioni preparati in sospensione. I risultati sono riportati in assorbimento percentuale e in mgCu²⁺/g_{campione}

| Campione | Componenti | Assorbimento 1h (mgCu²⁺/g_{campione}) | Assorbimento 24h (mgCu²⁺/g_{campione}) |
|-------------------|--|---|--|
| TCV0.01 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 1.66 | 1.57 |
| TCV0.06 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.29 | 3.39 |
| TCV0.6 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.69 | |
| TCV6 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.38 | |
| TSCV0.01 cong | TiO ₂ /SiO ₂ /C. <i>V.</i> | 1.59 | |
| TSCV0.06 cong | TiO ₂ /SiO ₂ /C. <i>V.</i> | 3.42 | |
| TCV0.03Fe0.3 cong | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ /C. <i>V.</i> | 2.75 | 2.92 |
| TCV0.06 liof | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 0.62 | 0.76 |
| TCV9 liof | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 1.73 | 1.87 |
| TCV8Fe0.8 liof | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ /C. <i>V.</i> | 1.77 | 1.78 |

La differenza percentuale media tra le prove a 1h e le prove a 24h è inferiore al 2%, valore accettabile come margine di errore sperimentale. Pertanto, è possibile affermare che il processo di biosorbimento del rame con *C. Vulgaris* non necessita di lunghi tempi di contatto, poiché probabilmente dopo un'ora si raggiunge l'equilibrio^[58].

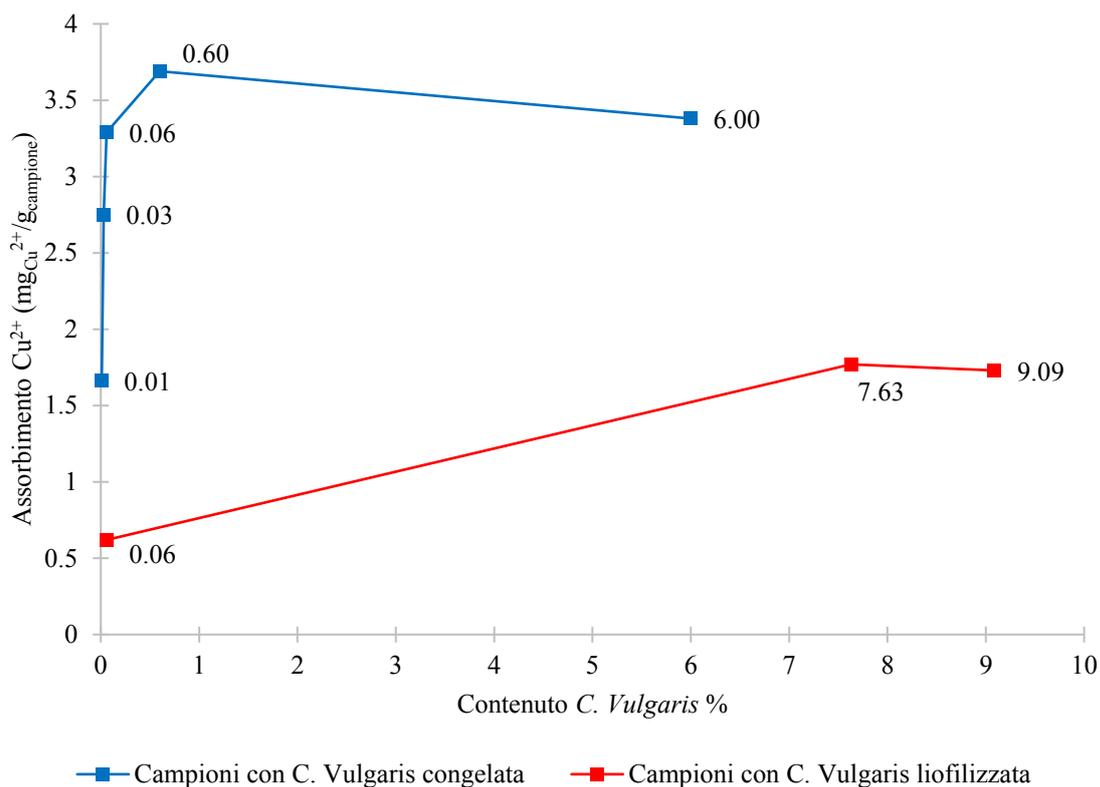


Figura 4.19 – Assorbimento Cu^{2+} in funzione del contenuto % in peso di *C. Vulgaris*

Il grafico in *Figura 4.19* mostra l'andamento dell'assorbimento di metallo in funzione del contenuto di biomassa nei campioni preparati, evidenziando la differenza tra biomassa congelata e liofilizzata. In particolare, le curve denotano che per i sistemi prodotti è possibile raggiungere un massimo in termini di assorbimento del rame^[59]. Già con un basso contenuto in peso di *C. Vulgaris* si massimizza la capacità di ritenzione dei campioni, ciò può essere visto sotto due punti di vista. Da un lato significa che è sufficiente una piccola quantità di biomassa per ottenere il massimo rendimento, ma dall'altro comporta che non è possibile aumentare l'efficienza incrementando ulteriormente la concentrazione di alga, almeno per queste condizioni di concentrazione di inquinante. I dati evidenziano, inoltre, la differenza marcata tra l'utilizzo di biomassa congelata e liofilizzata, la prima permette infatti di assorbire una quantità doppia di rame per unità di massa di campione.

Le sospensioni con silice e magnetite mostrano capacità in linea ai campioni prodotti con quantità equivalenti di titania e alga, perciò si può affermare che i due ossidi non influenzano l'assorbimento di metalli pesanti da parte di *C. Vulgaris*.

Dai risultati è stato ricavato un dato molto interessante, ossia la capacità di assorbimento di *C. Vulgaris* una volta supportata al sistema inorganico. Dopo aver sottratto il

contributo della componente inorganica ai campioni ibridi prodotti, si è rapportato l'assorbimento alla quantità di alga presente nel sistema misto. I risultati mostrati in *Tabella 4.9*, confrontati con l'assorbimento della sola alga in sospensione evidenziano un importante effetto sinergico nel caso della biomassa fresca congelata.

Tabella 4.9 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} sui campioni in sospensione. I risultati sono riportati in $mg_{Cu^{2+}}/g_{campione}$ e $mg_{Cu^{2+}}/g_{C. Vulgaris}$

| Campione | Componenti | Assorbimento ($mg_{Cu^{2+}}/g_{campione}$) | Assorbimento ($mg_{Cu^{2+}}/g_{C. Vulgaris}$) |
|-------------------------|--|--|---|
| <i>C. Vulgaris cong</i> | | | 103 |
| TCV0.01 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 1.66 | 7550 |
| TCV0.06 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.29 | 4230 |
| TCV0.6 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.69 | 548 |
| TCV6 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.38 | 44.7 |
| TSCV0.01 cong | TiO ₂ /SiO ₂ /C. <i>V.</i> | 1.59 | 9720 |
| TSCV0.06 cong | TiO ₂ /SiO ₂ /C. <i>V.</i> | 3.42 | 4990 |
| TCV0.03Fe0.3 cong | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ /C. <i>V.</i> | 2.75 | 5930 |
| <i>C. Vulgaris liof</i> | | | 15.31 |
| TCV0.06 liof | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 0.62 | 0 |
| TCV9 liof | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 1.73 | 11.2 |
| TCV8Fe0.8 liof | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ /C. <i>V.</i> | 1.77 | 13.7 |

Infatti, i dati relativi all'assorbimento specifico per grammo di *C. Vulgaris* evidenziano un anomalo incremento di attività rispetto alla sola alga in sospensione, per i campioni preparati con biomassa congelata. Rispetto ai 103mg/g di *C. Vulgaris* congelata si raggiungono valori quasi due ordini di grandezza superiori, questo incremento è inversamente correlato al contenuto di alga nel campione, infatti a bassa concentrazione si ha la massima dispersione dell'alga sulla componente inorganica, con la quale interagisce superficialmente (come dimostrato dalle analisi di potenziale Zeta), che può essere vista come un vero e proprio disperdente ad alta area superficiale. In sospensione concentrata, nonostante *C. Vulgaris* sia una microalga unicellulare, le cellule tendono ad aggregarsi in grappoli formando strutture pluricellulari e riducendo la superficie di parete cellulare disponibile^[59]. Quando invece si trovano diluite in presenza di un disperdente si massimizza la disponibilità all'assorbimento di metalli pesanti. Incrementando il

contenuto di alga, come si può vedere in *Figura 4.20*, questo effetto viene ridotto. Al contrario i campioni contenenti biomassa liofilizzata, la quale non interagisce con la componente inorganica, non sembrano beneficiare in alcun modo di questo effetto di dispersione, perciò l'assorbimento non si discosta dal valore della sospensione di *C. Vulgaris* liofilizzata di 15mg/g. Infatti, il campione TCV0.06 liof mostra un contributo trascurabile della componente algale, in questo caso il basso contenuto di materiale liofilizzato viene mascherato dalla titania.

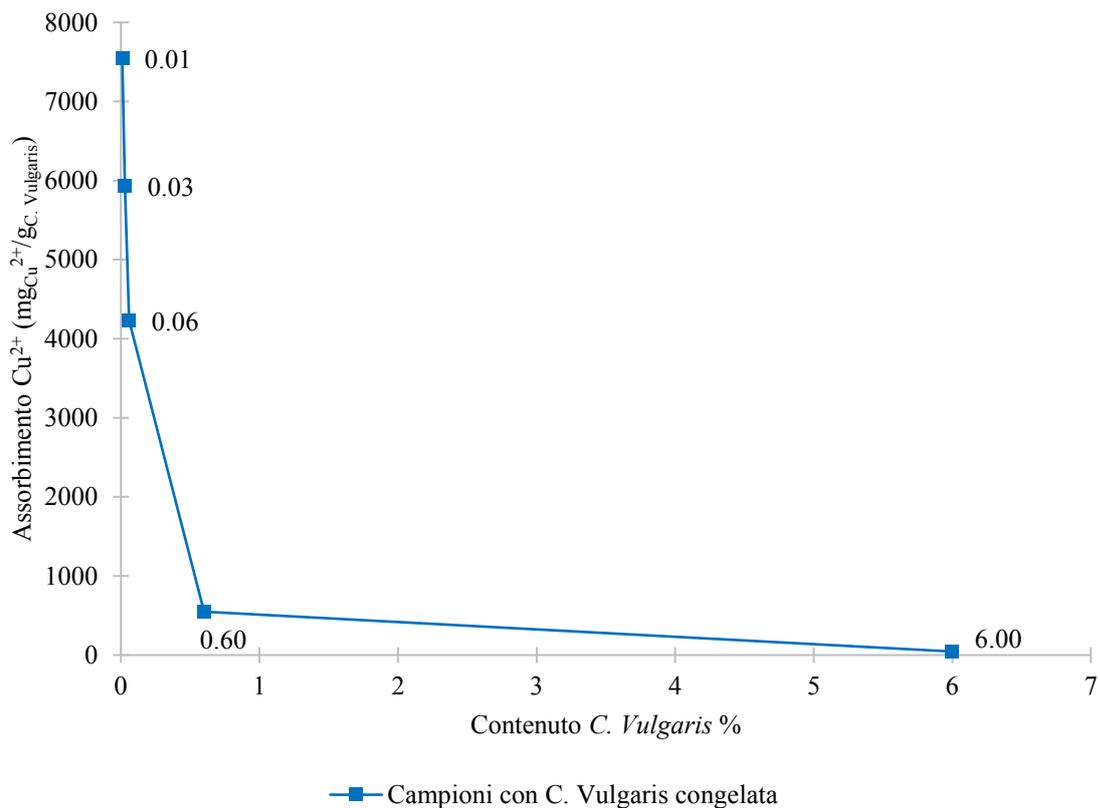


Figura 4.20 – Assorbimento Cu^{2+} in funzione del contenuto % in peso di *C. Vulgaris* congelata

Come già visto in precedenza l'andamento dell'assorbimento non è lineare con il contenuto di alga ma tende ad arrivare ad un valore limite di saturazione, se si valuta la sola *C. Vulgaris* contenuta nei campioni analizzati si può notare un andamento inverso. Incrementando il contenuto di alga fresca la resa per grammo di biomassa cala fino a raggiungere un valore minimo di circa 45mg/g, inferiore alla metà del valore ottenuto con la sola alga fresca congelata (103mg/g).

Un incremento del contenuto di biomassa porta a una migliore efficienza globale del campione ma determina un corrispettivo calo dell'efficienza dell'alga in esso contenuta.

Occorre trovare una composizione che sia in grado di massimizzare la capacità di assorbimento e allo stesso tempo limitare la perdita di efficienza valutata rispetto a *C. Vulgaris*. Da questi primi risultati il campione TCV0.06 cong è il migliore compromesso, l'attività del sistema è la massima registrata e in termini di efficienza algale si mantiene un assorbimento 5 volte superiore alla sola biomassa, 548mg/g contro 103mg/g. Con l'obiettivo di evidenziare ulteriormente l'effetto sinergico indotto dall'accoppiamento di *C. Vulgaris* con la fase inorganica, si è confrontato l'assorbimento reale misurato sui campioni con l'assorbimento medio ponderale calcolato sulla base della composizione (Tabella 4.10).

Tabella 4.10 – Confronto dei valori di assorbimento di Cu^{2+} calcolati come media ponderale dei singoli componenti rispetto ai risultati sperimentali ottenuti dai campioni

| Campione | Componenti | Assorbimento ($\text{mgCu}^{2+}/\text{g}_{\text{campione}}$) | Media ponderale ($\text{mgCu}^{2+}/\text{g}_{\text{campione}}$) |
|-------------------|---|--|---|
| TCV0.01 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 1.66 | 0.79 |
| TCV0.06 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 3.29 | 0.84 |
| TCV0.6 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 3.69 | 1.04 |
| TCV6 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 3.38 | 6.91 |
| TSCV0.01 cong | $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2/\text{C. V.}$ | 1.59 | 0.44 |
| TSCV0.06 cong | $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2/\text{C. V.}$ | 3.42 | 0.49 |
| TCV0.03Fe0.3 cong | $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C. V.}$ | 2.75 | 0.83 |
| TCV0.06 liof | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 0.62 | 0.79 |
| TCV9 liof | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 1.73 | 2.10 |
| TCV8Fe0.8 liof | $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C. V.}$ | 1.77 | 1.93 |

I campioni con *C. Vulgaris* liofilizzata mostrano un comportamento in linea con la media ponderale, con valori di poco inferiori al dato calcolato. Al contrario la biomassa congelata mostra invece capacità di assorbimento superiori a quanto previsto dalla media ponderale, questo è vero per un basso contenuto di biomassa dove prevale l'effetto di dispersione sulla matrice inorganica. Quando la concentrazione inizia a crescere, come nel campione TCV6 cong, si perde questo effetto in quanto si è raggiunto il contenuto di biomassa della regione di plateau.

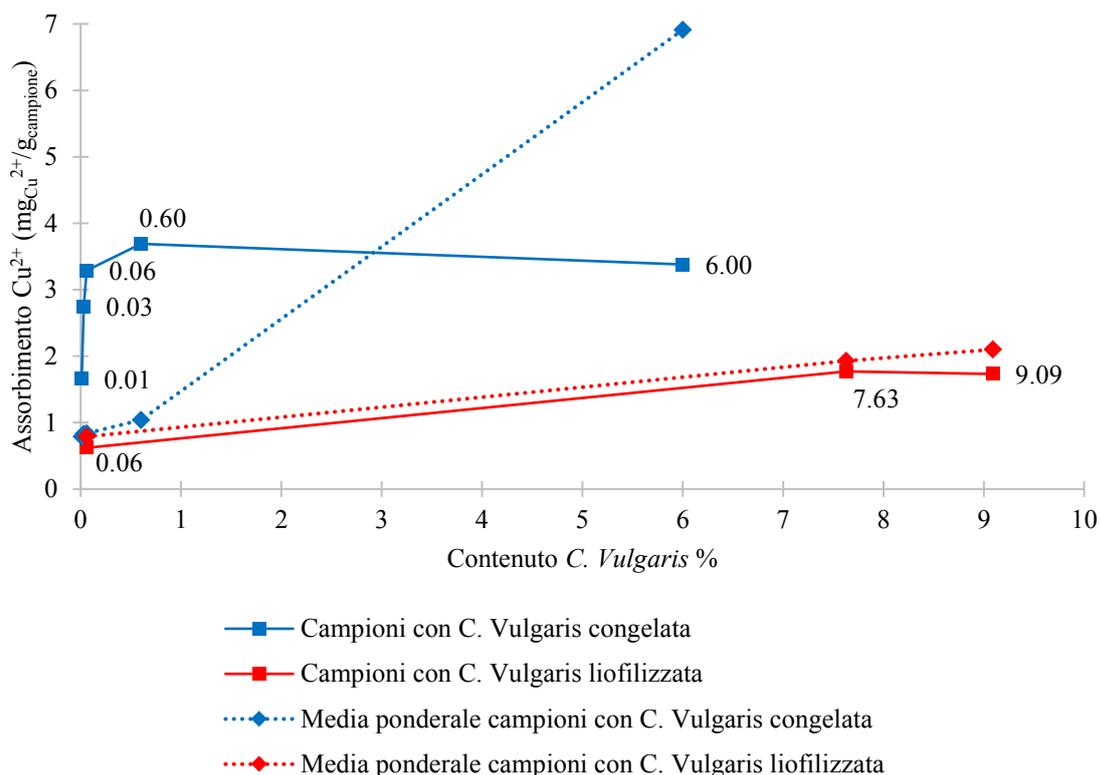


Figura 4.21 – Confronto dei valori di assorbimento di Cu^{2+} calcolati come media ponderale dei singoli componenti, con i risultati sperimentali ottenuti dai campioni con alga congelata e liofilizzata

Fino ad un basso contenuto percentuale di biomassa congelata si osserva un effetto sinergico tra *C. Vulgaris* e la matrice inorganica, dettato dal potere disperdente delle nanoparticelle, in questo modo si ottengono risultati superiori a quanto previsto dalla semplice media ponderale. Questi risultati confermano che non è conveniente operare a concentrazioni di biomassa molto elevate, a meno che non sia necessario trattare acque ad alto contenuto di metalli pesanti, che richiedono un elevato contenuto di *C. Vulgaris*.

