

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Sintesi chimica e biogenica di nanoparticelle di ossidi e solfuri
metallici (ZnO e ZnS) e valutazione della loro citotossicità in
cellule umane**

Relatore: Prof.ssa Silvia Gross
Dipartimento di Scienze Chimiche (DiSC)

Correlatore: Prof.ssa Maddalena Mognato
Dipartimento di Biologia (DiBio)

Controrelatore: Prof.ssa Regina Tavano
Dipartimento di Biologia (DiBio)

Laureanda: Mariarosa Crosato

Anno Accademico 2021/2022

INDICE:

ELENCO DEGLI ACRONIMI.....	3
1. Introduzione	5
1.1. Introduzione ed obiettivi della Tesi	5
1.2. Articolazione della Tesi	7
2. Ossido di zinco e solfuro di zinco.....	9
2.1. Proprietà chimico-fisiche e strutturali dell'ossido di zinco	9
2.2. Applicazioni dello ZnO	11
2.3. Proprietà chimico-fisiche e strutturali del solfuro di zinco.....	15
2.4. Applicazioni dello ZnS	16
3. Approcci di sintesi.....	21
3.1. Sintesi a riflusso	23
3.2. Sintesi idrotermale	24
3.3. Sintesi biogenica	26
4. Analisi di citotossicità in cellule umane	29
4.1. Colture cellulari in 2D e 3D.....	29
4.2. Saggi di citotossicità	30
4.2.1 Saggio di proliferazione cellulare (MTS).....	30
4.2.2. Saggio di proliferazione e morte cellulare (LIVE/DEAD)	31
4.2.3. Saggio clonogenico	31
4.3. Funzionalizzazione delle nanoparticelle	32
5. Risultati sperimentali e discussione.....	33
5.1. Sintesi ZnO	33
5.1.1 Sintesi chimica	34
5.1.2 Sintesi biogenica	40
5.1.3 Confronto tra le sintesi	44
5.2. Sintesi ZnS.....	45
5.2.1 Sintesi chimica	45
5.2.2 Sintesi biogenica	50
5.2.3 Confronto tra le sintesi	53
5.3. Analisi di stabilità delle nanoparticelle.....	54
5.4. Prove di funzionalizzazione.....	56
5.5. Analisi della citotossicità delle nanoparticelle di ZnS.....	58
5.5.1 Citotossicità delle nanoparticelle di ZnS in cellule umane coltivate in 2D	58
5.5.2 Citotossicità delle nanoparticelle di ZnS in cellule umane coltivate in 3D	63
6. Parte sperimentale	67
6.1. Reagenti	67
6.2. Sintesi ZnO	67
6.2.1 Sintesi in bagno termico e a riflusso	67
6.2.2 Sintesi idrotermale.....	68
6.2.3 Sintesi biogenica	69
6.3. Sintesi ZnS.....	69
6.3.1 Sintesi in bagno termico e a riflusso	69

6.3.2 Sintesi idrotermale.....	70
6.3.3 Sintesi biogenica	70
6.4. Funzionalizzazione NPs.....	71
6.5. Saggi di citotossicità	72
6.5.1 Saggi MTS.....	72
6.5.2 Saggio clonogenico	73
6.5.3 Saggio LIVE/DEAD	74
7. Tecniche di caratterizzazione.....	75
7.1. Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)	75
7.2. Diffrazione di raggi X (XRD).....	76
7.3. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM).....	77
7.4. Microscopia elettronica a scansione (SEM)	77
7.5. Diffusione dinamica della luce (DLS)	78
8. Conclusioni	79
8.1. Prospettive Future	81
Bibliografia.....	83
Appendice.....	90
Indice figure	91
Indice tabelle	92
Ringraziamenti	93

ELENCO DEGLI ACRONIMI

ATR = Attenuated Total Reflectance

DLS= Dynamic Light Scattering

EPA = Eicosapentaenoic Acid

FDA = Food and Drug Administration

FBS = Fetal Bovine Serum

FT-IR = Fourier Transform Infrared Spectroscopy

FWHM = Full Width at Half Maximum

GRAS = Generally Recognised As Safe

MAA = Methacrylic Acid

PBS = Phosphate Buffered Saline

PEG = Poly (ethylene glycol)

PEGMEMA = Poly (ethylene glycol) methyl ether methacrylate

PVA = Polyvinyl alcohol

PVP = Polyvinylpyrrolidone

RES = Reticuloendothelial System

ROS = Reactive Oxygen Species

SEM = Scanning Electron Microscopy

TEM = Transmission Electron Microscopy

XRD = X-ray Diffraction

Capitolo 1

1. Introduzione

1.1. Introduzione ed obiettivi della Tesi

Il 1960 viene considerato l'anno di nascita della nanotecnologia, una branca della scienza nata per progettare, realizzare e manipolare materiali su scala nanometrica (1-100 nm). L'origine di questa moderna tecnologia si deve al fisico teorico americano Richard Feynman, il quale ipotizzò di poter manipolare la materia su scala atomica e molecolare. Durante il convegno *dell'American Physical Society* del 1959, Feynman introdusse il concetto specifico di nanotecnologia nel suo celebre discorso intitolato "*There's Plenty of Room at the Bottom*" [1]. Negli ultimi decenni, particelle con dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, definite nanoparticelle, hanno suscitato grande interesse in tutti i campi della scienza, ingegneria e medicina. In particolare, nanoparticelle e nanomateriali trovano ampie applicazioni in elettrochimica, catalisi, sensoristica, biomedicina, cosmetica, tecnologia alimentare, industria tessile, meccanica, ottica, elettronica e industria spaziale [2] [3].

Le ridotte dimensioni e l'elevato rapporto superficie/volume dei nanomateriali rendono uniche le loro proprietà fisico-chimiche rispetto a quelle dei materiali "*bulk*", ossia di dimensioni maggiori. L'elevata area superficiale specifica rispetto a strutture più grandi comporta generalmente una maggior reattività e ne influenza le proprietà meccaniche, ottiche ed elettriche. In secondo luogo, gli effetti di confinamento quantico dovuti alla nanoscala comportano una variazione di alcune proprietà funzionali del materiale, in particolare quelle optoelettroniche, spettroscopiche, fotochimiche, magnetiche ed elettriche [4] [5].

Tra i nanomateriali con proprietà chimico-fisiche e funzionali di interesse tecnologico spiccano l'ossido di zinco (ZnO) e il solfuro di zinco (ZnS), entrambi caratterizzati da una buona stabilità termica e bassa tossicità. ZnO e ZnS appartengono alla classe dei semiconduttori II–VI e sono particolarmente adatti per applicazioni (opto)elettroniche grazie al loro ampio *band gap* [6] [7]. Inoltre, essendo abbondanti in natura, stabili ed ecocompatibili trovano applicazione anche in campo ambientale e biomedico [8]. Grazie alla capacità di generare specie reattive dell'ossigeno (ROS), le nanoparticelle di ossido e solfuro di zinco vengono considerate dei buoni agenti antitumorali e antimicrobici [9]. Un ulteriore vantaggio è il facile drogaggio con ioni luminescenti per aumentarne e modularne la fotoemissione intrinseca e quindi consentirne un utilizzo nel *bioimaging* ottico [10].

La sintesi di nanoparticelle può essere effettuata secondo tre diverse tipologie di approcci, ossia mediante metodi fisici, chimici o biologici. I metodi chimici o biologici in soluzione, chiamati anche approcci di *wet chemistry*, sono i più promettenti poiché risultano i più economici e richiedono minor consumo di energia, in quanto svolti a temperature e pressioni relativamente basse [11]. La *wet chemistry* rappresenta un approccio “*green*”, versatile ed efficace per sintetizzare nanomateriali con un eccellente controllo sulle loro proprietà strutturali, chimiche e fisiche [12]. Nel presente lavoro di tesi sono state sintetizzate nanoparticelle di ZnO e ZnS mediante diverse tipologie di sintesi di *wet chemistry*: il metodo di precipitazione in acqua, la sintesi idrotermale e la sintesi biogenica. Negli ultimi anni, per ridurre il tasso di sostanze chimiche pericolose impiegate durante la sintesi tradizionale delle nanoparticelle, si è pensato di adottare metodi ecologici basati su estratti di piante, funghi, batteri, alghe o altre molecole di derivazione biologica. Questa sintesi biologica, detta sintesi biogenica, sfrutta i composti organici presenti nelle fonti naturali appena citate, i quali agiscono come agenti riducenti e anche come agenti stabilizzanti [13]. Nella presente tesi sono state scelte le microalghe come agenti biogenici, al fine di utilizzare un metodo ecologico, economico e sicuro per sintetizzare le nanoparticelle di interesse [14]. È stato dimostrato che le nanoparticelle metalliche prodotte dalle alghe sono più stabili in soluzione rispetto a quelle prodotte da altri organismi. Inoltre, gli estratti vegetali sono in grado di ridurre gli ioni metallici più velocemente di funghi o batteri [15]. Il presente lavoro di tesi ha l’obiettivo di confrontare metodi di sintesi di tipo chimico con la sintesi biogenica di nanoparticelle di ossido di zinco e solfuro di zinco. A questo scopo, per investigare composizione, struttura cristallina, morfologia e dimensioni, sono state utilizzate diverse tecniche di caratterizzazione. Le sintesi devono garantire un accurato controllo della composizione, forma e dimensione delle nanoparticelle, in quanto queste proprietà influenzano le proprietà fisiche e chimiche del materiale, come anche gli effetti sulla salute umana e sull’ambiente [16]. Non va infatti trascurata la tossicità di questi nanomateriali, che è ancora poco conosciuta, e desta preoccupazione per eventuali applicazioni in ambito ambientale, medico e industriale. Per un utilizzo sicuro nell’uomo risulta quindi importante valutare la possibile tossicità in vitro, mediante studi accurati in cellule e tessuti, e successivamente in vivo in animali modello [1]. Nella prospettiva di una eventuale applicazione delle nanoparticelle sintetizzate nel *bioimaging*, è stata analizzata la loro citotossicità in cellule umane coltivate in vitro, valutandone le differenze derivanti dall’applicazione dei diversi metodi di sintesi.