4.2.2 Studio dell'attività fotocatalitica

Anche per lo studio di fotodegradazione sono stati analizzati prima i componenti singoli poi i campioni ibridi. I risultati ottenuti sono stati valutati come percentuale di abbattimento di RhB dopo un'ora di trattamento e dal punto di vista della costante cinetica del processo fotodegradativo.

4.2.2.1 Attività fotocatalitica dei componenti singoli

Il primo test eseguito è rivolto a valutare la stabilità di RhB all'irraggiamento UV utilizzato nel set-up sperimentale messo a punto, perciò si esegue una reazione non

catalizzata su una soluzione di RhB 0.007g/L. Non si osserva alcuna fotodegradazione durante i 60 minuti di test, con una differenza tra il valore di picco di assorbanza iniziale e finale inferiore a 0.3%.

Il materiale di riferimento in questo caso è TiO₂ P25, il campione di nanosospensione sottoposto al test ha fornito i seguenti risultati.

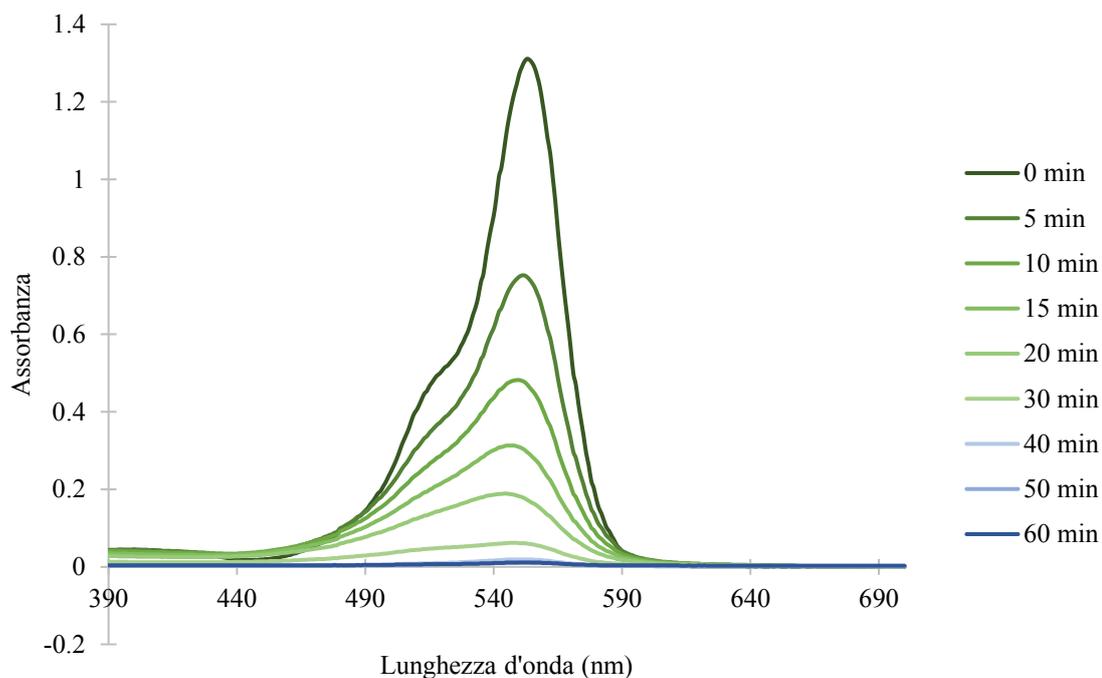


Figura 4.22 – Spettri di assorbimento UV-Vis registrati a 5-10-15-20-30-40-50-60 minuti di esposizione alla radiazione UV per il campione TiO₂ P25

In Figura 4.22 sono riportati i risultati ottenuti per la sospensione di TiO₂ P25, al progredire del tempo di campionamento l'altezza del picco di assorbimento di RhB a 554nm si abbassa fino a quando a 40 minuti il segnale si confonde con la linea di base.

Estrapolando il valore del picco di assorbimento a 554nm si calcola l'efficienza di fotodegradazione e come è stato possibile evidenziare visivamente dal grafico, a 40 minuti si raggiunge una conversione di RhB quasi quantitativa (98.55%).

Tabella 4.11 – Valori di assorbanza e di conversione di RhB in funzione del tempo di irraggiamento per il campione TiO₂ P25

| t (min) | A | Conversione % |
|---------|-------|---------------|
| 0 | 1.308 | 00.00 |
| 5 | 0.741 | 43.35 |
| 10 | 0.463 | 64.60 |
| 15 | 0.291 | 77.75 |
| 20 | 0.169 | 87.08 |
| 30 | 0.045 | 95.49 |
| 40 | 0.014 | 98.55 |
| 50 | 0.009 | 99.08 |
| 60 | 0.008 | 99.16 |

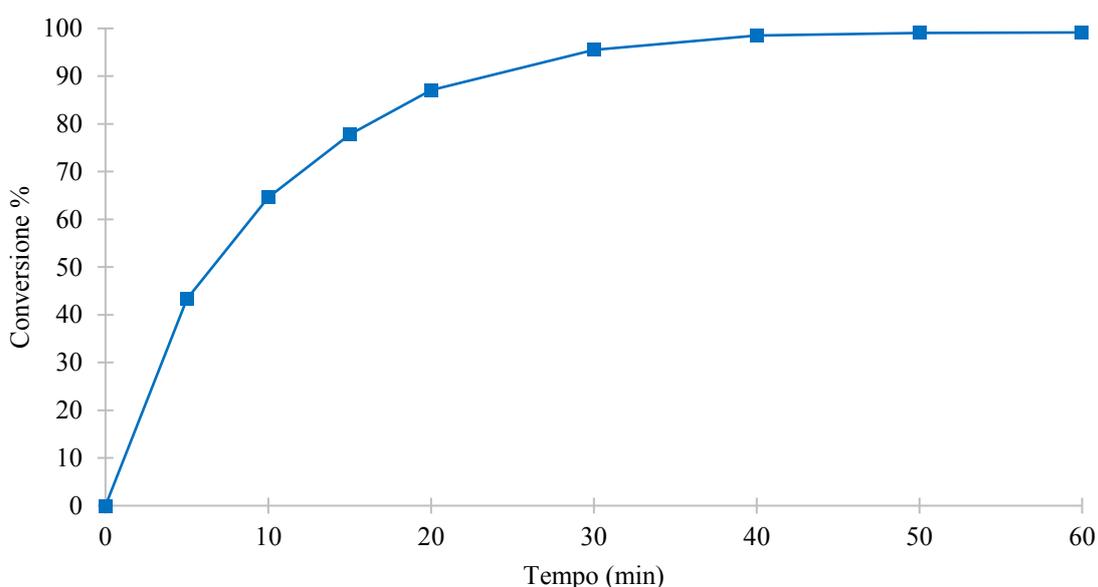


Figura 4.23 – Conversione di RhB in funzione del tempo di irraggiamento per il campione TiO₂ P25 (RhB 0.007g/L e TiO₂ 0.1g/L)

La fotodegradazione procede velocemente fino a completamento, il plateau si instaura a circa 40 minuti, l'andamento è quello tipico di una cinetica di primo ordine dove al calare della concentrazione della specie reagente cala la velocità di reazione. Perciò se si mette in grafico il logaritmo naturale del rapporto tra assorbanza al tempo 0 minuti e al tempo generico t in funzione del tempo, si ottiene una retta la cui pendenza rappresenta graficamente la costante cinetica.

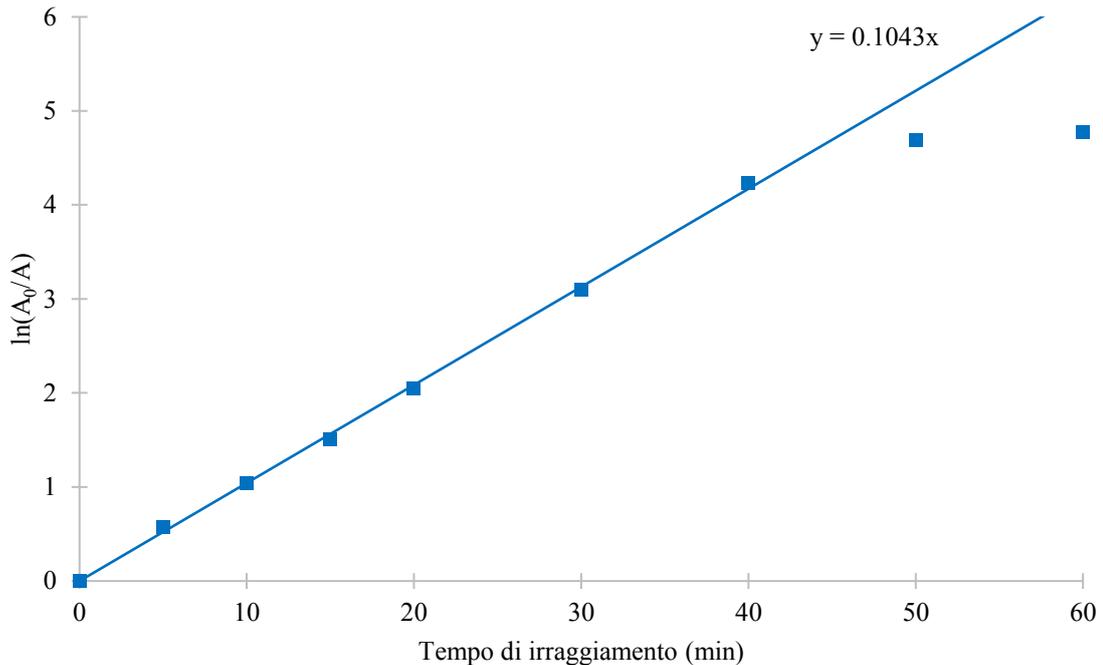


Figura 4.24 – Curva cinetica della degradazione di RhB per il campione TiO_2 P25 (RhB 0.007g/L e TiO_2 0.1g/L)

La pendenza della retta per TiO_2 P25 e quindi la costante cinetica sarebbe $9.20 \cdot 10^{-2} \text{min}^{-1}$, i dati a 50-60 minuti sono fuori trend in quanto la reazione dopo 40 minuti prosegue molto lentamente vista la bassa concentrazione di RhB rimasta, trascurando gli ultimi due punti la costante cinetica risulta $1.04 \cdot 10^{-1} \text{min}^{-1}$.

Il test su *C. Vulgaris* conferma la mancanza di attività fotocatalitica della biomassa algale, infatti dopo un'ora di esposizione vi è un calo in termini di assorbanza solamente di un punto percentuale.

Diversamente per Fe_3O_4 si riscontra un comportamento anomalo, in particolare le sospensioni analizzate che assorbono a 554nm, mostrano un abbassamento dell'assorbanza già dopo i 30 minuti di condizionamento al buio. Il comportamento riscontrato suggerisce che non vi è un'attività fotocatalitica o catalitica in atto, ma piuttosto è probabile che RhB venga sottratta alla sospensione dal polimero PEG-PLGA utilizzato per stabilizzare le nanoparticelle. Infatti, gran parte del colorante viene rimosso nei primi 30 minuti di buio, poi dopo filtrazione, la parte di RhB assorbita dal polimero rimane intrappolata e quindi si registrano valori di assorbanza inferiori a quanto atteso.

A seguito di quanto osservato per la magnetite si è verificato che i campioni prodotti contenenti magnetite non manifestino un calo di assorbanza nei primi 30 minuti di buio, visto il basso contenuto di quest'ultima si ha un assorbimento trascurabile.

4.2.2.2 Attività fotocatalitica dei campioni *C. Vulgaris*/TiO₂

I risultati fotocatalitici (*Figura 4.25* e *Tabella 4.12*) mostrano per i campioni preparati con *C. Vulgaris* congelata un calo di attività all'aumentare del contenuto di alga. Questo si verifica nonostante nel batch di reazione la quantità di TiO₂ aggiunta rimanga invariata. Come dimostrato dall'andamento delle curve potenziale Zeta/pH, biomassa fresca congelata e titania interagiscono superficialmente e questo potrebbe determinare un calo di superficie di ossido disponibile all'irraggiamento e di conseguenza abbassare l'efficienza di fotodegradazione. La buona distribuzione di *C. Vulgaris* fresca congelata su TiO₂ comporta un importante vantaggio per il biosorbimento di metalli pesanti, ma sembra rallentare le capacità fotocatalitiche del sistema.

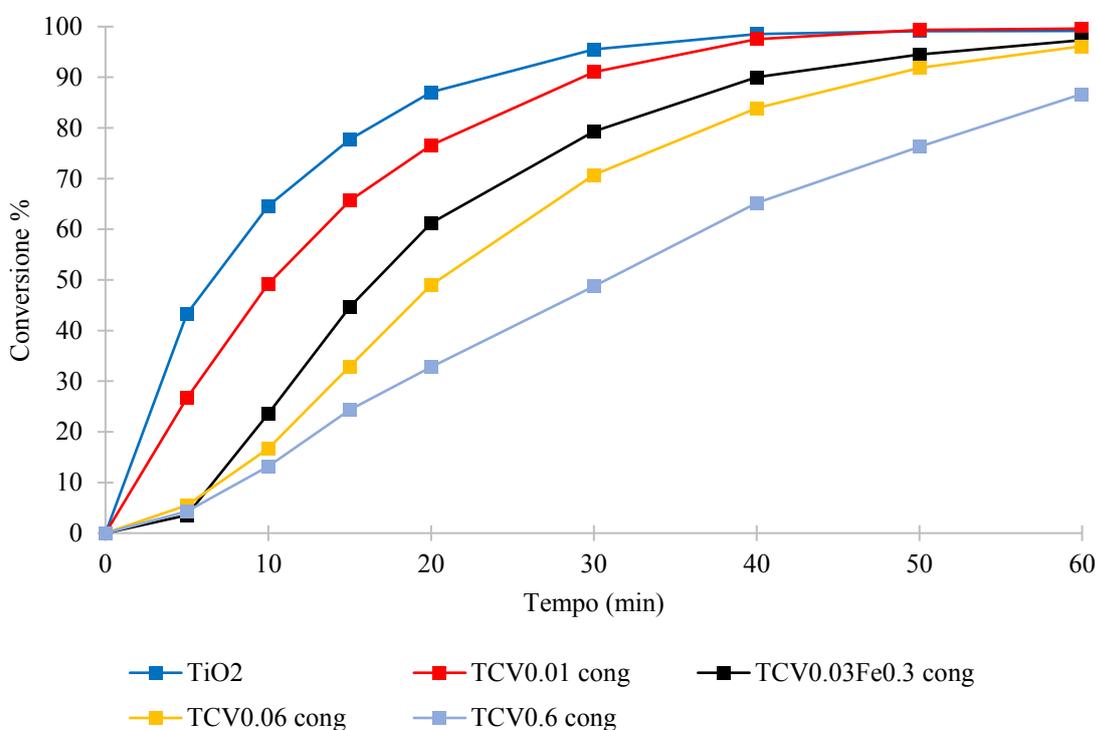


Figura 4.25 – Conversione di RhB in funzione del tempo di irraggiamento dei campioni con C. Vulgaris congelata (RhB 0.007g/L e TiO₂ 0.1g/L)

Infatti, dopo 60 minuti di esposizione (*Figura 4.25*) tutti i campioni eccetto TCV0.6 cong raggiungono una conversione di RhB quasi quantitativa, la differenza rispetto alla sola TiO₂ P25 risiede nel tempo necessario per raggiungere il completamento della reazione.

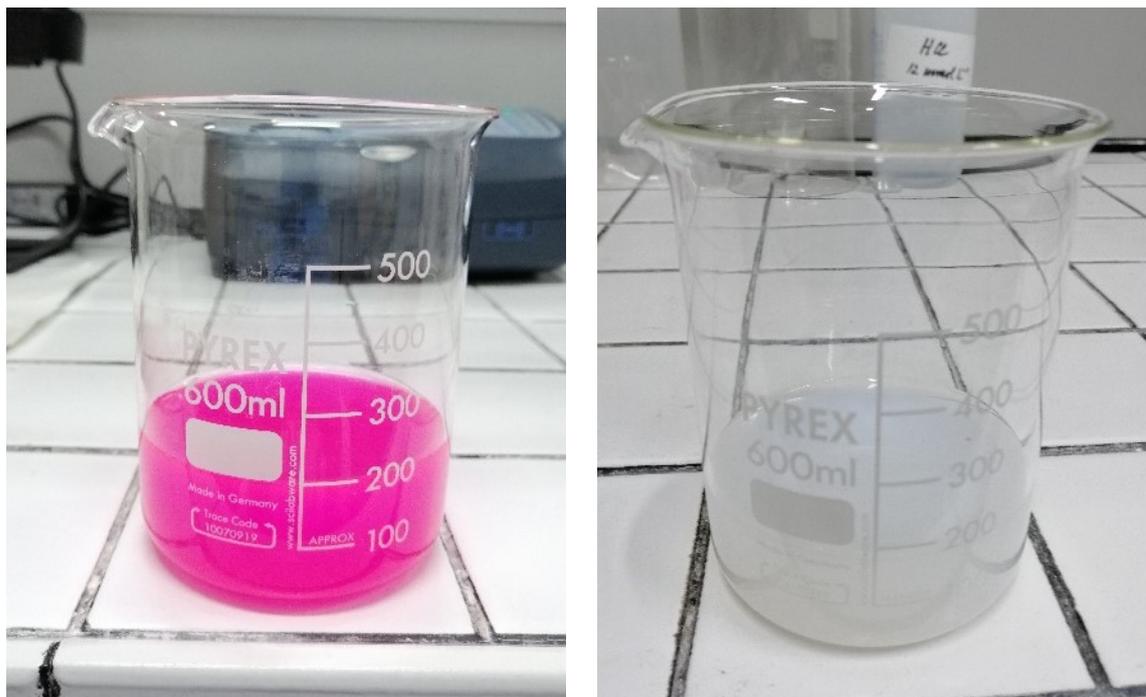


Figura 4.26 – Batch di reazione a $t=0\text{min}$ (sinistra) e a $t=60\text{min}$ (destra)

Le curve cinetiche permettono di evidenziare le differenze tra i campioni (Figura 4.27), dove la pendenza della retta corrisponde alla costante cinetica. Il campione TCV0.6 cong ha un contenuto di *C. Vulgaris* tale da limitare significativamente l'attività della titania, infatti necessita di tempi di esposizione superiori per completare la reazione.