Una ulteriore criticità riguarda i fenomeni di aggregazione delle particelle, in quanto questi influenzano i dati di tossicità. Infatti, uno dei principali problemi da affrontare per effettuare

studi accurati in cellule o tessuti è la realizzazione di sospensioni stabili di nanoparticelle. Di grande aiuto è la sonicazione, capace di stabilizzare la sospensione per tempi tuttavia limitati [17] [18]. Per una stabilizzazione permanente si sfruttano le funzionalizzazioni con polimeri non tossici e biocompatibili, ad esempio polietilenglicole (PEG)[19][20], polivinilalcol (PVA) [21] e polivinilpirrolidone (PVP) [22].

1.2. Articolazione della Tesi

La presente tesi è strutturata in otto capitoli. Il primo Capitolo è l'introduzione al progetto di tesi ed include gli obiettivi del lavoro. Nel Capitolo 2 vengono descritti l'ossido di zinco e il solfuro di zinco, con le loro proprietà strutturali, fisico-chimiche e le loro relative applicazioni. Nel capitolo 3 vengono inizialmente illustrati i possibili approcci di sintesi delle nanoparticelle descritte precedentemente, passando poi ad una presentazione più dettagliata riguardo ai metodi di sintesi adottati nel presente lavoro di tesi. Nel capitolo 4 vengono descritte le modalità di crescita delle cellule umane coltivate in vitro, i vari test di citotossicità effettuati nelle cellule e le possibili strategie di funzionalizzazione delle nanoparticelle. Il Capitolo 5 presenta e discute i risultati sperimentali. Nel Capitolo 6 vengono descritti i dettagli sperimentali riguardanti le procedure e le condizioni di sintesi, mentre le tecniche di caratterizzazione impiegate vengono descritte nel Capitolo 7. Infine, nell'ultimo capitolo vengono sintetizzati i risultati ottenuti e tratte delle conclusioni sul lavoro svolto, ad integrazione delle quali vengono delineate delle prospettive future.

Capitolo 2

2. Ossido di zinco e solfuro di zinco

2.1. Proprietà chimico-fisiche e strutturali dell'ossido di zinco

L'ossido di zinco è un composto inorganico con la formula ZnO . Si presenta come una polvere bianca, insolubile in acqua e inodore. Identificato come semiconduttore II–VI, poiché Zn e O appartengono ai gruppi 2 e 6 nella tavola periodica, si caratterizza per un ampio *band gap* (3,37 eV) nello spettro del vicino UV ed un'elevata energia di legame eccitonica (60 meV) a temperatura ambiente. [23] Possiede inoltre un'ottima stabilità meccanica e termica a temperatura ambiente. L'ossido di zinco è infatti uno dei semiconduttori II–VI più resistenti, fonde a 1975°C e sublima a temperature di poco superiori ai 1700°C. [24]

Presenta un elevato assorbimento ottico nelle regioni UVA (315-400 nm) e UVB (280-315 nm), ritenuto importante nell'attività antimicrobica e in creme come protezione UV. [25]

Un'altra proprietà importante di ZnO è la sua capacità di emettere luminescenza blu e verde, che lo rende un agente utile per il *bioimaging*. [16,26]

In natura si trova come minerale di zincite e cristallizza preferenzialmente nella struttura esagonale di tipo wurtzite. Tuttavia, può esistere anche in altre due strutture cristalline: la zinco blenda o il *rock salt* (figura 1). A temperatura ambiente la forma termodinamicamente più stabile è la wurtzite, caratterizzata da una geometria di coordinazione tetraedrica, in cui ogni anione (O^{2-}) è circondato da quattro cationi (Zn^{2+}) ai vertici di un tetraedro e viceversa. Questa coordinazione è tipica del legame covalente sp^3 , ma in questi composti è presente anche un notevole contributo ionico. Il polimorfo wurtzite ha un reticolo cristallino esagonale mentre la zinco blenda e il *rock salt* sono caratterizzati da un reticolo cristallino cubico. La struttura zinco blenda è metastabile e può essere stabilizzata solo mediante crescita su substrati cubici, mentre la struttura *rock salt* può essere ottenuta a pressioni relativamente elevate. [27]

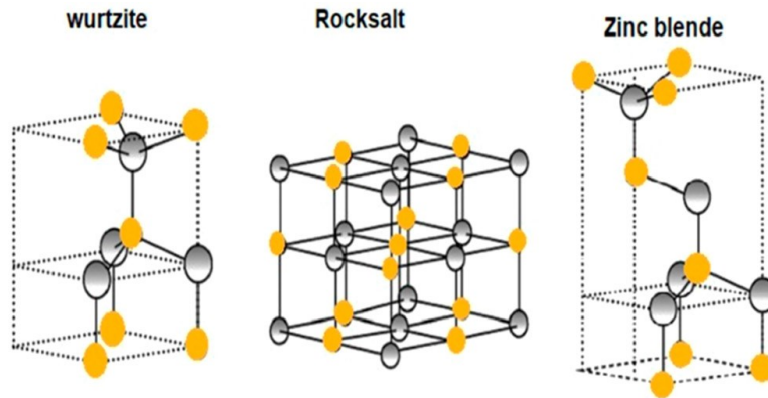


Figura 1: Strutture cristalline dell'ossido di zinco; Le sfere grigie e gialle rappresentano rispettivamente gli atomi di Zn e O. [25]

La struttura esagonale della wurtzite presenta i seguenti parametri reticolari; $a = 0,325 \text{ nm}$ e $c = 0,521 \text{ nm}$. Il rapporto $c/a \approx 1,6$ devia di poco rispetto ad una cella esagonale ideale $c/a = 1,633$. Questo tipo di reticolo appartiene al gruppo spaziale $P6_3mc$ e può essere rappresentato semplicemente da una serie di piani alternati composti da ioni O^{2-} e Zn^{2+} coordinati in modo tetraedrico, impilati alternativamente lungo l'asse c (figura 2) [28]. La coordinazione tetraedrica non centro-simmetrica ne determina le proprietà piezoelettriche, la polarità cristallografica ed è anche un fattore chiave nella crescita dei cristalli e nella generazione di difetti. Le superfici comuni del cristallo di ZnO sono i piani polari Zn-(0001) carichi positivamente, O-(0001) carichi negativamente e quelli non polari (2110) e (0110). La variazione di crescita lungo i diversi piani può indurre una crescita anisotropa di ZnO. Poiché le superfici polari sono meno stabili termodinamicamente, studi cinetici hanno dimostrato che le molecole, atomi o ioni costituenti il cristallo tendono a adsorbire preferenzialmente su di esse per ridurre al minimo l'energia superficiale. Di conseguenza, le facce con maggiore energia superficiale di solito hanno una bassa area superficiale specifica, quindi nel caso di ZnO, il tasso di crescita più elevato è lungo l'asse c . [29]

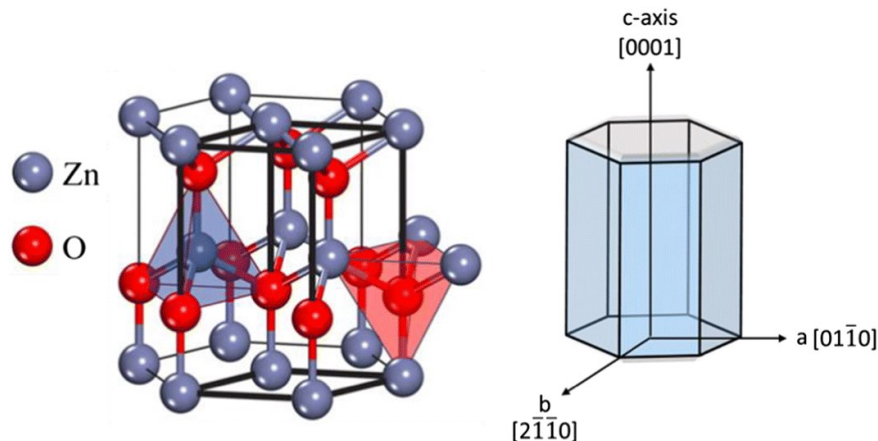


Figura 2: Struttura e superfici del polimorfo wurtzite [29]

2.2. Applicazioni dello ZnO

Questo ossido di un metallo di transizione ha suscitato notevole interesse grazie alle sue uniche proprietà ottiche, elettriche e meccaniche. [30] Inoltre è un materiale a basso costo, facilmente reperibile in natura, resistente e durevole.