Tabella 4.12 – Valori di conversione di RhB e costante cinetica dei campioni con *C. Vulgaris* congelata

| Campione | Componenti | Conversione % (a 60 minuti) | $k_{\text{cin}} [\text{min}^{-1}]$ |
|----------------------|---|--------------------------------|------------------------------------|
| TiO ₂ P25 | TiO ₂ | 99.16 | $1.04 \cdot 10^{-1}$ |
| TCV0.01 cong | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 99.62 | $9.23 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV0.03Fe0.3 cong | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ / <i>C. V.</i> | 97.34 | $5.70 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV0.06 cong | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 96.15 | $4.84 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV0.6 cong | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 86.71 | $2.88 \cdot 10^{-2}$ |

I risultati dimostrano che l'aggiunta di magnetite non influisce sul comportamento dei campioni neanche per quanto riguarda l'attività fotocatalitica, pertanto per il futuro è possibile studiare formulazioni con un contenuto superiore di Fe₃O₄ al fine di conferire proprietà magnetiche significative al sistema e di fatto fornire un metodo alternativo per la separazione del catalizzatore.

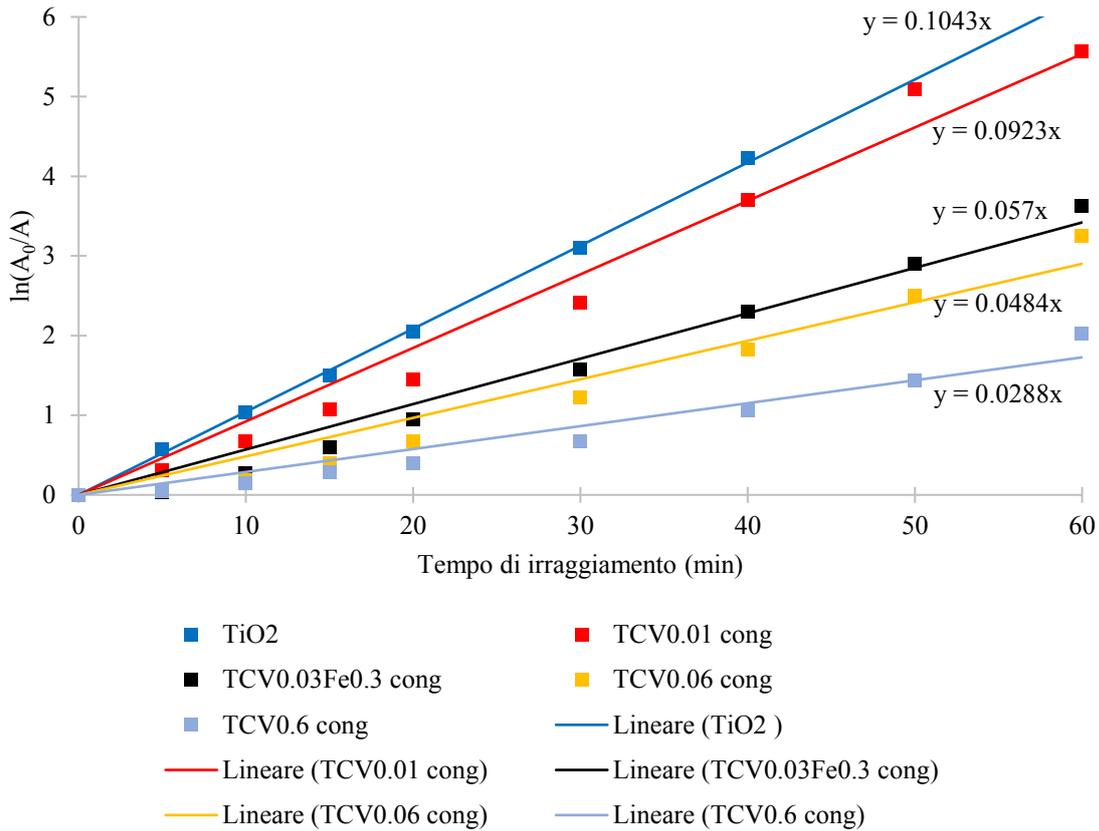


Figura 4.27 – Curva cinetica della degradazione di RhB dei campioni con *C. Vulgaris* congelata (RhB 0.007g/L e TiO₂ 0.1g/L)

I campioni preparati con *C. Vulgaris* liofilizzata risentono in modo molto più limitato della presenza della biomassa. Infatti, in questi campioni dove non si apprezzano interazioni superficiali specifiche in sospensione tra le due fasi, l'alga rimane confinata in microaggregati pluricellulari invece che essere ben dispersa. Questo sembrerebbe garantire una maggiore superficie di TiO₂ irraggiabile, evitando il rallentamento cinetico dovuto all'effetto schermante dell'alga.

Tabella 4.13 – Valori di conversione di RhB e costante cinetica dei campioni con *C. Vulgaris* liofilizzata

| Campione | Componenti | Conversione % (a 60 minuti) | k _{cin} [min ⁻¹] |
|----------------------|---|--------------------------------|---------------------------------------|
| TiO ₂ P25 | TiO ₂ | 99.16 | 1.04 · 10 ⁻¹ |
| TCV0.06 liof | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 99.77 | 9.98 · 10 ⁻² |
| TCV8Fe0.8 liof | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ / <i>C. V.</i> | 98.94 | 7.47 · 10 ⁻² |
| TCV9 liof | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 99.29 | 7.96 · 10 ⁻² |

Comparando i due campioni a pari contenuto di alga TCV0.06 cong e TCV0.06 liof si può notare subito come l'influenza della biomassa liofilizzata sulla costante cinetica sia molto più limitato.

Tabella 4.14 – Valori di conversione di RhB e costante cinetica, confronto tra i campioni con biomassa congelata e liofilizzata alla stessa concentrazione

| Campione | Componenti | Conversione % (a 60 minuti) | k_{cin} [min^{-1}] |
|-----------------|--------------------------------------|--|---|
| TCV0.06 cong | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 96.15 | $4.84 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV0.06 liof | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 99.77 | $9.98 \cdot 10^{-2}$ |

La costante cinetica per il liofilizzato è pari a circa il doppio di quella del congelato ($9.98 \cdot 10^{-2} min^{-1}$ per il liofilizzato e $4.84 \cdot 10^{-2} min^{-1}$ per il congelato) e comparabile con quella della sola titania. Anche l'incremento di concentrazione nei successivi campioni testati non rallenta eccessivamente la reazione.

In termini di attività fotocatalitica le sospensioni di *C. Vulgaris* liofilizzata mostrano proprietà superiori rispetto ai corrispettivi campioni con alga fresca, però anche raggiungendo concentrazioni di alga elevate non consentono di ottenere i risultati desiderati in termini di biosorbimento di metalli pesanti.

4.2.2.3 Attività fotocatalitica dei campioni C. *Vulgaris*/TiO₂/SiO₂

Con l'obiettivo di migliorare la cinetica di fotodegradazione dei catalizzatori prodotti, mantenendo una buona capacità di biosorbimento dei metalli pesanti si sono aggiunte nanoparticelle di silice ai campioni ibridi (biomassa congelata/titania). Infatti, i campioni già caratterizzati dal punto di vista colloidale della serie TSCV derivano da questa necessità. Studi precedenti^[41,42] hanno dimostrato che l'accoppiamento di nanoparticelle di TiO₂ con nanoparticelle di SiO₂ consente di migliorare l'efficienza fotocatalitica della titania. Il rapporto in peso ideale tra le due specie inorganiche è stato valutato^[36] essere 1:3 TiO₂-SiO₂, perciò sono stati prodotti dei nuovi campioni con *C. Vulgaris* fresca congelata in cui il contenuto di fase inorganica è diviso tra titania e silice in rapporto ponderale 1:3.

È stato eseguito un primo test che conferma l'inerzia fotocatalitica della silice nei confronti di RhB, pertanto non si osserva nessun abbassamento di assorbanza dopo 60 minuti di esposizione a luce UV.

I campioni TSCV evidenziano valori elevati di efficienza di fotodegradazione e costante cinetica. Nonostante il set-up sperimentale renda la reazione di base molto veloce si può osservare, come desiderato, un miglioramento delle performance introducendo la silice. Le nanoparticelle di silice hanno dimensioni molto inferiori a quelle della titania, 14nm contro 440nm, e fungono da disperdenti quando si interpongono tra le particelle di TiO₂, limitandone l'aggregazione. Pertanto, si suppone che vi sia un incremento di superficie di TiO₂ esposta alla radiazione luminosa, e che l'elevato potere riflettente tipico della silice possa propagare e potenziare la radiazione in direzione delle cavità di TiO₂, estendendo ulteriormente la superficie attiva all'interno dei pori.

Tabella 4.15 – Valori di conversione di RhB e costante cinetica dei campioni con e senza silice alla stessa concentrazione di *C. Vulgaris* congelata

| Campione | Componenti | Conversione % (a 60 minuti) | k_{cin} [min⁻¹] |
|-----------------|---|--|---|
| TCV0.01 cong | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 99.62 | 9.23·10 ⁻² |
| TSCV0.01 cong | TiO ₂ /SiO ₂ / <i>C. V.</i> | 99.61 | 1.10·10 ⁻¹ |
| TCV0.06 cong | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 96.15 | 4.84·10 ⁻² |
| TSCV0.06 cong | TiO ₂ /SiO ₂ / <i>C. V.</i> | 99.84 | 9.34·10 ⁻² |

I risultati in Tabella 4.15 dimostrano che l'aggiunta di SiO₂ al sistema compensa il calo di attività determinato dalla presenza di biomassa. Il trend è analogo ai precedenti, all'aumentare del contenuto di *C. Vulgaris* viene rallentata la fotodegradazione, ma grazie a SiO₂ anche i campioni a più alto contenuto di alga mantengono una buona costante cinetica, perciò la formulazione ideale risulta essere quella costituita da TiO₂, SiO₂ e *C. Vulgaris* congelata, in questo modo si ottengono i migliori risultati in termini di biosorbimento di metalli pesanti senza compromettere l'attività fotocatalitica.

4.3 Caratterizzazione dei granulati

Con l'obiettivo di migliorare la maneggevolezza dei catalizzatori e supportare la biomassa, le sospensioni preparate vengono granulate mediante tecnica di Spray-Freeze-Drying (vedi Capitolo 3.4). I sistemi granulati ottenuti vengono indicati aggiungendo la sigla SFD (Spray-Freeze-Dried) e sono stati caratterizzati in termini di: area superficiale specifica, morfologia mediante analisi SEM e valutazione dell'energia di band gap. In

aggiunta, anche i granulati sono stati testati dal punto di vista delle performance funzionali, sia rispetto al biosorbimento che rispetto all'attività fotocatalitica.

In sospensione si è verificata l'attrazione di natura elettrostatica tra TiO_2 e *C. Vulgaris* fresca congelata, interazione che si mantiene anche dopo il trattamento di Spray-Freeze-Drying e che consente di ottenere una polvere omogenea, come riportato in *Figura 4.28*.

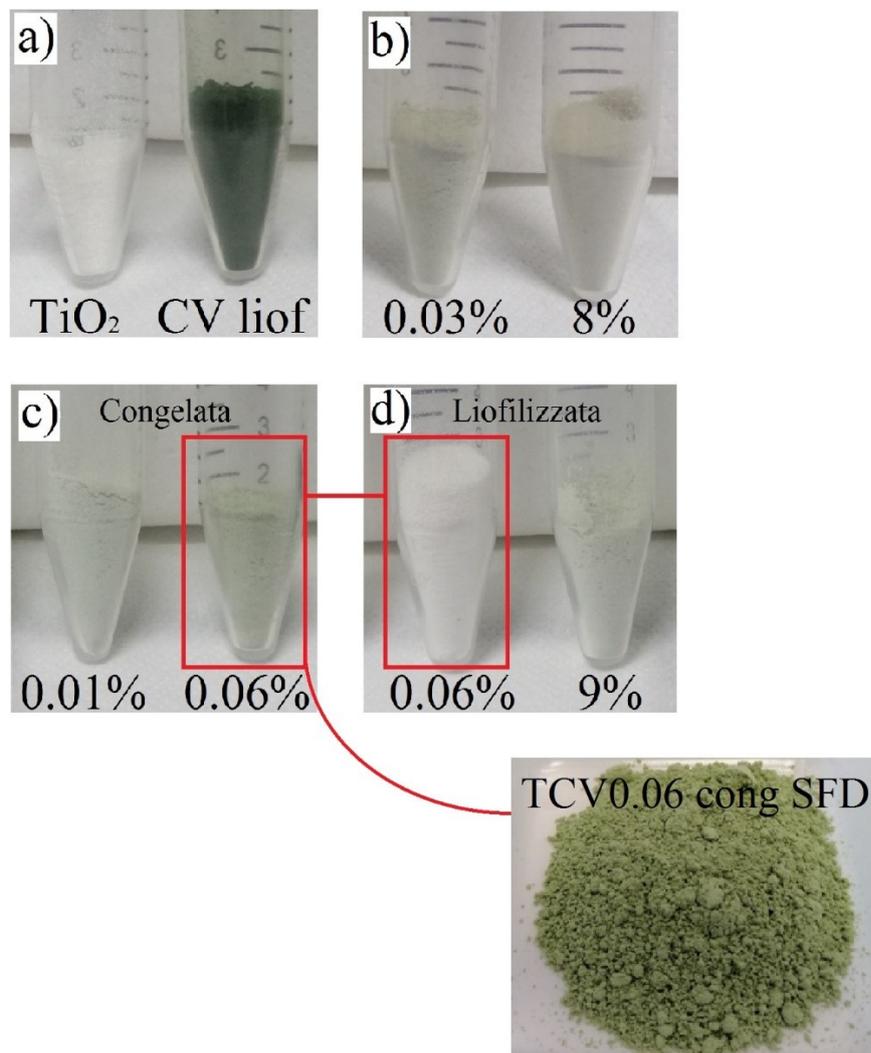


Figura 4.28 – Immagini delle polveri granulate e C. Vulgaris liofilizzata: (a) TiO₂ P25 SFD, C. Vulgaris liofilizzata; (b) TCV0.03Fe0.3 cong SFD, TCV8Fe0.8 liof SFD; (c) TCV0.01 cong SFD, TCV0.06 cong SFD; (d) TCV0.06 liof SFD, TCV9 liof SFD; (e)

Dalla figura emerge chiaramente la differenza tra i granulati ottenuti partendo da biomassa fresca congelata, in cui è stata riscontrata interazione superficiale con TiO_2 , e biomassa liofilizzata, risultata non interagente con la polvere inorganica.

Infatti, per una concentrazione equivalente di 0.06%wt di biomassa aggiunta, il campione con microalga congelata (TCV0.06 cong SFD) mostra una colorazione verde omogenea,

mentre il campione con quella liofilizzata (TCV0.06 liof SFD) risulta bianco, ad indicare la non interazione superficiale tra le due fasi. In generale, in presenza di biomassa liofilizzata, che tende a rimanere aggregata, la colorazione dei campioni granulati è molto più tendente al bianco rispetto agli equivalenti con congelata. Pertanto, aggiungendo biomassa liofilizzata è necessario raggiungere concentrazioni di alga pari al 7-9%wt per ottenere un colore verde uniforme, mentre aggiungendo *C. Vulgaris* fresca già lo 0.01%wt permette di ottenere una polvere verde.

I campioni solidi granulati sono stati nuovamente sospesi in acqua al fine di eseguire le titolazioni potenziale Zeta/pH tramite ELS. I risultati ottenuti sono stati confrontati con le curve fornite dai corrispettivi campioni in sospensione prima del trattamento di Spray-Freeze-Drying.

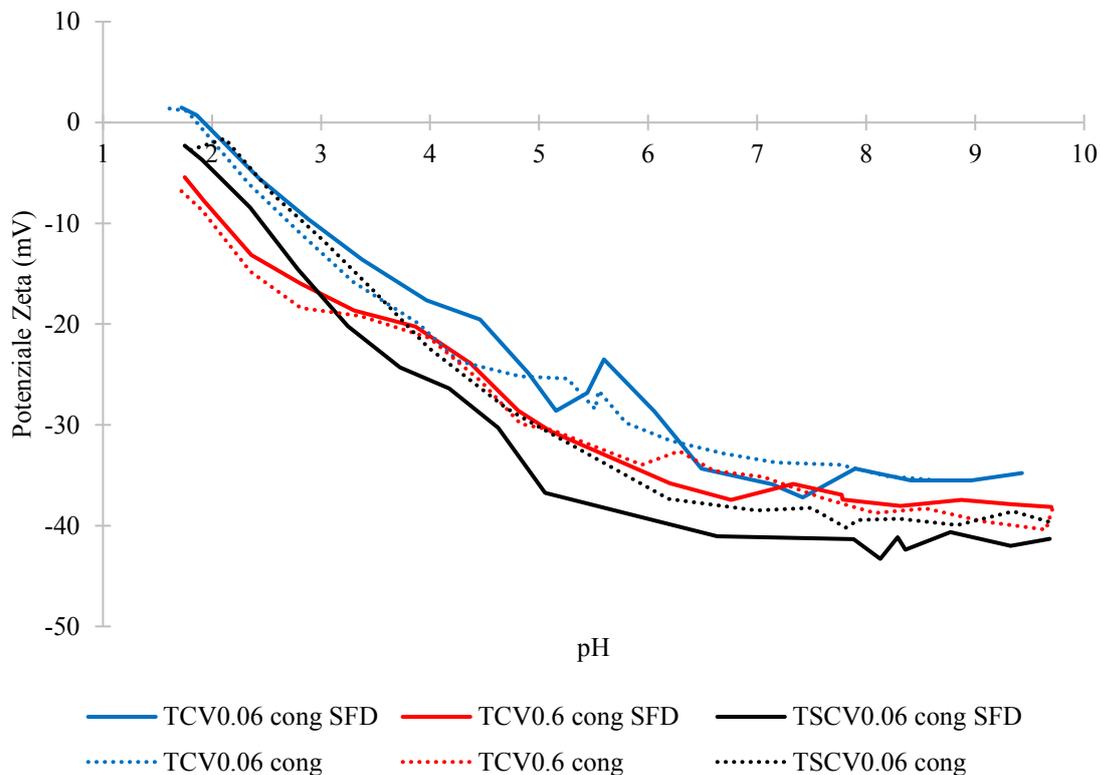


Figura 4.29 – Curve di titolazione potenziale Zeta/pH dei campioni con *C. Vulgaris* congelata prima e dopo la granulazione: TCV0.06 cong SFD, TCV0.6 cong SFD, TSCV0.06 cong SFD

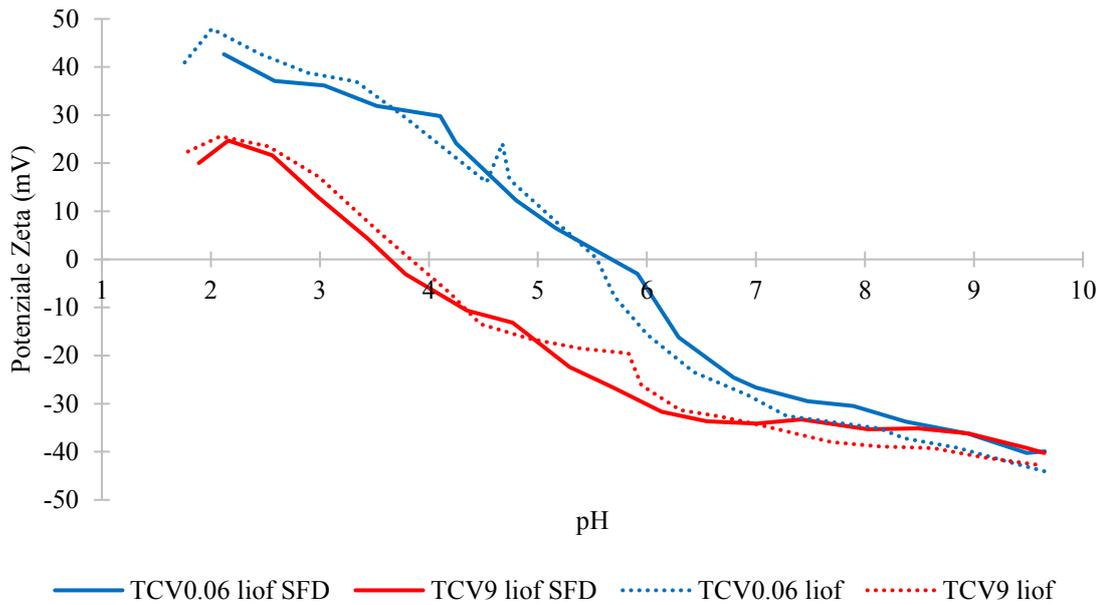


Figura 4.30 – Curve di titolazione potenziale Zeta/pH dei campioni con *C. Vulgaris* liofilizzata prima e dopo la granulazione: TCV0.06 liof SFD, TCV9 liof SFD

Dopo il processo di Spray-Freeze-Drying, se il granulato viene disperso nuovamente in acqua mantiene la carica superficiale che aveva in precedenza, come è possibile verificare dai grafici in *Figura 4.29* per i campioni con alga congelata e *Figura 4.30* per i campioni con alga liofilizzata. Ciò significa che il processo di granulazione lascia inalterate le proprietà di superficie e non dovrebbe compromettere l'attività del sistema.

4.3.1 Misura dell'area superficiale

La *Tabella 4.16* mostra i valori di area superficiale misurata sui componenti singoli granulati (TiO_2 e SiO_2) e sul campione TiO_2 - SiO_2 in rapporto 1:3 (T1S3 SFD).

Tabella 4.16 – Valori di area superficiale dei granulati di TiO_2 e SiO_2

| Campione | SSA (m^2/g) |
|--------------------------------|-------------------------------|
| TiO_2 P25 SFD | 63 |
| SiO_2 LUDOX HS-40 SFD | 208 |
| T1S3 SFD | 223 |

L'area superficiale del granulato a base di TiO_2 non è particolarmente elevata ($63\text{m}^2/\text{g}$) per via della natura aggregata della polvere P25 ottenuta da processi in alta temperatura. Come atteso, dall'accoppiamento con SiO_2 in eccesso, che ha area superficiale $208\text{m}^2/\text{g}$,

si raggiungono valori decisamente superiori e pari a 223m²/g. L'effetto disperdente della silice, già evidenziato in sospensione con un conseguente aumento delle proprietà fotocatalitiche del sistema, sembra mantenersi anche sulla forma granulata, infatti una maggiore area superficiale dovrebbe favorire la reattività della polvere.

Tabella 4.17 – Valori di area superficiale dei campioni granulati

| Campione | Componenti | SSA (m ² /g) |
|---------------------------------|---|-------------------------|
| <i>C. Vulgaris</i> liofilizzata | <i>C. Vulgaris</i> | 2 |
| TCV0.01 cong SFD | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 63 |
| TCV0.06 cong SFD | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 39 |
| TCV0.6 cong SFD | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 37 |
| TSCV0.01 cong SFD | TiO ₂ /SiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 259 |
| TSCV0.06 cong SFD | TiO ₂ /SiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 169 |
| TCV0.03Fe0.3 cong SFD | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ / <i>C. Vulgaris</i> | 56 |
| TCV0.06 liof SFD | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 67 |
| TCV9 liof SFD | TiO ₂ / <i>C. Vulgaris</i> | 70 |
| TCV8Fe0.8 liof SFD | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ / <i>C. Vulgaris</i> | 64 |

La biomassa liofilizzata mostra un valore di SSA di 2m²/g, molto basso e indice dell'elevata aggregazione cellulare già dimostrata dalle caratterizzazioni in sospensione.

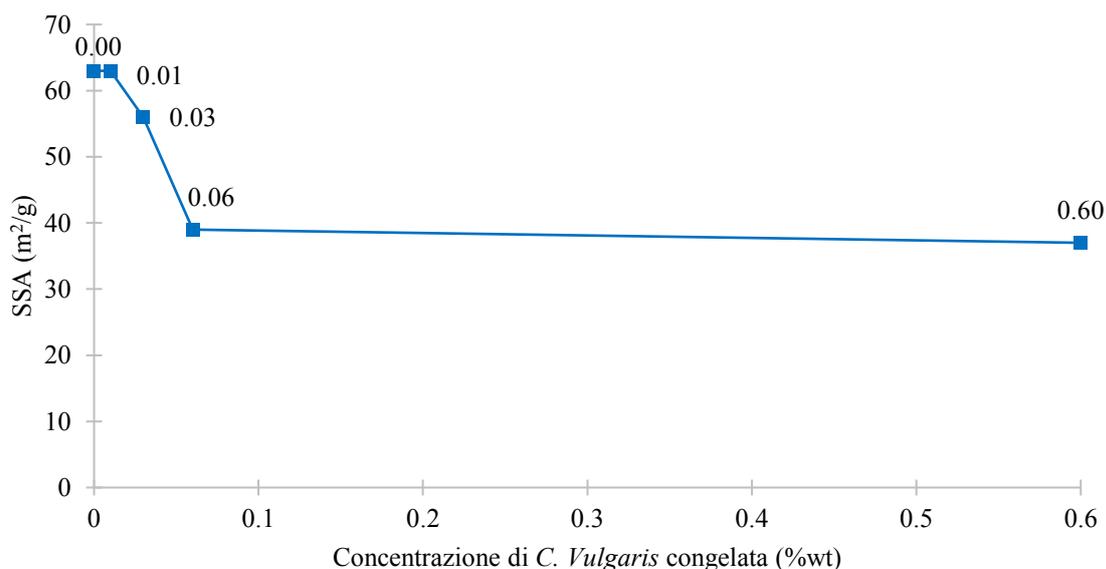


Figura 4.31 – Andamento del valore di SSA in funzione del contenuto di *C. Vulgaris* congelata nei campioni granulati

La distribuzione della biomassa fresca congelata nei granuli, a seguito della sua interazione superficiale con l'ossido, tende a mascherare la nanostruttura della titania, causando un calo di area superficiale all'aumentare del contenuto di alga (*Figura 4.31*). Di contro, i campioni con *C. Vulgaris* liofilizzata hanno area superficiale comparabile a quella della sola TiO₂ SFD.

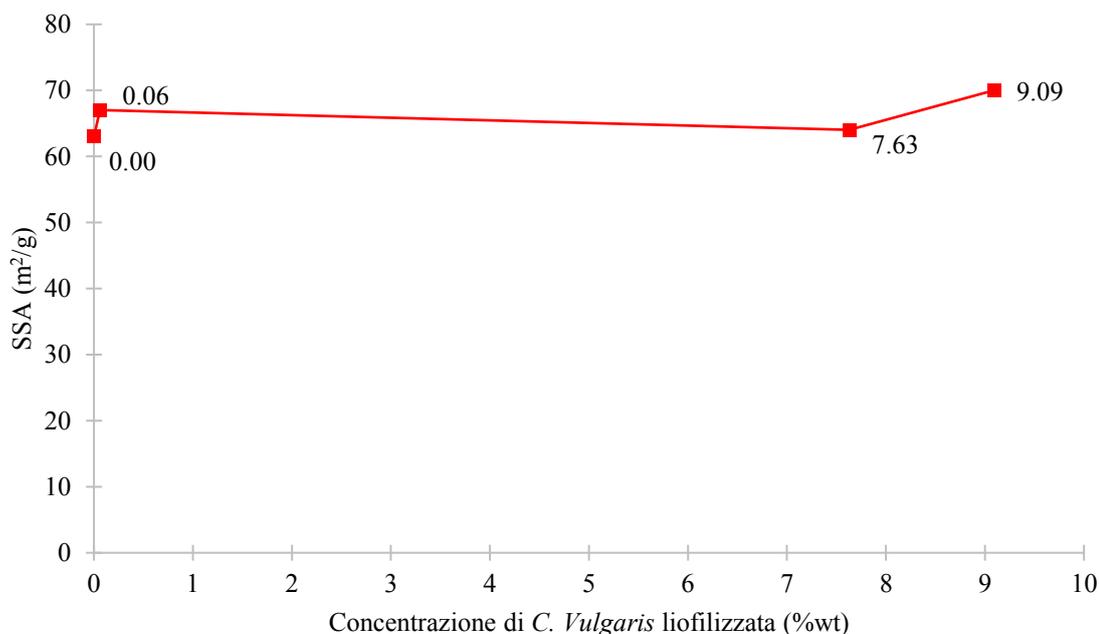


Figura 4.32 – Andamento del valore di SSA in funzione del contenuto di C. Vulgaris liofilizzata nei campioni granulati

Il basso contenuto di magnetite introdotto nei campioni non sembra avere impatto neanche a livello di area superficiale.

Mentre nei granulati a base di TiO₂-SiO₂ la presenza di silice è determinante, mostrando valori di SSA comparabili a quello della SiO₂ e molto superiori ai campioni equivalenti preparati con la sola TiO₂, il trend per l'area superficiale è sempre calante all'aumentare del contenuto di biomassa fresca nel campione.

In grafico è ancora più evidente come all'aumentare del contenuto di biomassa congelata nei campioni granulati il valore di SSA tende a diminuire, questo calo non è direttamente proporzionale alla composizione. Si può raggiungere un contenuto di alga per cui la dispersione su titania non è più efficiente perciò le cellule iniziano ad interagire^[22] le une con le altre limitando il calo di SSA del campione.

4.3.2 Misura dell'energia di band gap

Viene riportato il grafico di Tauc ottenuto per il materiale di riferimento TiO₂ P25.

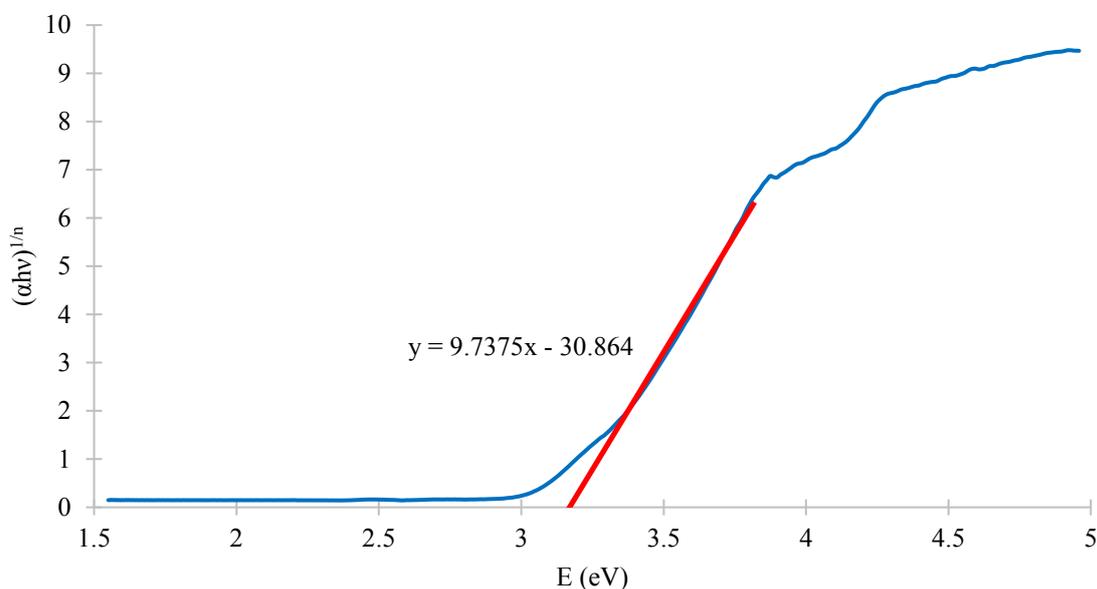


Figura 4.33 – Grafico di Tauc per TiO₂ P25

L'energia di band gap misurata per TiO₂ P25 è 3.17eV, valore coerente con quanto riportato in letteratura 3.2eV^[32]. Seguono in *Tabella 4.18* i risultati ottenuti sui campioni granulati.

Tabella 4.18 – Valori di band gap di TiO₂ P25 e dei campioni granulati

| Campione | Componenti | E _g (eV) |
|-----------------------|--|---------------------|
| TiO ₂ P25 | TiO ₂ | 3.17 |
| T1S3 SFD | TiO ₂ /SiO ₂ | 3.19 |
| TCV0.01 cong SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.18 |
| TCV0.06 cong SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.21 |
| TCV0.6 cong SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.21 |
| TSCV0.01 cong SFD | TiO ₂ /SiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.14 |
| TSCV0.06 cong SFD | TiO ₂ /SiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.21 |
| TCV0.03Fe0.3 cong SFD | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.21 |
| TCV0.06 liof SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.17 |
| TCV9 liof SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.20 |
| TCV8Fe0.8 liof SFD | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ /C. <i>Vulgaris</i> | 3.21 |

La granulazione insieme alla biomassa, che come dimostrato assorbe nella regione del visibile con picchi a 680nm e 440nm, determina un lieve incremento dell'energia di band gap rispetto alla sola titania. Nei campioni a basso contenuto di alga sia liofilizzata che congelata questo effetto non viene rilevato e quando la concentrazione di *C. Vulgaris* cresce si nota un incremento limitato. Nessun valore si discosta significativamente dai 3.2eV teorici della P25.

Prima di studiare i campioni con silice è stato caratterizzato il sistema $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ in rapporto 1:3 granulato tramite Spray-Freeze-Drying. Il valore di 3.19eV dimostra che l'incremento di attività fotocatalitica fornito dalla miscelazione con silice non è dovuto ad un'alterazione del band gap della titania, ciò valida l'ipotesi che l'intervento della silice sia esclusivamente a livello fisico e agisca come disperdente in sospensione mentre nel granulato determina un incremento di area superficiale del sistema.

4.3.3 Analisi morfologica dei granulati

Le immagini riportate in *Figura 4.34* rappresentano i granuli ottenuti tramite Spray-Freeze-Drying di una sospensione di TiO_2 P25 3%wt. Come si può osservare la granulazione della titania permette di ottenere granuli micrometrici, ma nanostrutturati come evidenziato dall'ingrandimento sul singolo granulo che permette di apprezzare la nanostruttura interna.

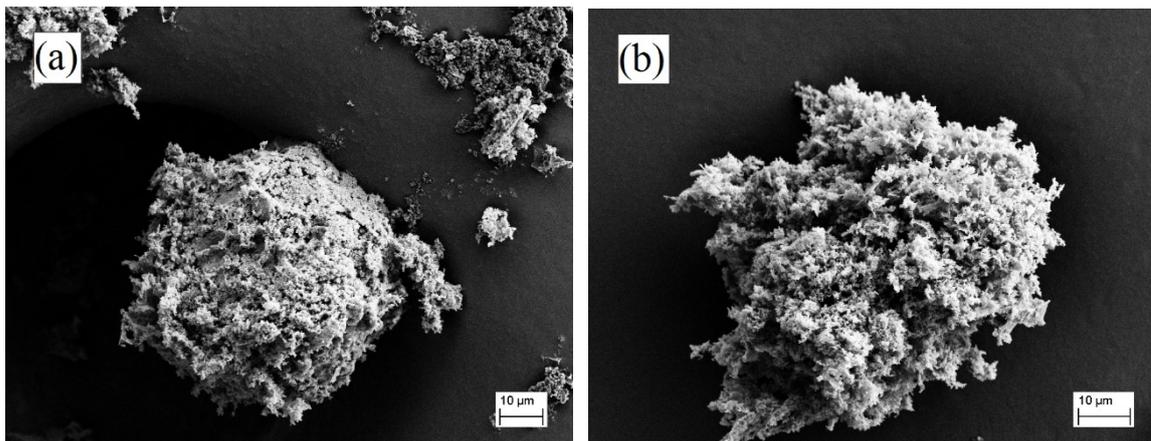


Figura 4.34 – Immagini di TiO_2 P25 granulata tramite Spray-Freeze-Drying

La *Figura 4.35* evidenzia l'effetto della granulazione sulla morfologia. Le immagini (a) e (b) corrispondono al campione TCV0.01 cong in sospensione prevalentemente aggregato, mentre le immagini (c) e (d) mostrano lo stesso campione dopo Spray-Freeze-Drying caratterizzato dalla presenza dei tipici granuli micrometrici nanostrutturati, dove

sono visibili le cavità sub-micrometriche. I granuli prodotti mostrano morfologia variabile e ridotta sfericità e compattezza, come è tipico della TiO₂ P25 sottoposta a questo processo.