Già negli anni '60 film sottili di ZnO sono stati applicati in sensori, trasduttori e come fotocatalizzatori. Negli ultimi decenni, lo studio di questo materiale in forma nanostrutturata ha acquisito notevole importanza nelle nanoscienze e nelle nanotecnologie. Grazie alla riduzione delle dimensioni si sono introdotte nuove proprietà elettriche, meccaniche, chimiche e ottiche risultanti dagli effetti superficiali di confinamento e quantistico. [23] Le nanoparticelle di ZnO presentano attualmente una vasta gamma di applicazioni in diversi campi in base alle loro dimensioni e alla loro forma. Si ritiene che le nanoparticelle di ZnO siano uno dei tre nanomateriali più studiati e prodotti, insieme alle nanoparticelle di biossido di titanio e alle nanoparticelle di biossido di silicio. [31] Inoltre, l'ossido di zinco è stato identificato come uno dei semiconduttori con la maggior variabilità di nanostrutture: può dare origine a strutture mono-dimensionali (fili, anelli, eliche, tubi), bi-dimensionali e tri-dimensionali, come nanostelle e nanosfere. [32] Le principali applicazioni tecnologiche riguardano il settore dell'elettronica e optoelettronica; infatti questo tipo di nanoparticelle trova ampio utilizzo in filtri per onde acustiche di superficie, celle solari, fotorivelatori, emettitori di luce, diodi, fotodiodi, sensori di gas, modulatori ottici, e varistori. [23] Nanoparticelle di ZnO possono essere utilizzate come supporto per catalizzatori nella catalisi eterogenea o come fotocatalizzatori. Ciò le rende un materiale promettente in applicazioni ambientali; ZnO si è dimostrato un ottimo fotocatalizzatore per la degradazione di inquinanti organici nell'acqua e nell'aria sotto irraggiamento UV. [33]

Grazie alle sue uniche proprietà chimico-fisiche, l'ossido di zinco trova applicazione come additivo in svariati prodotti industriali come vernici, gomma, cosmetici e rivestimenti. Nell'industria cosmetica viene ampiamente utilizzato nelle creme solari per garantire una protezione efficiente della pelle grazie all'assorbimento delle radiazioni UV. [34] Le nanoparticelle di ZnO hanno mostrato applicazioni promettenti anche in campo biomedico grazie alla loro buona biocompatibilità e al basso costo. Questo materiale viene sfruttato in svariate terapie poiché ha mostrato capacità antidiabetica, antitumorale, antinfiammatoria e antibatterica. [35] Le proprietà di luminescenza rendono l'ossido di zinco un ottimo candidato nel *bioimaging*, soprattutto nella forma di *quantum dots*. (vedi paragrafo successivo) [26] Ad esempio, esistono biosensori basati su ZnO per il rilevamento di piccole molecole come

glucosio, fenolo, H_2O_2 , colesterolo e urea. [36] Inoltre, le nanoparticelle di ZnO vengono sfruttate anche nel sistema di rilascio di farmaci per il trattamento di molte malattie, come la grave immunodeficienza combinata (ADA-SCID), la malattia granulomatosa cronica (CGD), emofilia, cecità, malattia da accumulo lisosomiale e distrofia muscolare, malattie neurodegenerative, infezioni virali, malattie cardiache e diabete. [16] Le nanoparticelle di ZnO trovano applicazione anche in agricoltura, ad esempio nei fertilizzanti per aumentare la concentrazione di zinco nelle coltivazioni di piante. [37] Espitia et al. consigliano l'utilizzo delle nanoparticelle di ZnO nella conservazione degli alimenti, in particolare negli imballaggi alimentari contenenti polimeri biodegradabili. Con i loro esperimenti hanno dimostrato un miglioramento della qualità del cibo grazie al suo confezionamento ascrivibile a tre funzioni, il rilascio di ioni antimicrobici, il danneggiamento della cellula batterica e la formazione di ROS per effetto della radiazione luminosa. [16]

ZnO per il *bioimaging*

Rispetto ai tradizionali coloranti organici fluorescenti, i nanocristalli semiconduttori possiedono migliori proprietà fotoluminescenti, tra cui un ampio assorbimento, una banda di emissione stretta e simmetrica, un grande spostamento di Stokes e un debole auto-assorbimento. Inoltre, possiedono una lunghezza d'onda di emissione regolabile in base alla dimensione e un'elevata stabilità contro il *photo-bleaching*. [38] Negli ultimi anni, molte nanoparticelle inorganiche luminescenti, chiamate anche *Quantum Dots* (QD), sono state sintetizzate e testate in vitro o in vivo per possibili applicazioni nel *bioimaging*. [39] Tra i tipici QD, CdSe e CdTe possiedono le migliori proprietà luminescenti, ma i composti contenenti Cd sono tossici sia per la salute umana che per l'ambiente [40]. Le nanoparticelle di ZnO sono candidati promettenti come sostituti di QD a base di Cd, grazie a bassa tossicità, basso costo e stabilità chimica all'aria e alla luce solare. [41]

Per l'ossido di zinco in forma di wurtzite si osservano normalmente due bande di emissione fotoluminescenti: una nella regione UV intorno ai 370 nm (blu), derivante dalla tipica transizione del *gap* di banda, e una nel visibile (verde) dovuta probabilmente a difetti puntuali. [26] Nonostante decenni di ricerca sullo ZnO, l'origine dell'emissione verde è ancora controversa. Molti difetti puntuali sono stati proposti come responsabili di questa emissione, come vacanze di ossigeno, vacanze di zinco, atomi di ossigeno interstiziali e atomi di zinco interstiziale. Tra questi, le vacanze di ossigeno sono l'ipotesi più accreditata e sono stati proposti diversi meccanismi. [42] Inoltre, studi recenti di Sharma et al. hanno mostrato che l'emissione verde generata dalle nanoparticelle di ZnO è originata da difetti superficiali piuttosto che da difetti interstiziali [43]. In figura 3 sono rappresentati i meccanismi coinvolti nel processo di

emissione nella regione UV e in quella visibile. Nei materiali semiconduttori c'è un'energia di *band-gap* (E_g) che rappresenta la differenza tra lo stato energetico più alto occupato nella banda di valenza (VB) e lo stato più basso non occupato nella banda di conduzione (CB). Quando un elettrone nella banda di valenza assorbe un fotone con energia uguale o superiore a E_g , si eccita e passa nella banda di conduzione. Questo lascia una lacuna. L'elettrone carico negativamente e la lacuna carica positivamente formano una quasi-particella chiamata eccitone. Quando l'elettrone si rilassa nuovamente nella banda di valenza, annichila l'eccitone e può rilasciare energia sotto forma di un fotone, con energia inferiore a E_g (a causa dell'energia persa durante la transizione), in un processo chiamato ricombinazione radiativa. Questo processo avviene nel caso di emissione nella regione UV (caso A in figura 3). [39] Per quanto riguarda l'emissione di ZnO nel visibile sono stati suggeriti due principali meccanismi: la ricombinazione di un elettrone intrappolato superficialmente con una lacuna in una trappola profonda (caso B in figura 3), oppure la ricombinazione di un elettrone in una vacanza di ossigeno profonda con una lacuna fotogenerata nella banda di valenza (caso C in figura 3). Poiché è difficile determinare l'esatta posizione e il livello di energia delle trappole profonde, questi due meccanismi vengono considerati entrambi possibili. [44]

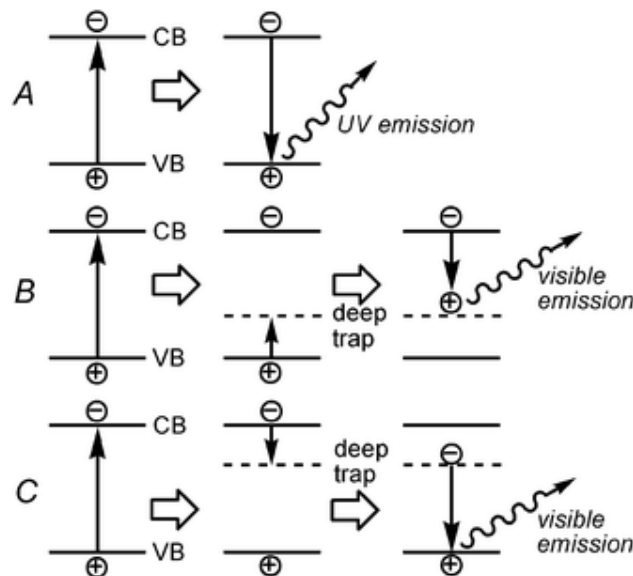


Figura 3: Illustrazione schematica dei principali meccanismi luminescenti per ZnO. Nota: banda di valenza (VB); banda di conduzione (CB). [44]