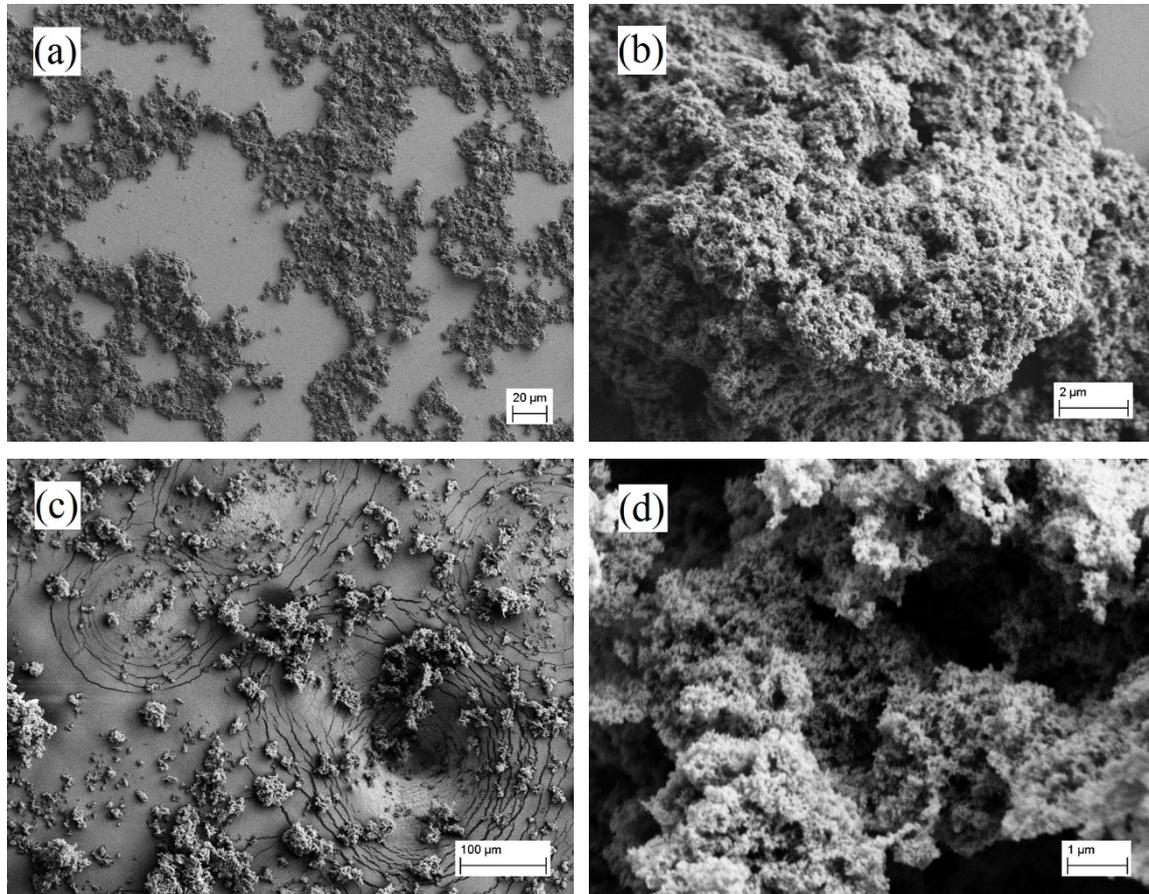


Figura 4.35 – Campione TCV0.01 cong in sospensione (a), (b) e TCV0.01 cong SFD granulato (c), (d)

Come mostrato in *Figura 4.36* l'aggiunta di magnetite o l'utilizzo di biomassa liofilizzata non porta a migliorare il grado di compattezza e granulazione. Nei campioni contenenti *C. Vulgaris* liofilizzata, la biomassa non viene rilevata nelle immagini, probabilmente a causa di una minore interazione tra fase inorganica e biomassa, l'alga rimane aggregata e racchiusa all'interno della struttura inorganica.

Aumentando la concentrazione di biomassa fresca congelata è possibile, invece, individuare le cellule di *C. Vulgaris* contornate dalla nanostruttura inorganica. Le immagini (*Figura 4.37*) evidenziano per il campione TCV0.6 cong SFD, granulato a più altro contenuto di alga fresca, le cellule di *C. Vulgaris*, immerse nella matrice inorganica.

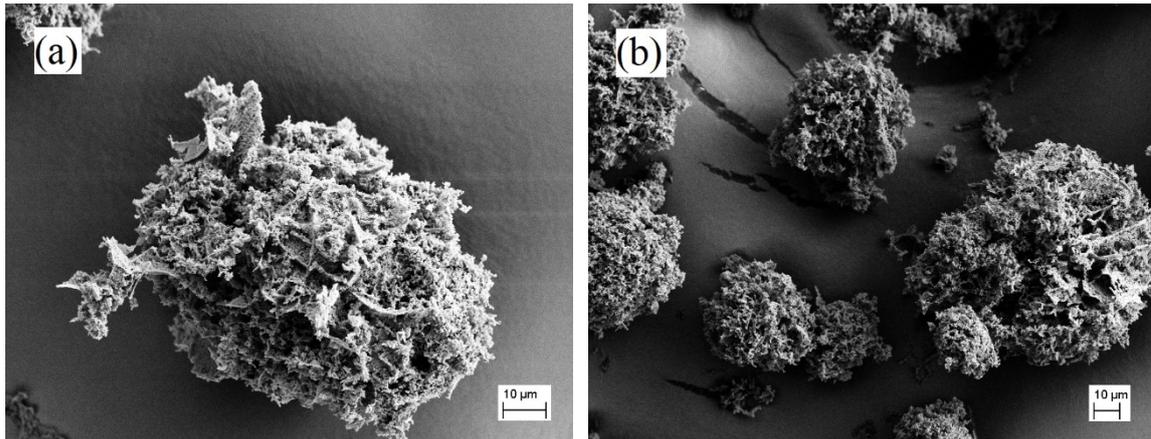


Figura 4.36 – Campioni TCV0.06 liof SFD (a) e TCV0.03Fe0.3 cong SFD (b)

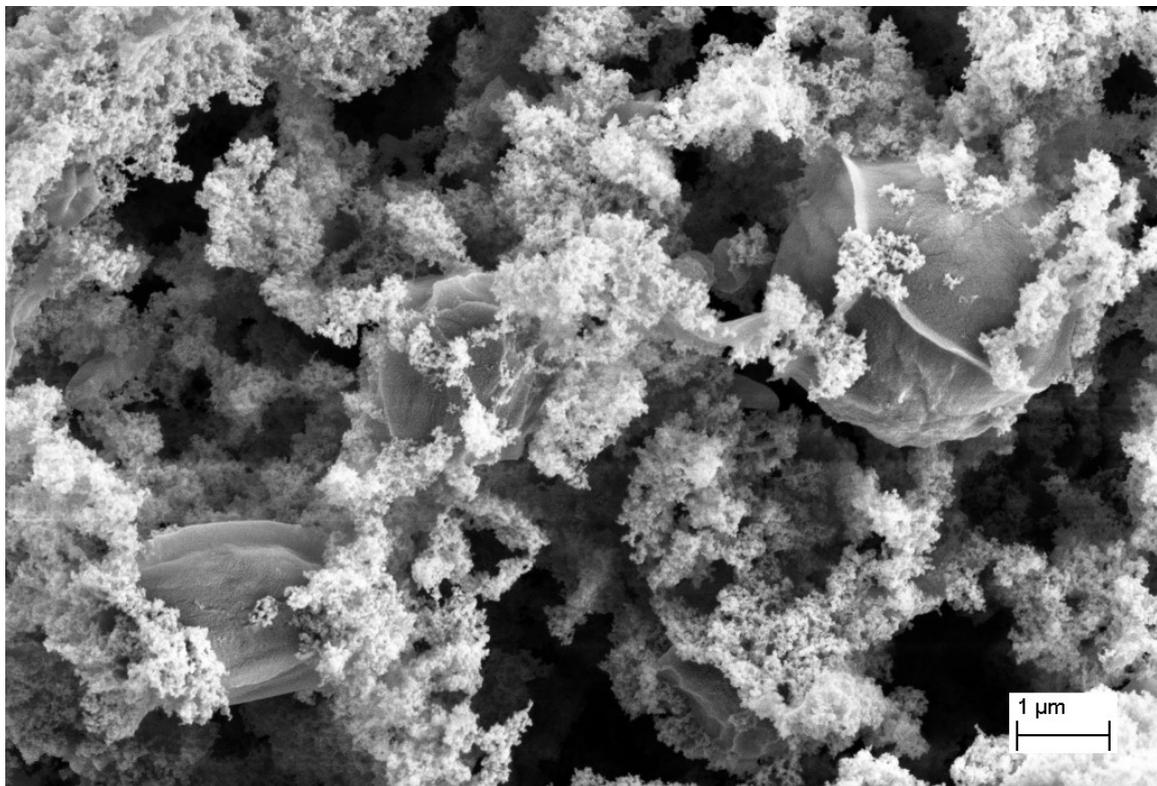


Figura 4.37 – Campione TCV0.6 cong SFD

L'aggiunta di silice consente di ottenere granuli più compatti, regolari e sferici, sia quando miscelata solo a TiO_2 (*Figura 4.38*), sia nei campioni granulati in presenza di alga (*Figura 4.39*). Infatti, aggiungendo SiO_2 le strutture ottenute appaiono più regolari ed è possibile valutare dall'analisi di immagine il diametro medio di $37\mu\text{m}$ e valori compresi tra $1\text{-}150\mu\text{m}$.

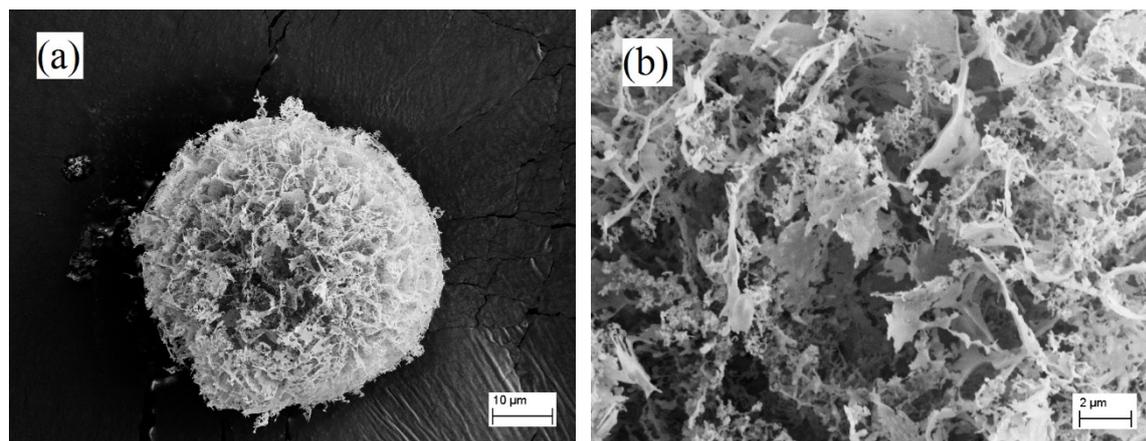


Figura 4.38 – Sospensione TiO_2-SiO_2 1:3 granulata tramite Spray-Freeze-Drying

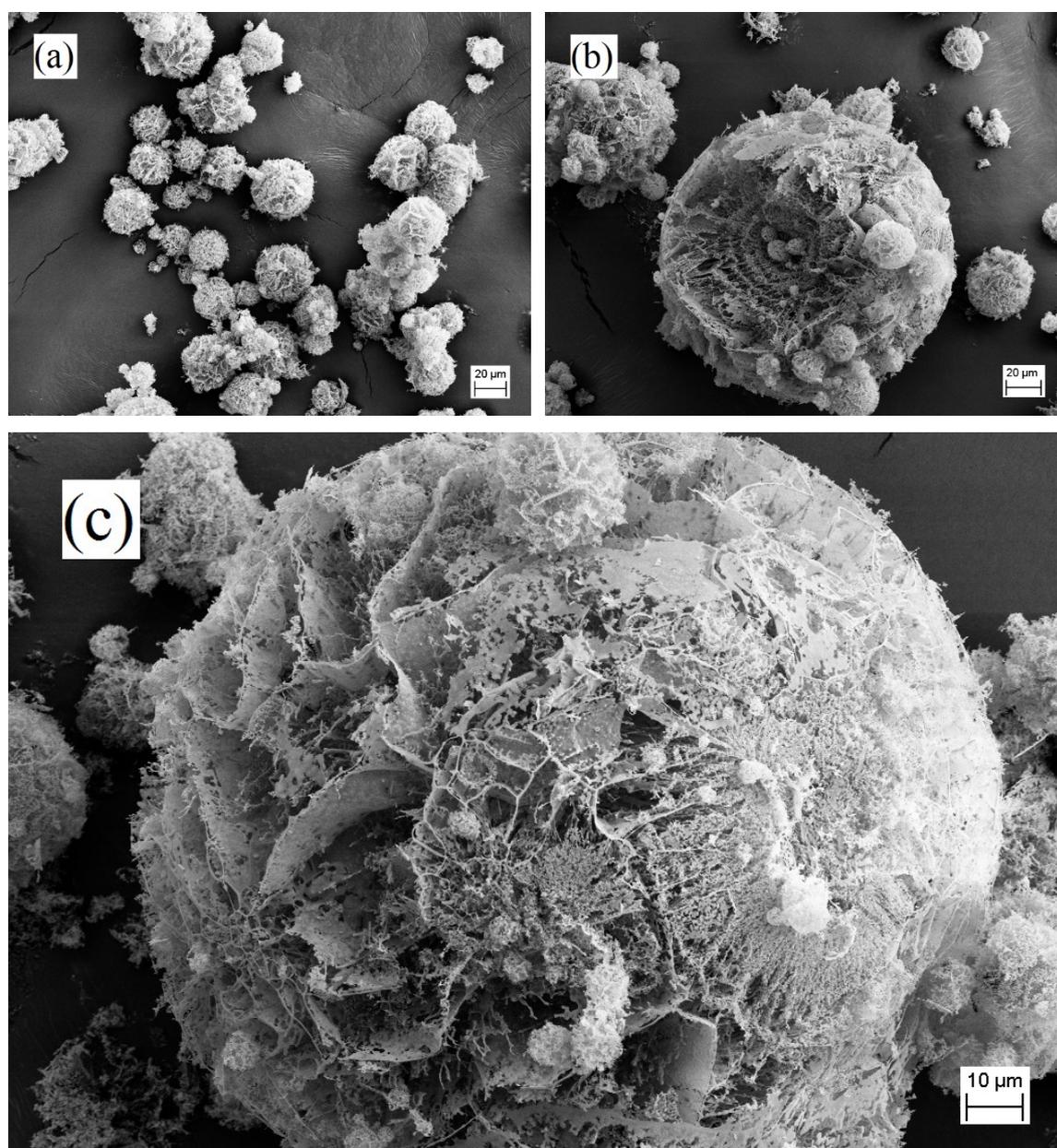


Figura 4.39 – Immagini dei campioni TSCV0.01 SFD (a) e TSCV0.06 SFD (b), (c)

4.3.4 Analisi di distribuzione dei singoli elementi nel granulato

L'impiego della sonda a dispersione di energia ha permesso di mappare gli elementi all'interno dei granuli e valutare l'omogeneità di distribuzione dei componenti.

La *Figura 4.40* mostra la mappa EDS del campione TCV0.6 cong SFD, ed evidenzia l'omogenea distribuzione del titanio e del carbonio, quest'ultimo correlabile alla presenza di biomassa.

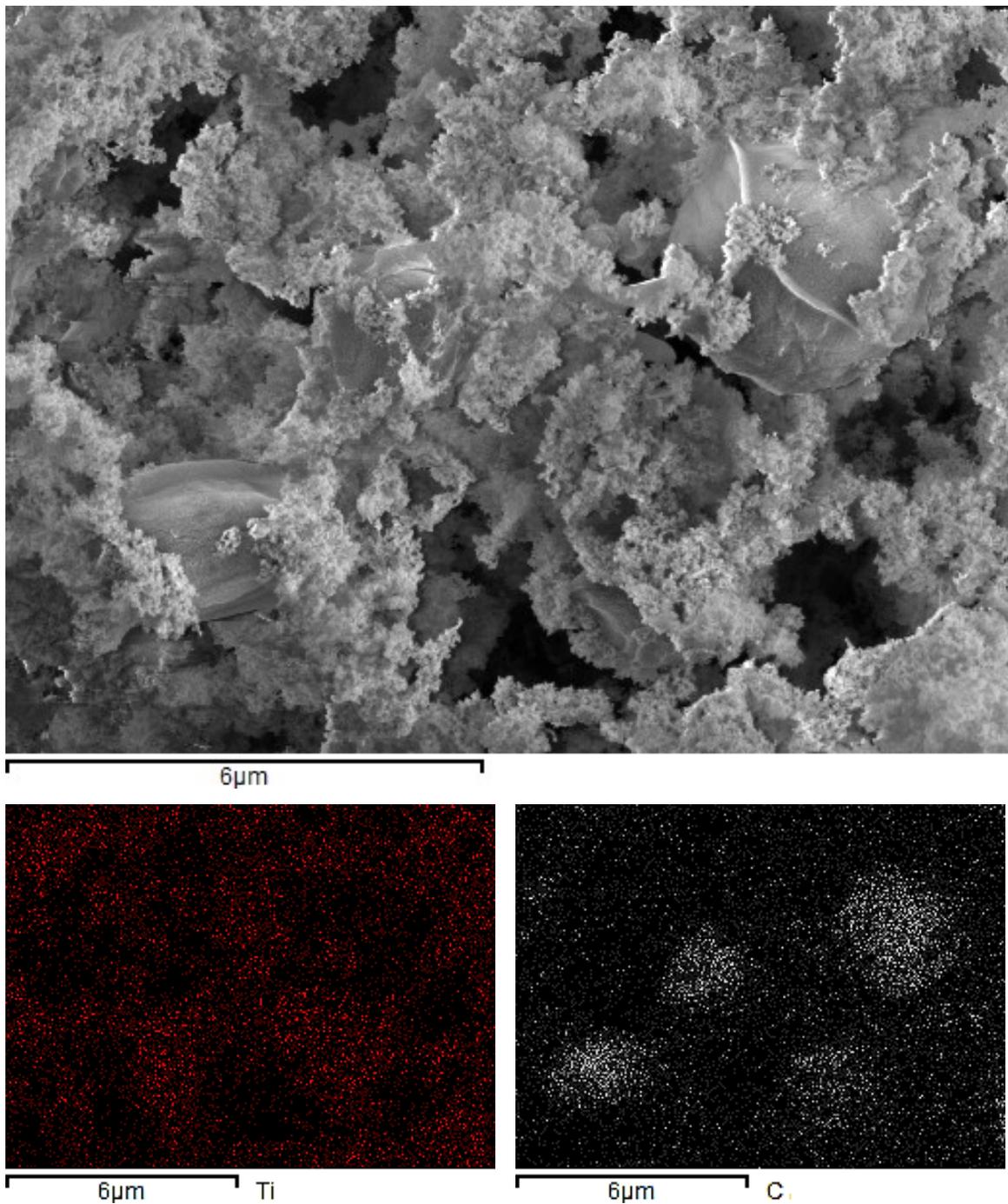


Figura 4.40 – Mappa EDS di TCV0.6 cong SFD

L'immagine ad alto ingrandimento di TCV0.6 cong SFD, il campione granulato a maggiore concentrazione di microalga congelata, consente di concentrarsi sul dettaglio di un singolo granulo nel quale è possibile individuare quattro unità cellulari.

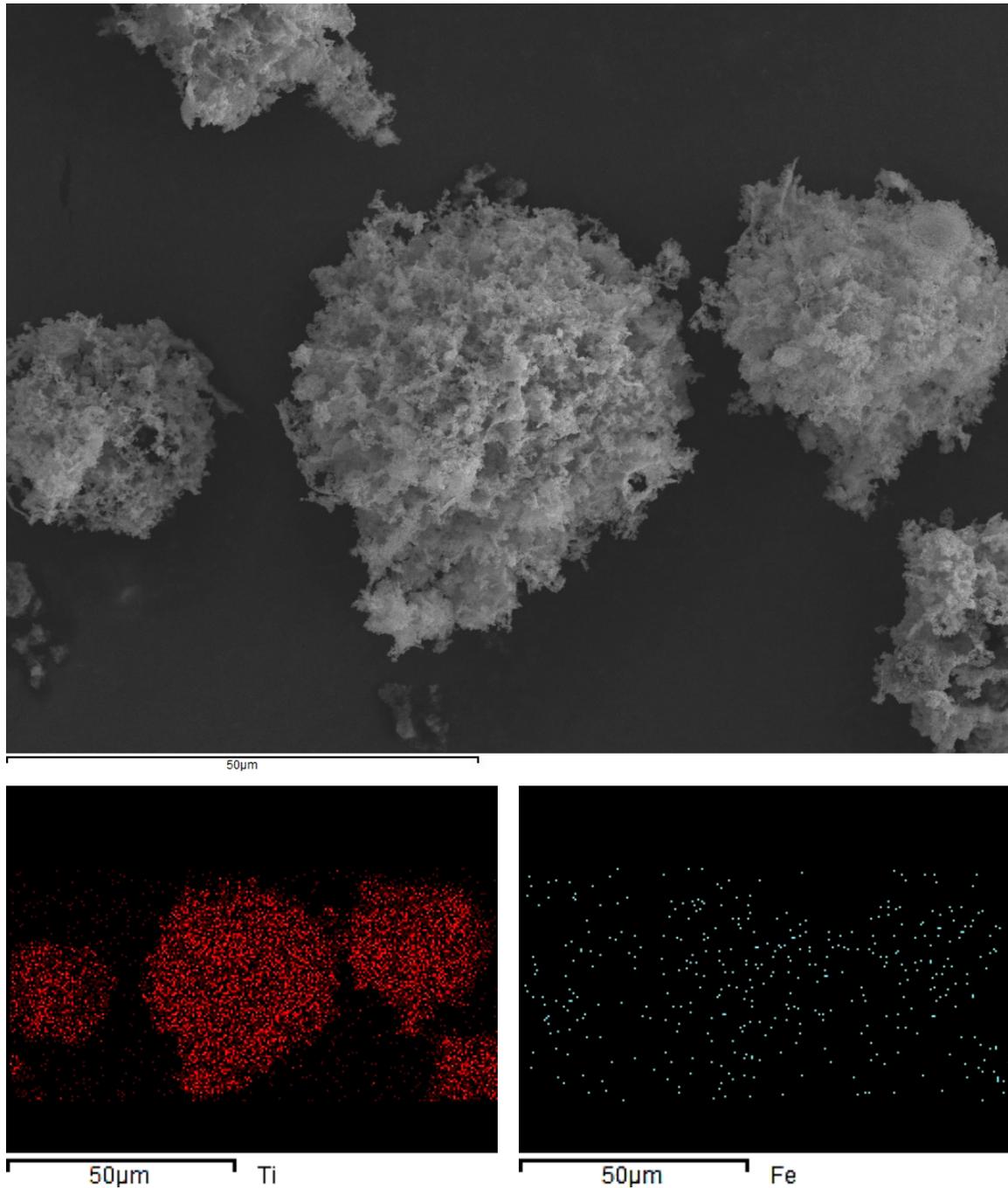


Figura 4.41 – Mappa EDS di TCV0.03Fe0.3 cong SFD

Nel campione contenente magnetite, TCV0.03Fe0.3 cong SFD, la mappa EDS conferma come il ferro sia molto meno concentrato rispetto al titanio, ma omogeneamente distribuito sulla superficie del campione.

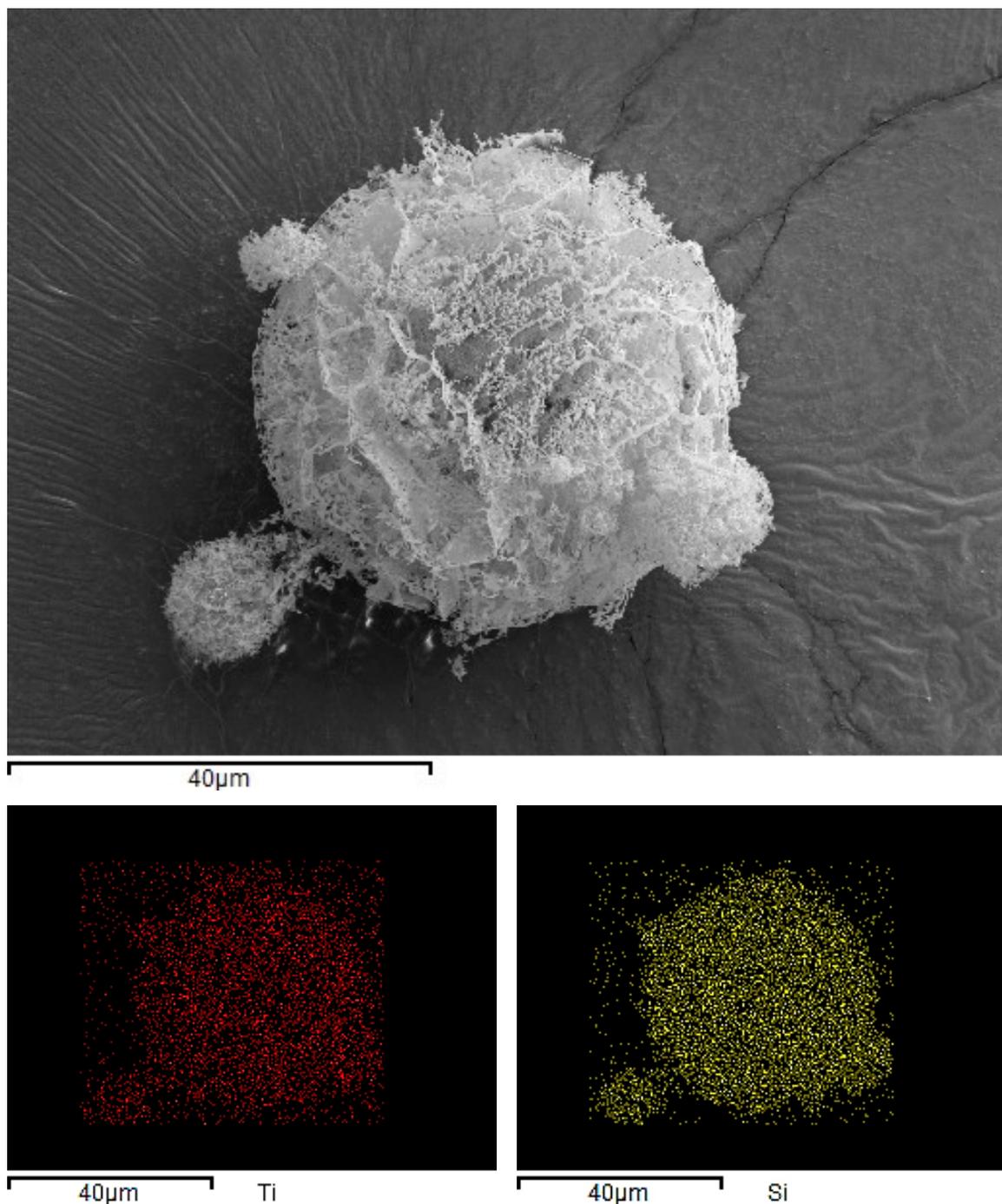


Figura 4.42 – Mappa EDS di TSCV0.06 con SFD

In Figura 4.42 si può osservare la distribuzione omogenea di titania e silice, con prevalenza di silice nel sistema.

4.4 Caratterizzazione funzionale dei granulati

Sulle polveri ottenute dal trattamento di Spray-Freeze-Drying sono stati ripetuti i test di biosorbimento del rame e di attività fotocatalitica. In questo modo è possibile verificare come la granulazione influenzi le proprietà del sistema.

4.4.1 Biosorbimento di Cu^{2+}

In presenza di granulati il test viene effettuato pesando una quantità di campione tale da garantire una concentrazione di 2.5g/L.

Tabella 4.19 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} a 1h di permanenza, confronto tra i campioni in sospensione e granulati, i risultati sono riportati come $\text{mgCu}^{2+}/\text{g}_{\text{campione}}$

| Campione | Componenti | Assorbimento ($\text{mgCu}^{2+}/\text{g}_{\text{campione}}$) | |
|-------------------|---|--|-----------|
| | | Sospensione | Granulato |
| TCV0.01 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 1.66 | 1.36 |
| TCV0.06 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 3.29 | 3.00 |
| TCV0.6 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 3.69 | 3.72 |
| TSCV0.01 cong | $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2/\text{C. V.}$ | 1.59 | 1.39 |
| TSCV0.06 cong | $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2/\text{C. V.}$ | 3.42 | 2.86 |
| TCV0.03Fe0.3 cong | $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C. V.}$ | 2.75 | 2.61 |
| TCV0.06 liof | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 0.62 | 0.58 |
| TCV9 liof | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 1.73 | 1.33 |
| TCV8Fe0.8 liof | $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C. V.}$ | 1.77 | 1.97 |

In prima battuta emerge che gli andamenti al variare della composizione osservati per i campioni in sospensione sono confermati per i corrispondenti campioni granulati.

In particolare, si conferma che l'equilibrio viene raggiunto già ad un'ora di permanenza. Solo i sistemi con *C. Vulgaris* fresca congelata permettono di ottenere elevati valori di biosorbimento e aumentando la concentrazione di alga si rivela un effetto sinergico non lineare rispetto alla capacità assorbente della biomassa.

I grafici in *Figura 4.43* per i campioni con biomassa congelata e *Figura 4.44* liofilizzata, mettono a confronto i risultati prima e dopo granulazione per determinare quale impatto ha questo processo sulle capacità di biosorbimento del rame dei sistemi in analisi.

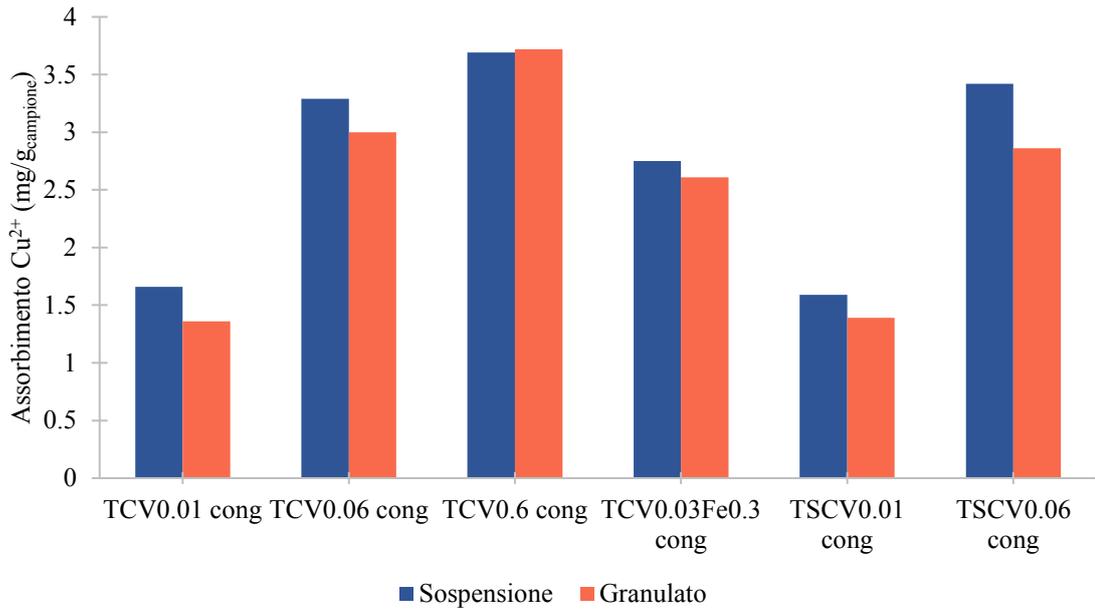


Figura 4.43 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} (rispetto all'unità di massa del campione) a 1h di permanenza, confronto tra i campioni prodotti da biomassa congelata in sospensione e granulati

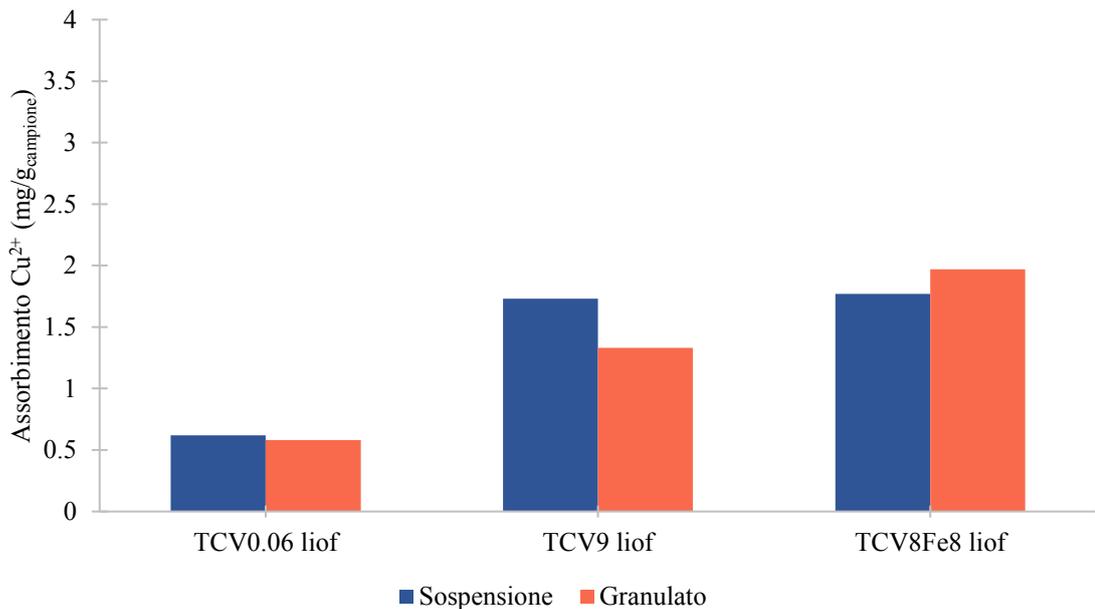


Figura 4.44 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} (rispetto all'unità di massa del campione) a 1h di permanenza, confronto tra i campioni prodotti da biomassa liofilizzata in sospensione e granulati

Come si può osservare dai risultati in *Tabella 4.19*, in *Figura 4.43* e in *Figura 4.44*, le prestazioni sono spesso sovrapponibili, con un leggero calo di attività (mediamente inferiore al 9%) probabilmente dovuto al processo di granulazione. È possibile infatti che parte di *C. Vulgaris* rimanga intrappolata all'interno della struttura e perciò risulti meno

disponibile per il biosorbimento. Tuttavia, il moderato abbassamento delle prestazioni in biosorbimento è facilmente compensato da una migliore stabilità e maneggiabilità del materiale, aspetto fondamentale nell’ottica di una potenziale applicazione pratica.