I QD di ZnO presentano diverse problematiche. La luminescenza correlata ai difetti puntiformi delle nanoparticelle ZnO viene facilmente smorzata dalle molecole d'acqua. Inoltre, queste nanoparticelle sono poco stabili in acqua. [38] L'applicazione nell'*imaging* biologico richiede una buona dispersione in acqua e una luminescenza stabile dei QD: sono state sviluppate quindi diverse strategie di funzionalizzazione per risolvere questi problemi. Un modo efficiente per

rendere i QD stabili e solubili in acqua è la funzionalizzazione con polimeri, lipidi, silice o altri leganti organici [26]. Xiong et al. hanno realizzato per la prima volta nanoparticelle di ZnO con una fotoluminescenza stabile in soluzione acquosa mediante un rivestimento co-polimerico (ZnO@polyMAA-co-PEGMEMA) [45][46]. Altri ricercatori hanno dimostrato che nanoparticelle di ZnO incapsulate con silice possiedono una buona stabilità e una bassa citotossicità [47]. Entrambi i QD risultano promettenti come sonde fluorescenti per il *cell imaging* in vitro. Inoltre, ZnO QD coniugati con specifici leganti possono essere utilizzati per diagnosticare tumori in vitro. In particolare l'acido folico (FA) permette alle nanoparticelle di legarsi a cellule tumorali specifiche grazie ai recettori FA sovraespressi sulle membrane.[48]

Un altro aspetto dei QD di ZnO da tenere in considerazione è la necessaria eccitazione UV per ottenere la fotoluminescenza, che è determinata dal *gap* di banda di ZnO. La luce UV può penetrare nel corpo solo per pochi millimetri, può danneggiare cellule e tessuti ed indurre autofluorescenza interferente dalle biomolecole. Per questo motivo molte ricerche limitano l'utilizzo delle nanoparticelle a studi di *imaging* in vitro. [38] Tuttavia, il *band gap* di ZnO si può regolare drogando i QD con elementi di transizione o ioni lantanidi, ottimizzandone le proprietà luminescenti. In particolare, sono stati sperimentati i seguenti ioni: Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Cr^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} e Er^{3+} . [26][49]. Il drogaggio con ioni cobalto si è dimostrato uno dei più promettenti per l'*imaging* in vivo, sia in sistemi vegetali che in cellule umane. [50]

Per ogni tipologia di funzionalizzazione dei QD vanno sempre valutate la biocompatibilità e la citotossicità dei nuovi nanosistemi. Anche se ZnO è stato approvato per usi cosmetici dalla *Food and Drug Administration* (FDA), il meccanismo di citotossicità per i nanomateriali ZnO non è ancora ben chiaro. [36] In alcuni studi è stato riportato che le nanoparticelle di ZnO hanno mostrato un effetto citotossico al di sopra di elevate concentrazioni e dipendente dal pH, causato dall'aumento di concentrazione di ioni Zn^{2+} nel terreno di coltura o nelle cellule.[51,52] Il rilascio di ioni Zn^{2+} nelle cellule potrebbe indurre una serie di effetti dannosi, come danni lisosomiali, mitocondriali e la produzione di ROS. [38] Tuttavia, basse concentrazioni di Zn^{2+} sono ben tollerate dalle cellule poiché lo zinco è un elemento essenziale per il metabolismo cellulare. [36]

2.3. Proprietà chimico-fisiche e strutturali del solfuro di zinco

Il solfuro di zinco (II) è un composto inorganico con formula ZnS . I suoi minerali sono in genere neri per la presenza di varie impurezze, ma ZnS puro si presenta come un solido bianco e inodore. La sua struttura atomica e le sue proprietà chimico-fisiche sono paragonabili a quelle del più conosciuto ossido di zinco. Risulta un po' meno stabile termicamente rispetto a ZnO , sublima a circa $1185\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fonde a $1850\text{ }^{\circ}\text{C}$, tuttavia, presenta alcune proprietà uniche e vantaggiose. Ad esempio, il solfuro di zinco ha un *gap* di banda maggiore rispetto all'ossido ($3,37\text{ eV}$); rispettivamente $3,72\text{ eV}$ per la forma sfalerite e $3,77\text{ eV}$ per la wurtzite. Ciò lo rende il candidato più adatto per dispositivi di elettroluminescenza, sensori e fotorivelatori. L'energia di legame dell'eccitone (39 meV) e l'energia termica a temperatura ambiente (26 meV) sono inferiori rispetto a quelle dell'ossido, ma consentono un'efficiente emissione eccitonica anche a temperatura ambiente con bassa energia di eccitazione. [7] Il legame Zn-S è molto più covalente di quello Zn-O poiché l'elettronegatività di Pauling (2.5) è significativamente inferiore a quella di O (3.5). Il carattere covalente superiore del solfuro di zinco ha importanti conseguenze sulla struttura e le sue proprietà chimiche. Una conseguenza importante della minore elettronegatività dello zolfo è la sua minore tendenza a formare legami a idrogeno. [53] In natura si trova principalmente nella forma cristallina sfalerite, oppure nella forma più rara di wurtzite. La sfalerite è caratterizzata da una struttura cubica (gruppo spaziale $F\bar{4}3m$) ed è stabile a temperatura ambiente. Al di sopra dei $1020\text{ }^{\circ}\text{C}$ è termodinamicamente favorita la forma cristallina wurtzite, caratterizzata da una struttura esagonale (gruppo spaziale $P6_3mc$). Entrambe le strutture cristalline possiedono una geometria di coordinazione tetraedrica, in cui ogni anione (S^{2-}) è circondato da quattro cationi (Zn^{2+}) ai vertici di un tetraedro e viceversa, ma si differenziano per il diverso impacchettamento, rispettivamente con una sequenza ABCABC nella sfalerite e con una sequenza ABABAB nella wurtzite.[54] (figura 4)

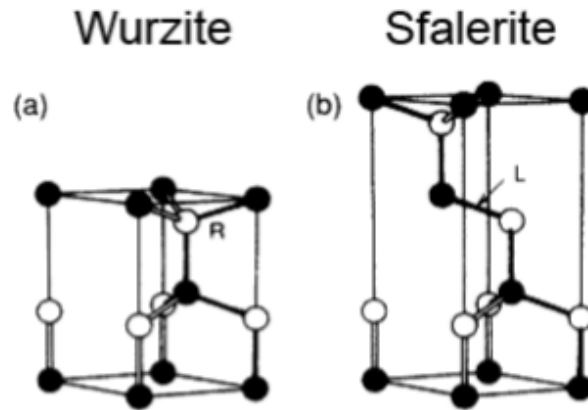


Figura 4: Strutture cristalline del solfuro di zinco. Le sfere bianche e nere rappresentano rispettivamente gli atomi di Zn e S. Adattata da [54]

I parametri del reticolo della struttura sfalerite sono $a = b = c = 0,545 \text{ nm}$, mentre per la wurtzite sono $a = b = 0,382 \text{ nm}$, $c = 0,626 \text{ nm}$.

Considerando le superfici, la struttura mostra due superfici polari, ovvero $[001]$ e $[111]$, in cui il cristallo è occupato alternativamente da piani di cationi (Zn^{2+}) o anioni (S^{2-}), e una superficie stechiometrica apolare più stabile, la $[110]$, dove ogni piano è costituito da un numero uguale di cationi e anioni. Le superfici polari sono caratterizzate da strati di ioni con carica opposta, e il momento di dipolo di ciascuna unità ripetitiva aumenta con l'aumento del numero di strati, provocando un abbassamento della stabilità per superfici con indice più elevato. [55] (figura 5)

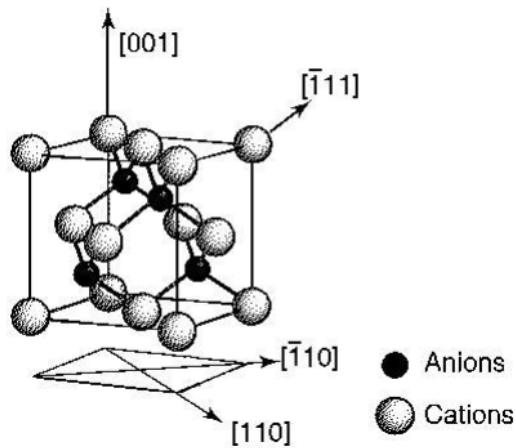


Figura 5: Struttura e superfici della struttura sfalerite [55]

2.4. Applicazioni dello ZnS

Come per l'ossido di zinco, esistono diversi tipi di nanostrutture mono-, bi- e tri-dimensionali di ZnS, come nanofili, nanocinture, nanotubi, nanocombs, nanofogli, nanosfere ecc. Le applicazioni più interessanti del solfuro di zinco sono legate alle sue caratteristiche ottiche ed elettroniche. Grazie al suo ampio *bandgap* mostra un'apprezzabile luminescenza che lo rende

particolarmente adatto per dispositivi basati sulla luce ultravioletta (UV) come sensori chimici, fotorilevatori e altri dispositivi di elettroluminescenza (schermi, LED, laser ecc.) [7] Inoltre, il solfuro di zinco è uno dei pochi composti luminescenti approvati dalla FDA per uso cosmetico.[56] L'elevata fotosensibilità e fotostabilità ne giustificano l'ampio uso come materiale luminescente e ottico.