Tabella 4.20 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} a 1h di permanenza, confronto tra campioni in sospensione e granulati, i risultati sono riportati come $\text{mg}_{\text{Cu}^{2+}}/\text{g}_{\text{C. Vulgaris}}$

| Campione | Componenti | Assorbimento ($\text{mg}_{\text{Cu}^{2+}}/\text{g}_{\text{C. Vulgaris}}$) | |
|-------------------------|---|---|-----------|
| | | Sospensione | Granulato |
| <i>C. Vulgaris</i> cong | | 103 | |
| TCV0.01 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 7550 | 8650 |
| TCV0.06 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 4230 | 4460 |
| TCV0.6 cong | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 548 | 553 |
| TSCV0.01 cong | $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 9720 | 7960 |
| TSCV0.06 cong | $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 4990 | 4050 |
| TCV0.03Fe0.3 cong | $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C. Vulgaris}$ | 5930 | 6870 |
| <i>C. Vulgaris</i> liof | | 15.31 | |
| TCV0.06 liof | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 12.5 | 14.6 |
| TCV9 liof | $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ | 11.2 | 11.4 |
| TCV8Fe0.8 liof | $\text{TiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C. Vulgaris}$ | 13.7 | 21.2 |

La Tabella 4.20 mostra come l’assorbimento specifico per unità di massa di *C. Vulgaris* nei campioni $\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$ in forma granulata tenda ad aumentare rispetto al valore in sospensione. Questo si verifica poiché in forma granulata il contributo al biosorbimento della TiO_2 è minore rispetto alla sospensione (viene sottratto come bianco il valore di TiO_2 SFD pari a 0.33mg/g rispetto a 0.78mg/g misurato in sospensione). Ciò dimostra che, per quanto riguarda il biosorbimento, la granulazione ha impatto negativo principalmente sulla TiO_2 . Accade il contrario, invece, nei campioni con silice, che vedono un aumento del contributo al biosorbimento da parte di SiO_2 granulata e di conseguenza una leggera flessione di biosorbimento a carico dell’alga dopo granulazione (Figura 4.45). Infatti, come osservato dalle immagini SEM, il trattamento di Spray-Freeze-Drying produce dei granuli migliori che tendono ad inglobare una porzione di cellule di *C. Vulgaris* e ciò determina un leggero calo di capacità di biosorbimento.

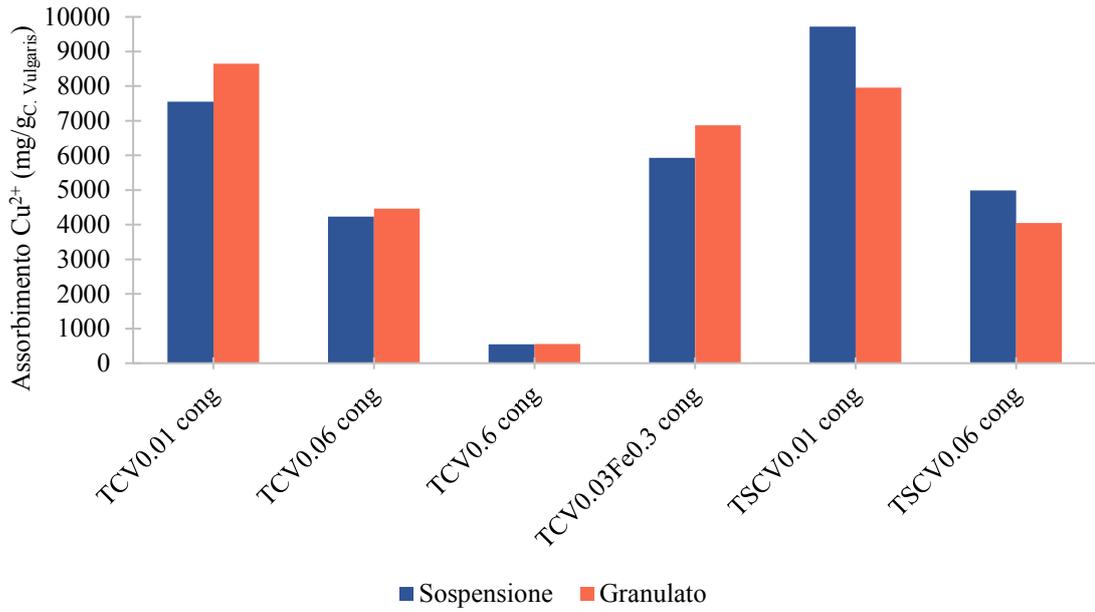


Figura 4.45 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} (rispetto all'unità di massa di *C. Vulgaris*) a 1h di permanenza, confronto tra i campioni prodotti da biomassa congelata in sospensione e granulati

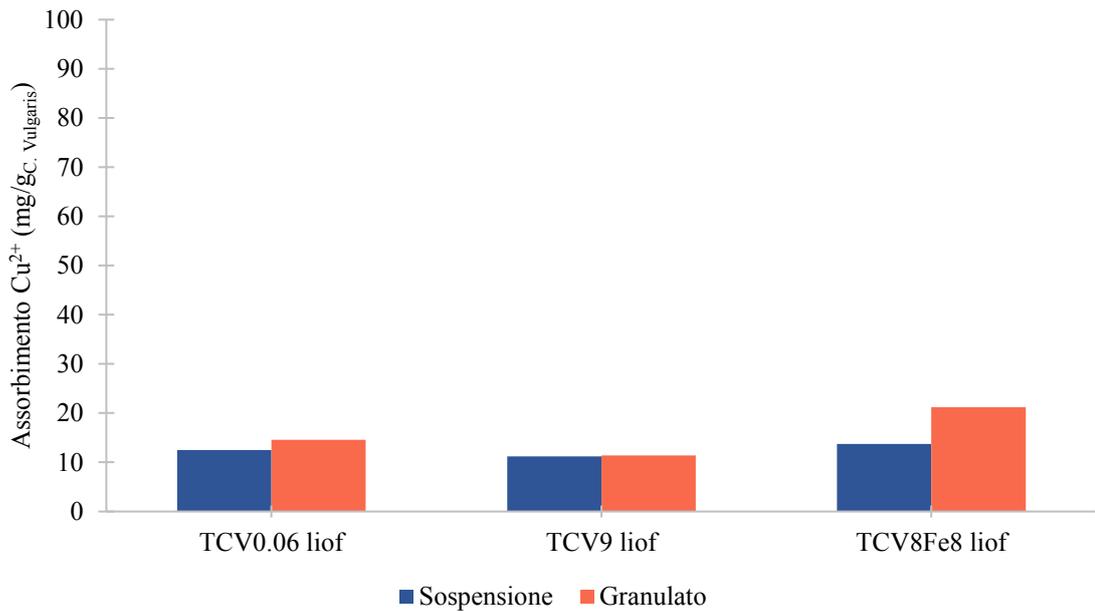


Figura 4.46 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} (rispetto all'unità di massa di *C. Vulgaris*) a 1h di permanenza, confronto tra i campioni prodotti da biomassa liofilizzata in sospensione e granulati

I risultati ottenuti (Figura 4.47) per i campioni con biomassa congelata si confermano, anche per i granulati, abbondantemente superiori alla media ponderale calcolata rispetto ai singoli elementi. I dati confermano, anche sulle polveri, l'effetto sinergico indotto dalla dispersione delle cellule di *C. Vulgaris* sulla superficie della titania.

Di contro, come per i campioni in sospensione, i granulati ottenuti da biomassa liofilizzata mostrano valori di biosorbimento confrontabili con la media ponderale attesa (Figura 4.48), non evidenziando effetti sinergici.

Tabella 4.21 – Valori di assorbimento di Cu^{2+} calcolati come media ponderale dei singoli componenti e confronto con i risultati sperimentali ottenuti dai campioni

| Campione | Componenti | Assorbimento ($mg_{Cu^{2+}}/g_{campione}$) | Media ponderale ($mg_{Cu^{2+}}/g_{campione}$) |
|-----------------------|-----------------------|---|--|
| TCV0.01 cong SFD | $TiO_2/C. Vulgaris$ | 1.36 | 0.34 |
| TCV0.06 cong SFD | $TiO_2/C. Vulgaris$ | 3.00 | 0.39 |
| TCV0.6 cong SFD | $TiO_2/C. Vulgaris$ | 3.72 | 1.04 |
| TSCV0.01 cong SFD | $TiO_2/SiO_2/C. V.$ | 1.39 | 0.44 |
| TSCV0.06 cong SFD | $TiO_2/SiO_2/C. V.$ | 2.86 | 0.49 |
| TCV0.03Fe0.3 cong SFD | $TiO_2/Fe_3O_4/C. V.$ | 2.61 | 0.38 |
| TCV0.06 liof SFD | $TiO_2/C. Vulgaris$ | 0.58 | 0.34 |
| TCV9 liof SFD | $TiO_2/C. Vulgaris$ | 1.33 | 1.69 |
| TCV8Fe0.8 liof SFD | $TiO_2/Fe_3O_4/C. V.$ | 1.97 | 1.51 |

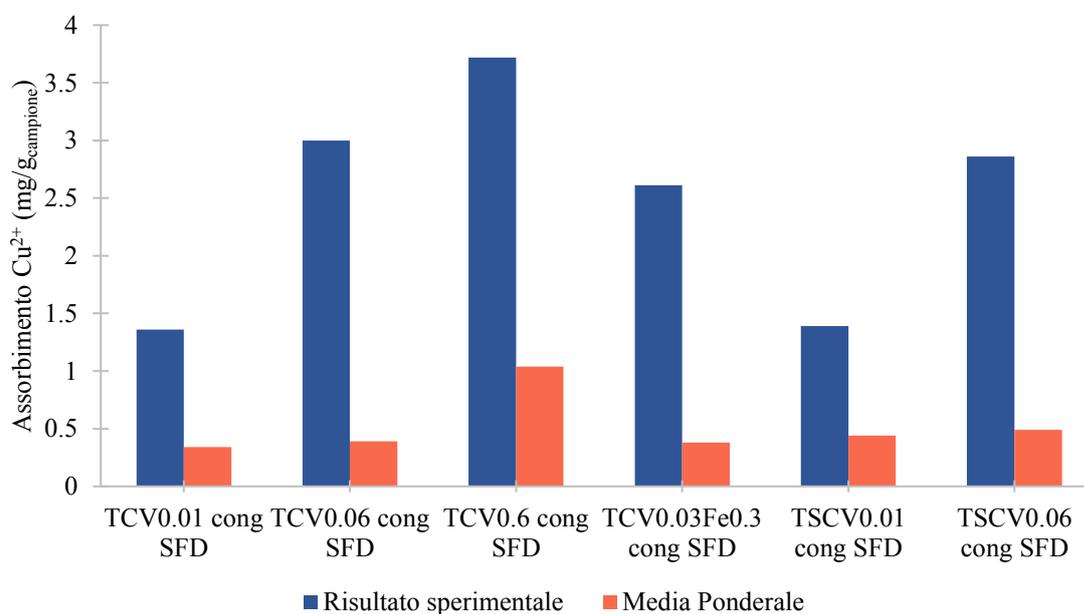


Figura 4.47 – Confronto dei valori di assorbimento di Cu^{2+} calcolati come media ponderale dei singoli componenti con i risultati sperimentali ottenuti dai campioni granulati con *C. Vulgaris* congelata

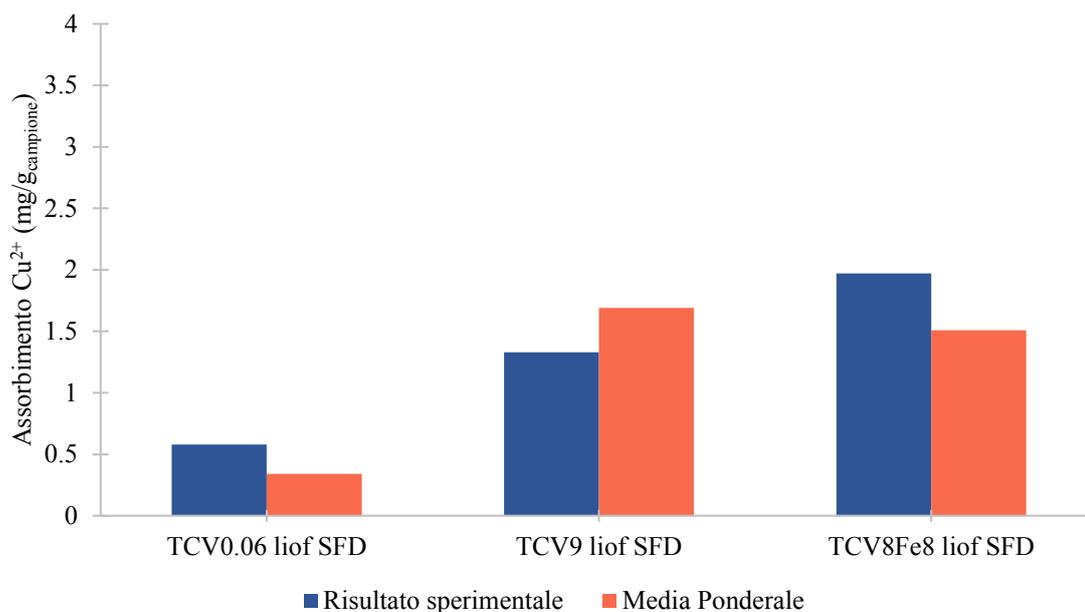


Figura 4.48 – Confronto dei valori di assorbimento di Cu^{2+} calcolati come media ponderale dei singoli componenti con i risultati sperimentali ottenuti dai campioni granulati con *C. Vulgaris* liofilizzata

4.4.2 Studio dell'attività fotocatalitica

Analogamente alle prestazioni fotocatalitiche misurate in sospensione, anche in forma granulata in presenza di *C. Vulgaris* fresca congelata, si assiste ad una progressiva diminuzione della cinetica di fotodegradazione, già a partire da una quantità di alga pari allo 0.01%wt, abbassandosi ulteriormente fino al valore dello 0.06%wt per mantenersi costante fino allo 0.6%wt. Invece, nei campioni a base di biomassa liofilizzata si confermano cinetiche di fotodegradazione comparabili alla sola TiO_2 P25 SFD, dovute alla non interazione superficiale tra le due fasi e all'assenza di effetti sinergici già a basse concentrazioni di alga.

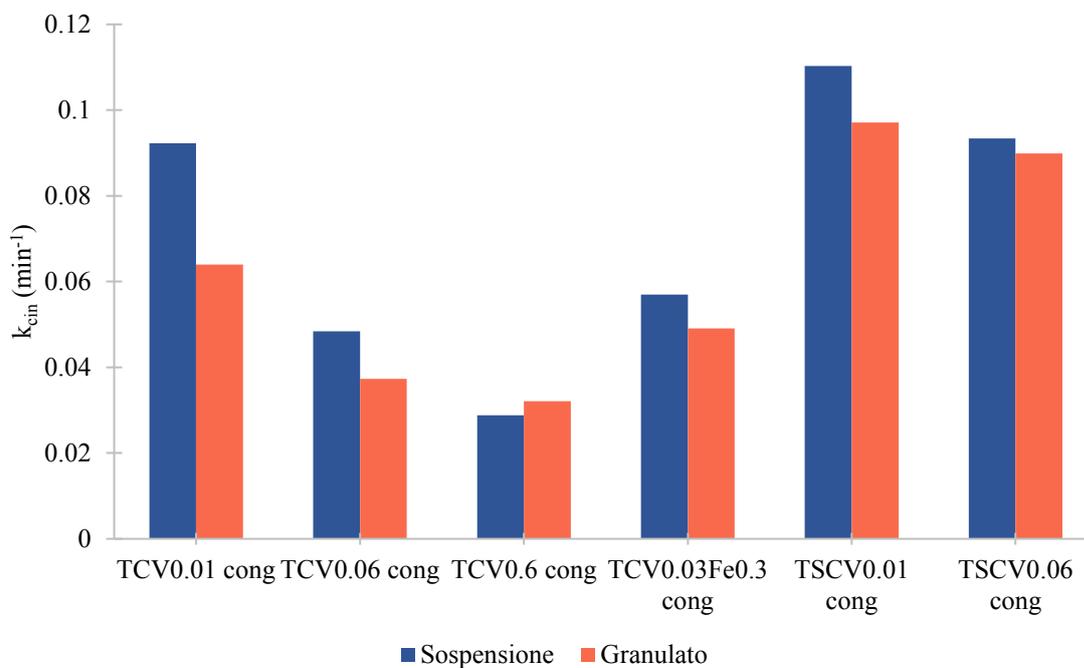
Tabella 4.22 – Valori di conversione di RhB e di costante cinetica di TiO_2 in sospensione e granulata

| Campione | Conversione % (a 60 minuti) | k_{cin} [min^{-1}] |
|------------------------|-----------------------------|--|
| TiO_2 P25 | 99.16 | $1.04 \cdot 10^{-1}$ |
| TiO_2 P25 SFD | 98.85 | $8.73 \cdot 10^{-2}$ |

Tabella 4.23 – Valori di conversione di RhB e costante cinetica dei campioni granulati

| Campione | Componenti | Conversione % (a 60 minuti) | k_{cin} [min^{-1}] |
|-----------------------|--|--------------------------------|--------------------------|
| TCV0.01 cong SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 98.37 | $6.40 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV0.06 cong SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 92.38 | $3.73 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV0.6 cong SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 88.17 | $3.21 \cdot 10^{-2}$ |
| TSCV0.01 cong SFD | TiO ₂ /SiO ₂ /C. <i>V.</i> | 97.10 | $9.71 \cdot 10^{-2}$ |
| TSCV0.06 cong SFD | TiO ₂ /SiO ₂ /C. <i>V.</i> | 97.01 | $8.99 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV0.03Fe0.3 cong SFD | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ /C. <i>V.</i> | 96.03 | $4.91 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV0.06 liof SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 98.50 | $7.79 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV9 liof SFD | TiO ₂ /C. <i>Vulgaris</i> | 96.64 | $5.44 \cdot 10^{-2}$ |
| TCV8Fe0.8 liof SFD | TiO ₂ /Fe ₃ O ₄ /C. <i>V.</i> | 98.80 | $7.33 \cdot 10^{-2}$ |

Come dimostrato in sospensione, anche sul granulato l'introduzione di nanoparticelle di SiO₂ nel sistema titania-alga, consente di sopperire efficacemente al calo di attività fotocatalitica di TiO₂ accoppiata alla biomassa congelata. I campioni preparati con silice, infatti come si può vedere in *Tabella 4.23*, mantengono una costante cinetica maggiore dei corrispettivi campioni senza.