Il solfuro di zinco viene utilizzato anche in campo biomedico nella preparazione di biosensori e biocompositi. Ad esempio, viene sfruttato nella rilevazione di specie biologiche, come il glucosio. [57] Grazie alla capacità di generare specie reattive dell'ossigeno (ROS), le nanoparticelle di ZnS hanno mostrato un'ottima capacità antimicrobica verso diversi microrganismi come batteri Gram-positivi, Gram-negativi e colture di funghi. Inoltre, in recenti studi, il solfuro di zinco è risultato un eccellente antiossidante e agente antitumorale, mostrando un'efficiente tossicità contro diverse cellule tumorali, ad esempio le cellule del cancro al seno (MCF-7) [58][59]. Se le nanoparticelle vengono drogate/funzionalizzate con materiale inorganico biocompatibile possono essere sfruttate in altre applicazioni mediche, come il rilascio di farmaci, il rilevamento e la marcatura di malattie in cellule biologiche. Ad esempio, sono stati ideati dei *quantum dots* di ZnS rivestiti di carbossimetilcellulosa per individuare cellule del cancro al cervello.[60]

Il solfuro di zinco è un materiale promettente anche in catalisi e fotocatalisi. Grazie all'abbondanza in natura e la bassa tossicità viene utilizzato nel trattamento delle acque reflue dove agisce come fotocatalizzatore nella degradazione di diversi inquinanti organici quali coloranti, p-nitrofenolo e derivati alogenati del benzene. [13] Inoltre, la polvere fine di ZnS può fungere da fotocatalizzatore per produrre idrogeno gassoso dall'acqua dopo adeguata illuminazione. [61] Anche il solfuro di zinco viene usato ampiamente come additivo in molti prodotti industriali come pigmento per vernici, plastica, carta e gomma. Appartiene infatti ai più importanti pigmenti bianchi inorganici, insieme ai pigmenti di biossido di titanio e ossido di zinco. In genere viene maggiormente venduto sotto forma di litopone, una miscela costituita da solfuro di zinco e solfato di bario. [62]

In campo agricolo, alcuni ricercatori hanno scoperto la capacità di biofertilizzazione da parte delle nanoparticelle di ZnS. Suganyaet al. ha condotto uno studio in vitro sulla germinazione dei semi con grammo verde (*V. radiata*) utilizzando diverse concentrazioni di nanoparticelle di ZnS biosintetizzate. Si è dedotto che, in condizioni controllate, le nanoparticelle influenzano positivamente la germinazione dei semi e la crescita precoce del grammo verde. [16]

ZnS per il bioimaging

Per le nanoparticelle di solfuro di zinco sono state osservate varie bande di emissione nella regione UV-visibile, in particolare nel blu, verde e arancione. Queste bande di fotoluminescenza vengono comunemente assegnate a difetti puntuali, come vacanze di zolfo, vacanze di zinco, atomi di zinco interstiziali e atomi di zolfo interstiziali. I meccanismi coinvolti nel processo di emissione sono simili a quelli già descritti per l'ossido di zinco. L'emissione blu (430 nm) viene attribuita agli stati superficiali di ZnS puro. La luminescenza verde (515 nm) è stata assegnata al trasferimento di elettroni dalle vacanze di zolfo agli stati di zolfo interstiziali mentre l'emissione arancione (620 nm) è causata dalla ricombinazione tra gli stati di zinco interstiziali e le vacanze di zinco [63]. (Figura 6)

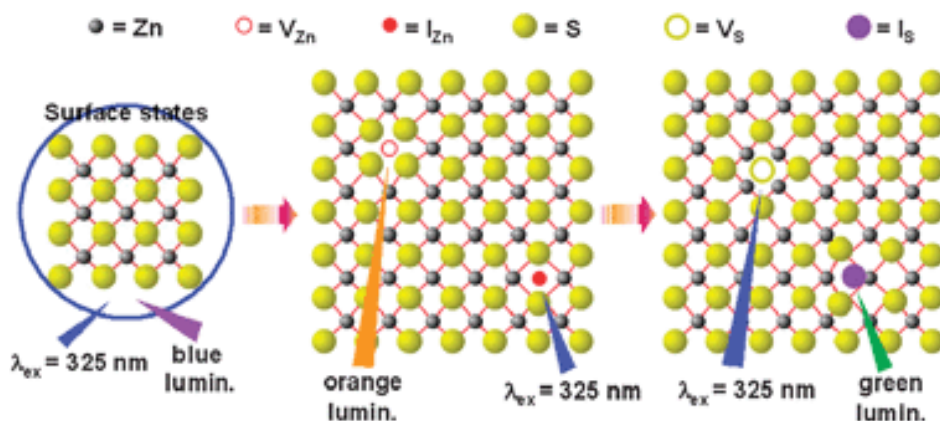


Figura 6: Rappresentazione schematica dei difetti puntuali che possono trovarsi nella struttura di ZnS. I_S = zolfo interstiziale, I_{Zn} = zinco interstiziale, V_S = vacanza di zolfo, V_{Zn} = vacanza di zinco. [63]

Grazie ai vantaggi dei nanocristalli semiconduttori rispetto ai tradizionali coloranti organici fluorescenti (vedi capitolo precedentemente), sono stati realizzati diversi QD di ZnS per potenziali applicazioni di *bioimaging*. Per garantire una buona dispersione e stabilità in acqua sono stati rivestiti con materiali biocompatibili per le cellule. Polimeri [64], silice [10] [65], lipidi [66] o amminoacidi [67] sono i composti di rivestimento più utilizzati, capaci di impedirne l'aggregazione. Ad esempio, nanoparticelle di ZnS rivestite con chitosano o carbossimetilcellulosa, polimeri naturali biocompatibili, sono risultate promettenti grazie alla loro elevata stabilità e bassa tossicità. [60,68] Come per l'ossido di zinco, il drogaggio con ioni lantanidi e metalli di transizione consente di modulare le proprietà di luminescenza dei QD. [10] Finora sono stati testati i seguenti ioni: come Cu^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Eu^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , Er^{3+} . [69] Le nanoparticelle di ZnS drogate con Mg^{2+} sono le più studiate e hanno riscontrato molto successo nel *bioimaging*. [67] [70]

Per effettuare studi di *imaging* in vivo le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione

dovrebbero rientrare idealmente nel vicino infrarosso (NIR, tipicamente 650-900 nm), una delle cosiddette “finestre biologiche”. [71] Grazie ad un appropriato drogaggio dei QD, in particolare con ioni di terre rare, si può ottenere un’elevata fluorescenza in questa particolare finestra, caratterizzata da un basso assorbimento da parte delle biomolecole. Francesca Tajoli et al. hanno analizzato la citotossicità di questi nanosistemi e i risultati ottenuti hanno mostrato che le nanoparticelle di ZnS a basse concentrazioni non hanno effetti citotossici su alcuni tipi di cellule umane coltivate in vitro. [72] Secondo altri studi, ZnS puro è risultato lievemente tossico, e se drogato con metalli, in particolare con manganese, può indurre livelli significativi di tossicità verso le cellule. [73] I fattori che influenzano maggiormente la citotossicità delle nanoparticelle di ZnS sono quindi il rilascio di metalli tossici e la composizione del rivestimento. [74]

Capitolo 3

3. Approcci di sintesi

Per la sintesi dell'ossido e del solfuro di zinco vengono utilizzate diverse tecniche che possono essere suddivise in tre tipologie, ovvero metodi fisici, chimici e biologici. I metodi fisici consentono di formare le nanoparticelle mediante frammentazione del materiale di partenza, detto approccio "top-down", o mediante altri approcci di natura fisica. Le tecniche fisiche comprendono la macinazione ad alta energia, la miscelazione allo stato fuso, la deposizione fisica da vapore, l'ablazione laser, la deposizione per sputtering e l'impiantazione ionica. [11] Con i metodi chimici o biologici, le particelle vengono generalmente formate mediante approccio "bottom-up", ossia per nucleazione e accrescimento a partire da precursori atomici o molecolari. Solitamente questo processo avviene tramite reazioni chimiche in fase liquida o vapore. (Figura 7)

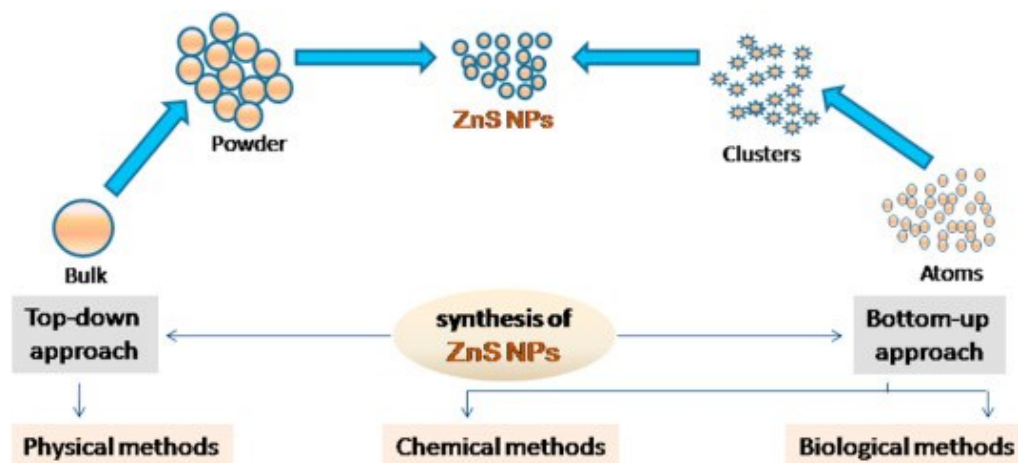


Figura 7: Approcci di sintesi delle nanoparticelle [75]

Le sintesi in fase liquida comprendono il metodo di precipitazione o coprecipitazione, i metodi colloidali, il trattamento sol-gel, il metodo delle microemulsioni acqua-olio, la sintesi idrotermale o solvotermale e il metodo dei polioli. [16] (Figura 8)

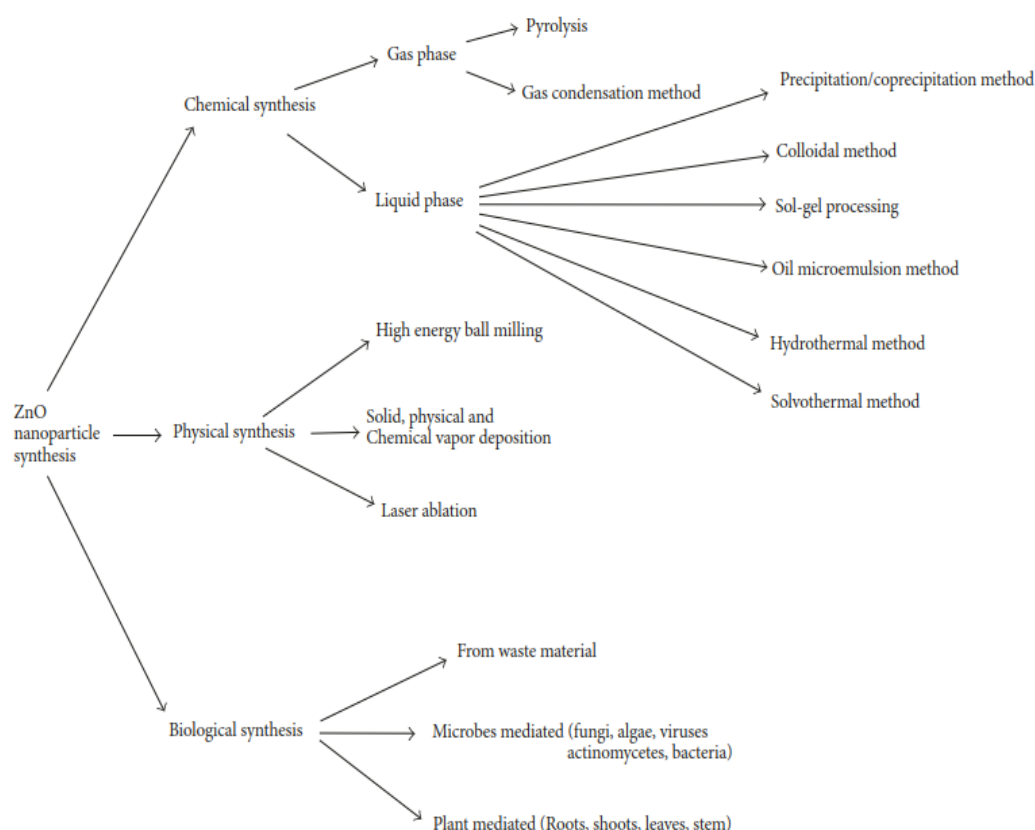


Figura 8: Metodi di sintesi delle nanoparticelle di ZnO [16]

Nell'ambito della sintesi di composti inorganici sono di grande interesse i metodi di *wet chemistry*, caratterizzati da processi svolti tipicamente in soluzione acquosa, a temperature e pressioni relativamente basse.[11] L'approccio bottom-up si basa in gran parte sulla *wet chemistry*, la quale è ritenuta semplice, versatile, economica e scalabile. [12][76]

Qualunque sia il metodo utilizzato per la produzione delle nanoparticelle, è fondamentale il controllo di dimensioni, forma e composizione. La maggior parte dei processi fisici sono piuttosto costosi poiché richiedono una strumentazione complessa e non sono adatti alla produzione su larga scala. [77] Inoltre, spesso non garantiscono un controllo dimensionale adeguato. La sintesi chimica di nanoparticelle è la più diffusa in quanto permette di produrre nanoparticelle con pochi difetti e dalla composizione chimica omogenea.[78] In particolare, gli approcci di *wet chemistry* permettono di sintetizzare nanomateriali con un controllo preciso delle loro proprietà morfologiche, strutturali e chimiche (come dimensioni, forma, composizione, cristallinità e chimica di superficie) che, di conseguenza influenzano le loro proprietà funzionali (ottiche, elettriche, catalitiche, magnetiche).[12] Per ridurre l'impiego di energia e la produzione di sottoprodotti tossici, sono stati sviluppati metodi biologici, come la biosintesi di nanoparticelle mediante microrganismi, piante ed estratti vegetali.

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate due tipologie di sintesi chimica in fase liquida:

il metodo di precipitazione in acqua e la sintesi idrotermale. Successivamente si è sperimentato l'approccio biogenico, effettuando la sintesi delle nanoparticelle in presenza di microalghe per ridurre l'utilizzo di sostanze chimiche e quindi rendere la sintesi più ecosostenibile.

Meccanismo di crescita delle nanoparticelle

Il modello La Mer/Sugimoto [79] descrive il processo di nucleazione e crescita delle nanostrutture in soluzione e può essere suddiviso in tre fasi. Nella prima fase vi è un rapido aumento della concentrazione dei monomeri liberi in soluzione, derivanti dalla scissione dei precursori. In un secondo step, quando la concentrazione dei monomeri raggiunge un certo valore critico, si raggiunge una condizione di sovrassaturazione, dando inizio alla fase di nucleazione (fase 2). Si formano quindi piccoli cluster che, accrescendo, portano ad una diminuzione della concentrazione dei monomeri in soluzione (fase 3). [80] (Figura 9)

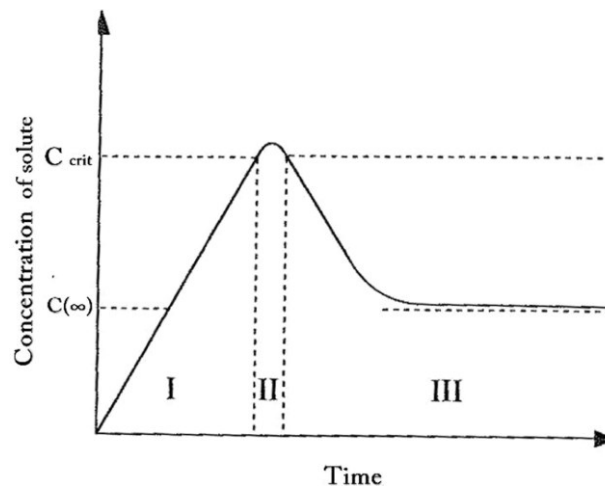


Figura 9: Diagramma di LaMer [80]

3.1. Sintesi a riflusso

Tra i metodi di sintesi chimica in fase liquida quello della precipitazione in soluzione è il più semplice e conveniente. In un tipico metodo di precipitazione o co-precipitazione, un agente precipitante (principalmente alcali inorganici) viene lasciato reagire con il sale di zinco in soluzione acquosa. Dopo un certo tempo, riscaldando ad una temperatura costante, viene prodotto un precipitato insolubile che viene poi lavato e lasciato seccare per ottenere le nanoparticelle desiderate. Per mantenere la soluzione alla temperatura impostata è necessario utilizzare un bagno ad olio su piastra riscaldante oppure un'apparecchiatura per riflusso, per evitare che il solvente evapori. Nel secondo caso si tratta di montare un condensatore verticale sopra il pallone di reazione; l'acqua che scorre nella camicia esterna del condensatore raffredda

le pareti consentendo ai vapori di condensare e ricadere nel pallone.