 Figura 4.49 – Valori di costante cinetica dei campioni con *C. Vulgaris* congelata, confronto tra sospensione e granulati

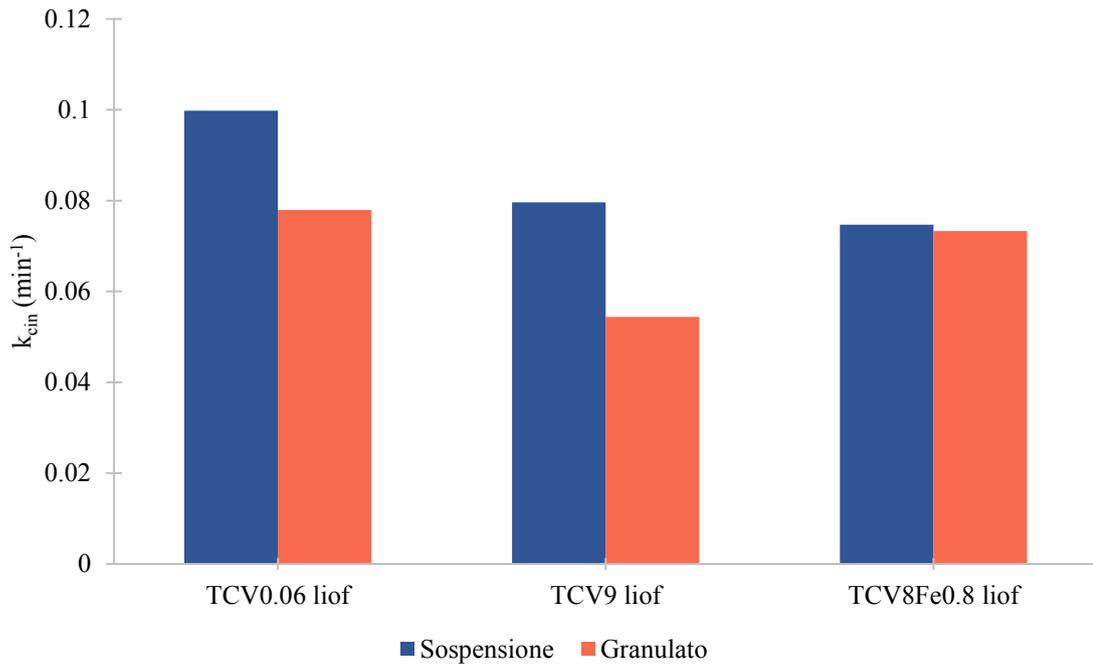


Figura 4.50 – Valori di costante cinetica dei campioni con *C. Vulgaris* liofilizzata, confronto tra sospensione e granulati

Dal confronto diretto tra sospensione e granulato in termini di fotoattività, si osserva che i campioni granulati mantengono una buona attività fotocatalitica, ma come atteso, rispetto ai campioni in sospensione vi è un leggero calo di performance, dovuto alla riduzione dei gradi di libertà delle particelle e alla maggiore difficoltà incontrata dalla radiazione luminosa a propagarsi all'interno delle cavità dei granuli (Figura 4.49 e Figura 4.50).

Dall'analisi delle performance funzionali valutate, il campione TSCV0.06 con SFD emerge come migliore compromesso tra capacità di biosorbimento e attività fotocatalitica. Tali caratteristiche, unite alla facile maneggevolezza tipica dei granulati, lo promuovono come candidato ideale per applicazioni nel settore della biorimediazione.

Capitolo 5 – Conclusioni

Lo studio condotto in questa tesi è stato finalizzato a sviluppare un sistema ibrido (organico/inorganico) impiegabile nel trattamento terziario di reflui acquosi industriali, al fine di ottenere un materiale facilmente maneggiabile, che consenta di trattare gli effluenti abbattendo il contenuto di metalli pesanti e di inquinanti organici. A tale scopo, si è progettato un sistema in grado di combinare le proprietà fotocatalitiche della titania nanoparticellare con le capacità di biosorbimento della microalga *C. Vulgaris* (microalga nota in letteratura^[2,24,49] nel settore della biorimediazione).

L'accoppiamento delle due fasi ($\text{TiO}_2/\text{C. Vulgaris}$) è stato condotto mediante processo di eterocoagulazione in sospensione e promosso dal fatto che i due componenti possiedono carica superficiale di segno opposto, negativa per *C. Vulgaris* e positiva per TiO_2 . Le curve potenziale Zeta/pH hanno dimostrato che è sufficiente una percentuale minima di biomassa (0.06%wt) per ricoprire la superficie di ossido e restituire un profilo di carica del sistema misto sovrapponibile a quello della sola microalga.

Le sospensioni sono state successivamente processate attraverso la rimozione del solvente via Spray-Freeze-Drying, così da ottenere granulati micrometrici porosi e maneggevoli, preservando la nanostruttura tipica della TiO_2 P25.

La biomassa algale è stata introdotta in due forme diverse: fresca congelata (sospensione direttamente estratta dal fotobioreattore) e liofilizzata (polvere ottenuta dal processo di liofilizzazione della sospensione fresca).

Le caratterizzazioni eseguite sui campioni ibridi a livello di sospensione (ELS, DLS) e di granulato (BET, SEM-FEG, SEM-EDS), insieme ai test funzionali (assorbimento di Cu^{2+} e fotodegradazione di RhB) hanno evidenziato una forte differenza di prestazioni tra i campioni contenenti biomassa fresca congelata o liofilizzata. Infatti, come evidenziato dalle curve di potenziale Zeta, solo *C. Vulgaris* fresca dimostra una buona interazione con la matrice inorganica, disperdendosi in maniera efficace sulla superficie della titania e inducendo un effetto sinergico positivo. Infatti, l'ottimale interazione e dispersione di biomassa su TiO_2 , ne incrementa esponenzialmente la superficie cellulare esposta migliorando notevolmente l'efficienza di *C. Vulgaris* in termini di biosorbimento di metalli pesanti. Di contro, rispetto all'attività fotocatalitica, l'effetto schermante dell'alga determina una diminuzione delle performance dell'ibrido, già a ridotto contenuto di biomassa.

L'aggiunta di silice nanometrica alla componente inorganica, nota da precedenti studi^[36] condotti in ISTEK per incrementare l'attività fotocatalitica della titania, ha permesso di ottenere campioni a tre componenti ($\text{TiO}_2/\text{SiO}_2/C. \textit{Vulgaris}$) in grado di mantenere il tenore delle performance fotocatalitiche della TiO_2 , aggiungendo però la capacità biosorbente di *C. Vulgaris*, funzioni verificate sia sui campioni in sospensione che sui rispettivi granulati.

Gli sviluppi futuri della tecnologia vedono l'esplorazione di un più ampio range di concentrazioni di biomassa, l'impiego di altre specie di microalghe (*Spirulina (Arthrospira) Platensis*, *Euglena Gracilis*, *Phaeodactylum Tricornutum*) e la valutazione del biosorbimento rispetto ad altri metalli pesanti di interesse per il settore (Cr^{6+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+}).

Inoltre, poiché già in questo studio si è efficacemente dimostrata la possibilità di introdurre nanofasi di magnetite nei sistemi preparati, si potrà valutare in futuro un incremento del suo contenuto per conferire proprietà magnetiche più spiccate ai granulati e facilitarne la rimozione dagli ambienti di reazione.

In aggiunta, sono stati svolti studi preliminari di compatibilità nei confronti di una sintesi^[60] *ecocompatibile* di nanoparticelle di argento eterocoagulate sulle cellule di *C. Vulgaris*, le prime valutazioni hanno fornito risultati positivi e aprono la possibilità ad applicazioni dell'ibrido ($\text{Ag}/C. \textit{Vulgaris}$) nel campo dei materiali per uso antibatterico^[61]. Infine, risulta rilevante l'interesse verso lo sviluppo di sistemi in sospensione non granulati accoppiando biomassa vivente e titania, al fine di sfruttare l'attività metabolica della microalga nei processi di fotodegradazione, potendo poi impiegare *C. Vulgaris* esausta per la produzione di biocarburanti^[62].

Bibliografia

- [1] Ortelli S., Blosi M., Albonetti S., Vaccari A., Dondi M. & Costa A. L. (2014). TiO₂based nano-photocatalysis immobilized on cellulose substrates. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 276, 58–64.
- [2] Suresh Kumar K., Dahms H. U., Won E. J., Lee J. S. & Shin, K. H. (2015). Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329–352.
- [3] Fazal T., Mushtaq A., Rehman F., Ullah Khan A., Rashid N., Farooq W., Xu J. (2018). Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3107–3126.
- [4] Lolli A., Blosi M., Ortelli S., Costa A. L., Zanoni I., Bonincontro D., Albonetti S. (2019). Innovative synthesis of nanostructured composite materials by a spray-freeze drying process: Efficient catalysts and photocatalysts preparation. *Catalysis Today*, 334, 193–202.
- [5] Nations U. (2019). *WWAP (UNESCO World Water Assessment Programme). The United Nations World Water Development Report 2019: Leaving No One Behind*.
- [6] Department of Economic and Social Affairs. (2013). World Economic and Social Survey 2013 Sustainable Development Challenges. *United Nations*.
- [7] United Nations. (2015). Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. *United Nations General Assembly Resolution*.
- [8] Banat I. M., Nigam P., Singh D. & Marchant R. (1996). Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review. *Bioresource Technology*, 58, 217–227.
- [9] Logroño W., Pérez M., Urquizo G., Kadier A., Echeverría M., Recalde C. & Rákhely G. (2017). Single chamber microbial fuel cell (SCMFC) with a cathodic microalgal biofilm: A preliminary assessment of the generation of bioelectricity and biodegradation of real dye textile wastewater. *Chemosphere*, 176, 378–388.
- [10] Centro Studi Sistema Moda Italia, Milano, 2019
- [11] Foddanu E. & Frusca S. B. (2005). *Analisi del ciclo produttivo del tessile laniero*.
- [12] Rahman Bhuiyan M. A., Mizanur Rahman M., Shaid A., Bashar M. M. & Khan M. A. (2016). Scope of reusing and recycling the textile wastewater after treatment with gamma radiation. *Journal of Cleaner Production*, 112, 3063–3071.
- [13] Tehrani-Bagha A. R., Mahmoodi N. M. & Menger F. M. (2010). Degradation of a persistent organic dye from colored textile wastewater by ozonation. *Desalination*, 260(1–3), 34–38.

- [14] Gupta V. K., Agarwal S. & Saleh T. A. (2011). Synthesis and characterization of alumina-coated carbon nanotubes and their application for lead removal. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1), 17–23.
- [15] Tor A., Büyükerkek T., Çengelöglu Y. & Ersöz M. (2005). Simultaneous recovery of Cr(III) and Cr(VI) from the aqueous phase with ion-exchange membranes. *Desalination*, 171(3), 233–241.
- [16] O’Connell D. W., Birkinshaw C., & O’Dwyer T. F. (2008). Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology*, 99(15), 6709–6724.
- [17] Zeraatkar A. K., Ahmadzadeh H., Talebi A. F., Moheimani N. R. & McHenry M. P. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*, 181, 817–831.
- [18] Dellamatrice P. M., Silva-Stenico M. E., Moraes L. A. B. de, Fiore M. F. & Monteiro R. T. R. (2017). Degradation of textile dyes by cyanobacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 25–31.
- [19] Volesky B. (2007). Biosorption and me. *Water Research*, 41(18), 4017–4029.
- [20] Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306.
- [21] Tredici M. R. & Materassi R. (1992). From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 221–231.
- [22] Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P. Y. & Vaca-Garcia C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.
- [23] Cardozo K. H. M., Guaratini T., Barros M. P., Falcão V. R., Tonon A. P., Lopes N. P., Pinto E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 146, 60–78.
- [24] Lim S. L., Chu W. L. & Phang S. M. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*, 101(19), 7314–7322.
- [25] Morris H. J., Almarales A., Carrillo O. & Bermúdez R. C. (2008). Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresource Technology*, 99(16), 7723–7729.
- [26] De-Bashan L. E., Bashan Y., Moreno M., Lebsky V. K., & Bustillos J. J. (2002). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella spp.* when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(6), 514–521.

- [27] Choix F. J., de-Bashan L. E. & Bashan Y. (2012). Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella spp.* induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 51(5), 300–309.
- [28] Seyfabadi J., Ramezanzpour Z. & Khoeyi Z. A. (2011). Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, 23(4), 721–726.
- [29] Singh A., Nigam P. S. & Murphy J. D. (2011). Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102(1), 10–16.
- [30] Taştan B. E., Ertuğrul S. & Dönmez G. (2010). Effective bioremoval of reactive dye and heavy metals by *Aspergillus versicolor*. *Bioresource Technology*, 101(3), 870–876.
- [31] Baudelet P. H., Ricochon G., Linder M. & Muniglia L. (2017). A new insight into cell walls of *Chlorophyta*. *Algal Research*, 25, 333–371.
- [32] Magalhães P., Andrade L., Nunes O. C. & Mendes A. (2017). Titanium dioxide photocatalysis: Fundamentals and application on photoinactivation. *Reviews on Advanced Materials Science*, 51(2), 91–129.
- [33] Fujishima A., Rao T. N. & Tryk D. A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 1(1), 1–21.
- [34] Park J. Il, Kang N. J., Jun Y. W., Oh S. J., Ri H. C. & Cheon J. (2002). Superlattice and magnetism directed by the size and shape of nanocrystals. *ChemPhysChem*, 3(6), 543–547.
- [35] Reddy K. M., Manorama S. V., Reddy A. R. (2002). Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 78, 239–245
- [36] Ortelli S., Blosi M., Delpivo C., Gardini D., Dondi M., Gualandi I., Costa, A. L. (2014). Multiple approach to test nano TiO₂ photo-activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 292, 26–33.
- [37] Pelaez M., Nolan N. T., Pillai S. C., Seery M. K., Falaras P., Kontos A. G., Dionysiou D. D. (2012). A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, 125, 331–349.
- [38] Ohno T., Sarukawa K., Tokieda K. & Matsumura M. (2001). Morphology of a TiO₂ photocatalyst (Degussa, P-25) consisting of anatase and rutile crystalline phases. *Journal of Catalysis*, 203(1), 82–86.
- [39] Marugán J., López-Muñoz M. J., Van Grieken R. & Aguado J. (2007). Photocatalytic decolorization and mineralization of dyes with nanocrystalline

- TiO₂/SiO₂ materials. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46(23), 7605–7610.
- [40] Vázquez-Zavala A., Ostoja-Montes A., Acosta D. & Gómez-Cortés A. (1998). Characterization of structure and catalytic activity of Pt-Sn catalysts supported in Al₂O₃, SiO₂ and TiO₂. *Applied Surface Science*, 136(1–2), 62–72.
- [41] Jung K. Y. & Park S. Bin. (2000). Enhanced photoactivity of silica-embedded titania particles prepared by sol-gel process for the decomposition of trichloroethylene. *Applied Catalysis B: Environmental*, 25(4), 249–256.
- [42] Chen Y., Wang K. & Lou L. (2004). Photodegradation of dye pollutants on silica gel supported TiO₂ particles under visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 163(1–2), 281–287.
- [43] Hu C., Tang Y., Yu J. C. & Wong P. K. (2003). Photocatalytic degradation of cationic blue X-GRL adsorbed on TiO₂/SiO₂ photocatalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, 40(2), 131–140.
- [44] Costa A. L., Ortelli S., Blosi M., Albonetti S., Vaccari A. & Dondi M. (2013). TiO₂ based photocatalytic coatings: From nanostructure to functional properties. *Chemical Engineering Journal*, 225, 880–886.
- [45] Watanabe T., Takizawa T. & Honda K. (1977). Photocatalysis through excitation of adsorbates. 1. Highly efficient N-deethylation of rhodamine B adsorbed to CdS. *Journal of Physical Chemistry*, 81(19), 1845–1851.
- [46] Qu P., Zhao J., Shen T. & Hidaka H. (1998). TiO₂-assisted photodegradation of dyes: A study of two competitive primary processes in the degradation of RB in an aqueous TiO₂ colloidal solution. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 129(2–3), 257–268.
- [47] Ishwarya S. P., Anandharamakrishnan C. & Stapley A. G. F. (2015). Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends in Food Science and Technology*, 41(2), 161–181.
- [48] Zuidam N. J. & Nedović V. A. (2010). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. 1–400.
- [49] Mallick N. (2003). Biotechnological potential of *Chlorella vulgaris* for accumulation of Cu and Ni from single and binary metal solutions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(7), 695–701.
- [50] Mehta S. K. & Gaur J. P. (2001). Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 18(1), 1–13.
- [51] Procházková G., Šafařík I. & Brányik T. (2012). Surface modification of *Chlorella vulgaris* cells using magnetite particles. *Procedia Engineering*, 42, 1778–1787.

- [52] Mehta S. K. & Gaur J. P. (2001). Removal of Ni and Cu from single and binary metal solutions by free and immobilized *Chlorella vulgaris*. *European Journal of Protistology*, 37(3), 261–271.
- [53] Morales A. E., Mora E. S., Pau U. (2007). Use of diffuse reflectance spectroscopy for optical characterization of un-supported nanostructures. *Revista Mexicana de Fisica*, S 53(5), 18-22.
- [54] López R. & Gómez R. (2012). Band-gap energy estimation from diffuse reflectance measurements on sol-gel and commercial TiO₂: A comparative study. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 61(1), 1–7.
- [55] Yin H. C. (1937). Effect of Auxin on *Chlorella Vulgaris*. *National Academy of Sciences* 23(3), 174–176.
- [56] Hadjoudja S., Deluchat V. & Baudu M. (2010). Cell surface characterisation of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 342(2), 293–299.
- [57] Lichtenthaler H. K., Buschmann C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), F4.3.1-F4.3.8
- [58] Wong J. P. K., Wong Y. S. & Tam N. F. Y. (2000). Nickel biosorption by two *Chlorella* species, *C. Vulgaris* (a commercial species) and *C. Miniata* (a local isolate). *Bioresource Technology*, 73(2), 133–137.
- [59] Ahmad A., Bhat A. H. & Buang A. (2018). Enhanced biosorption of transition metals by living *Chlorella vulgaris* immobilized in Ca-alginate beads. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 3330, 1–17.
- [60] Costa A. L., Blosi M. (2016) Process for the preparation of nanoparticles of noble metals in hydrogel and nanoparticles thus obtained WO2016IB50501 20160201
- [61] Marassi V., Di Cristo L., Smith S. G. J., Ortelli S., Blosi M., Costa A. L., Prina-Mello A. (2018). Silver nanoparticles as a medical device in healthcare settings: A five-step approach for candidate screening of coating agents. *Royal Society Open Science*, 5(1).
- [62] Ge S., Champagne P., Plaxton W. C., Leite G. B., Marazzi F. (2017). Microalgal cultivation with waste streams and metabolic constraints to triacylglycerides accumulation for biofuel production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11, 325–343.