Il principale vantaggio di questo approccio è la semplicità di implementazione in quanto non è necessaria una complessa strumentazione. Il problema principale è che l'ottenimento di materiali cristallini attraverso la co-precipitazione è molto difficile da ottenere a basse temperature e di conseguenza la maggior parte dei protocolli comporta una fase di calcinazione a temperature spesso superiori a 350 °C. [11]

3.2. Sintesi idrotermale

Una reazione idrotermale è per definizione una reazione chimica che avviene in soluzione acquosa a temperature normalmente superiori ai 100° C e pressioni maggiori di 1atm. La sintesi idrotermale comporta il riscaldamento della soluzione chimica in un recipiente sigillato, generalmente un'autoclave o una bomba idrotermale, il quale porta la pressione autogena all'interno del recipiente oltre la pressione atmosferica poiché la temperatura supera il punto di ebollizione del solvente. (Figura 10)

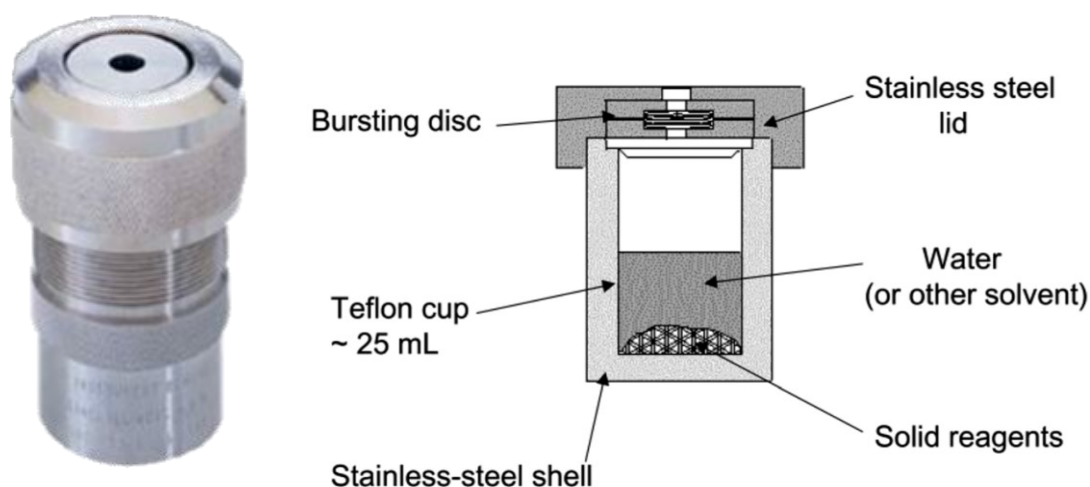


Figura 10: Schema di una bomba idrotermale [81]

L'aumento della temperatura e di conseguenza della pressione all'interno del recipiente chiuso porta ad una variazione delle proprietà del solvente. Durante la sintesi idrotermale variano le seguenti proprietà dell'acqua: densità, prodotto ionico, viscosità e costante dielettrica. All'aumentare della temperatura, la densità dell'acqua diminuisce mentre aumenta la densità della fase gassosa. Al punto critico (374 C, 218 atm) scompare la differenza tra liquido e gas poiché le densità di entrambe le fasi risultano uguali. Al di sopra del punto critico esiste solo il fluido supercritico. Il prodotto ionico cresce all'aumentare di temperatura e pressione. La costante dielettrica dell'acqua diminuisce drasticamente quando l'acqua viene riscaldata e in

condizioni supercritiche si avvicina a quella dei solventi non polari; questo comporta un aumento della solubilità dei precursori non polari. (Figura 11) La viscosità diminuisce con l'aumentare della temperatura quindi la mobilità di molecole e ioni nell'intervallo supercritico è molto più elevata rispetto alle condizioni normali. Tutte queste variazioni delle proprietà dell'acqua possono portare alla solubilizzazione di precursori normalmente insolubili in condizioni normali. Per questi motivi si possono ottenere prodotti cristallini anche a temperature non elevate e con tempi di reazione relativamente brevi. La sintesi idrotermale è inoltre una procedura semplice e riproducibile, consente di ottenere rese piuttosto elevate ed è parzialmente scalabile. Se si usa acqua come solvente, il processo è detto idrotermale mentre nel caso si utilizzi un solvente non acquoso il processo è detto solvotermale. [82] [83] [84]

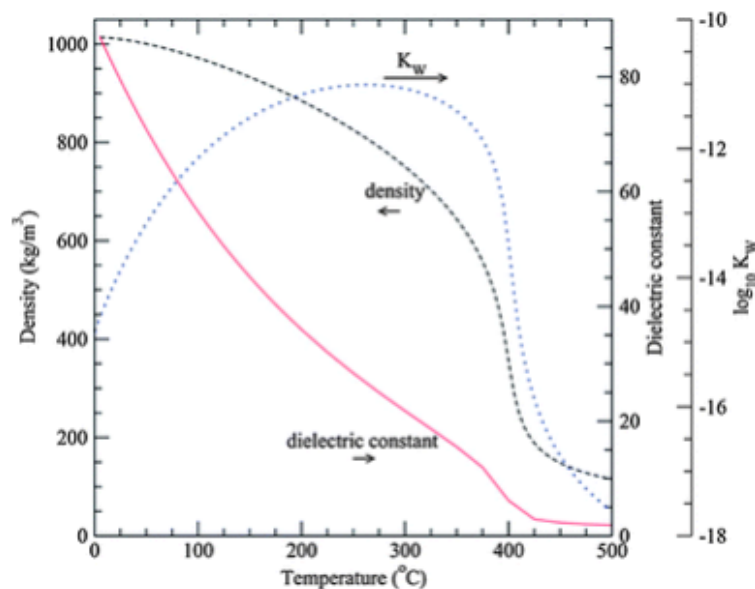


Figura 11: Variazione di densità, prodotto ionico (K_w) e costante dielettrica dell'acqua a 30 Mpa, in funzione della temperatura. [83]

Nella sintesi idrotermale, la relazione tra temperatura e pressione gioca un ruolo fondamentale nei risultati di sintesi ed è correlata al grado di riempimento del reattore sigillato. (Figura 12) Nella maggior parte delle sintesi idrotermali la temperatura e la pressione vengono mantenute al di sotto del punto critico. Queste sintesi vengono quindi eseguite in condizioni idrotermali blande, dette sub-critiche, dove si sfruttano la maggiore reattività e la maggiore solubilità dei precursori senza portare l'acqua allo stato supercritico.

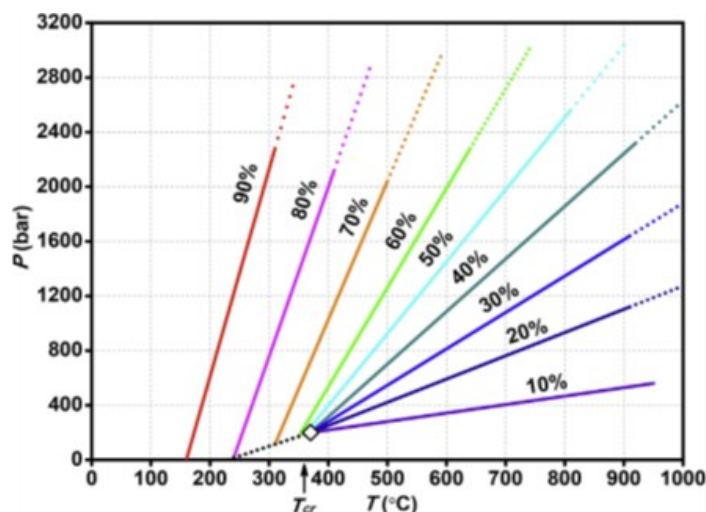


Figura 12: Relazione tra temperatura e pressione in funzione del grado di riempimento del reattore. [85]

Il meccanismo più probabile di nucleazione e crescita dei nanomateriali, durante la sintesi idrotermale, è la dissoluzione-riprecipitazione che include la dissoluzione dei precursori, la diffusione delle specie di precursori disciolte e la precipitazione/reazione per dare il composto di interesse. [83] [86] [87]

3.3. Sintesi biogenica

Negli ultimi anni è emersa la necessità di sviluppare metodi di sintesi di nanoparticelle che soddisfino i criteri della chimica verde, ossia evitare o ridurre l'utilizzo di sostanze tossiche utilizzando preferibilmente risorse naturali e rinnovabili. Inoltre, i principi della chimica verde puntano al risparmio energetico e alla minimizzazione della produzione di rifiuti. Molti gruppi di ricerca hanno quindi cercato di sostituire le sintesi chimiche con tecniche sostenibili e rispettose dell'ambiente. La sintesi biologica, detta biogenica, è un'ottima soluzione essendo sicura, semplice, sostenibile, economicamente vantaggiosa ed ecologica. Le nanoparticelle utilizzate nelle applicazioni biomediche dovrebbero provenire preferibilmente da fonti naturali. [88] La sintesi biogenica prevede l'utilizzo di enzimi, microrganismi o estratti di piante per ridurre e stabilizzare le nanoparticelle. (Figura 13) Questi agenti biogenici di origine naturale vengono impiegati anche come templanti ("green scaffold") per promuovere la formazione di nanoparticelle inorganiche con diverse morfologie. Si è scoperto che molti microrganismi possono produrre le nanoparticelle inorganiche sia mediante via intracellulare che extracellulare. [89] Le alghe sembrano essere tra i migliori candidati nella biogenerazione di nanomateriali. Sono un gruppo di organismi fotosintetici, unicellulari o multicellulari, e possono essere distinte due classi: le microalghe (microscopiche) e le macroalghe

(macroscopiche). [90]

Oltre alla loro diversità e abbondanza in natura, le alghe sono economiche, facili da coltivare, e, a differenza di batteri e funghi (ad eccezione di alcuni ceppi), non producono tossine. [91] Inoltre si è osservato che le nanoparticelle prodotte dalle alghe sono più stabili e la sintesi è più veloce rispetto ad altri microrganismi. [15] Generalmente vengono utilizzati gli estratti di alghe, che sono costituiti da carboidrati, proteine, minerali, oli, grassi, acidi grassi polinsaturi insieme a composti bioattivi come antiossidanti (polifenoli, tocoferoli) e pigmenti (carotenoidi, clorofille e ficobiline). Molti di questi composti potenzialmente attivi sono stati identificati come agenti riducenti e/o stabilizzanti. [92]

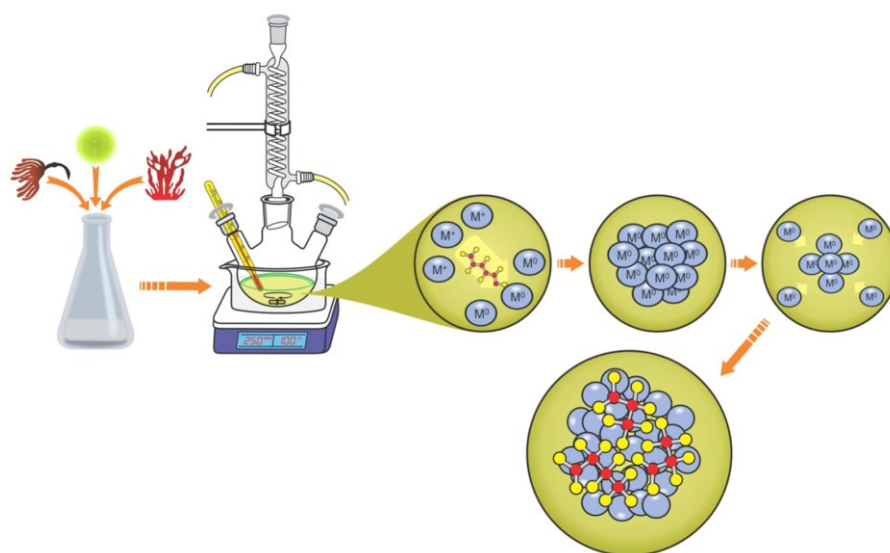


Figura 13: Meccanismo di formazione delle nanoparticelle con le alghe [92]

La maggior parte delle procedure di sintesi di nanoparticelle riportate in letteratura utilizzano agenti riducenti ed agenti stabilizzanti che sono considerati tossici o dannosi per l'ambiente [93]. In questo contesto la possibilità di condurre la sintesi a pressione e a temperatura ambiente, in ambiente acquoso e utilizzando agenti riducenti e stabilizzanti di origine naturale, rende la sintesi biogenica un approccio vantaggioso essendo ecosostenibile ed economico. Tuttavia, ci sono ancora alcune criticità di natura sperimentale e teorica da superare, ad esempio non sono ancora stati chiariti i meccanismi esatti coinvolti nella sintesi biogenica dei nanomateriali. Sono quindi necessari ulteriori studi per identificare le biomolecole responsabili della riduzione e/o stabilizzazione delle nanoparticelle. [94] Considerata la grande varietà di agenti biogenici disponibili in natura, quali enzimi, alghe, microrganismi, piante o funghi, è spesso difficile individuare l'agente riducente e stabilizzante specifico, e questo rende il processo poco riproducibile limitandone lo scale-up. In letteratura vengono riportati diversi

protocolli di sintesi biogenica di nanoparticelle di ossido e solfuro di zinco. Ad esempio Azizi et al. hanno ottenuto nanoparticelle di ossido di zinco mediante l'utilizzo dell'estratto acquoso di *Sargassum muticum*, una macroalga marina bruna. [95] Riguardo alla biosintesi del solfuro di zinco sono stati testati diversi estratti di piante, come l'estratto della pianta *Ficus Johannis*. [96] Per questo lavoro di tesi è stata scelta la microalga *Nannochloropsis gaditana* come agente biogenico. Le specie appartenenti al genere *Nannochloropsis* sono microalghe unicellulari marine [97] caratterizzate da una dimensione cellulare di 2-3 μm in cui la maggior parte del volume è occupata dal cloroplasto. [98] Sono considerate tra i ceppi più promettenti per la coltivazione in sistemi su larga scala, grazie al loro rapido tasso di crescita e alla capacità di adattamento a diverse condizioni di irraggiamento. Negli ultimi anni, *Nannochloropsis* ha suscitato notevole interesse nella produzione di biocarburanti, grazie al suo elevatissimo contenuto di lipidi, e nella produzione di acidi grassi poliinsaturi tra cui l'acido eicosapentaenoico (EPA), uno dei principali acidi grassi omega-3 che hanno effetti positivi sulla salute umana. [99]

Capitolo 4

4. Analisi di citotossicità in cellule umane

Con il costante aumento della produzione di prodotti contenenti nanoparticelle e di nuove applicazioni delle nanoparticelle vi è una continua necessità di monitorarne la sicurezza e i possibili effetti sulla salute e sull'ambiente. Specialmente in campo biomedico, la tossicità dei nanomateriali è un importante fattore critico da considerare per evitare eventuali effetti avversi nell'organismo. Il primo passo verso la comprensione della tossicità delle nanoparticelle deriva da studi condotti in vitro, in colture cellulari. Rispetto agli studi in vivo sugli animali, i test cellulari sono più etici, più facili da controllare e riprodurre e meno costosi. Tuttavia, è importante riconoscere che le colture cellulari sono molto sensibili ai cambiamenti di temperatura, pH e concentrazioni di nutrienti. Risulta quindi fondamentale il controllo delle condizioni sperimentali per garantire che la morte cellulare corrisponda alla tossicità delle nanoparticelle rispetto alle condizioni di coltura inadeguate. [100]

4.1. Colture cellulari in 2D e 3D

La maggior parte dell'informazione sulla citotossicità delle cellule umane a seguito di esposizione ai nanomateriali deriva da studi condotti in vitro in cellule coltivate in sistemi bidimensionali (2D). Nelle colture 2D, le cellule crescono formando un monostrato all'interno di una fiasca o una capsula Petri da coltura. Queste colture, sebbene molto utili per determinare la citotossicità dei nanomateriali, hanno alcune limitazioni, prime fra tutte la mancanza delle interazioni cellulari ed extracellulari tipiche di un tessuto tridimensionale (3D).

Per questo motivo è necessario valutare la citotossicità anche in modelli cellulari di crescita in 3D, dove le cellule interagiscono tra loro e con l'ambiente in modo più simile ad un contesto tissutale in vivo. [101] A tale scopo è possibile coltivare le cellule in una speciale matrice artificiale tridimensionale capace di creare un microambiente 3D oppure si utilizzano metodi *scaffold-free* coltivando le cellule in plastiche per colture cellulari opportunamente trattate per evitare l'adesione (*ultra-low attachment plates*) [102] (Figura 14)

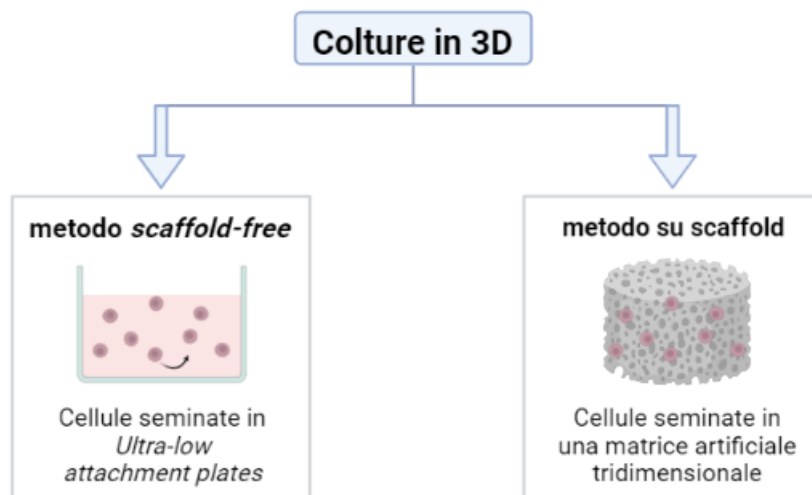


Figura 14: Tecniche utilizzate per generare colture cellulari 3D.

4.2. Saggi di citotossicità

I saggi di citotossicità misurano la capacità dei composti tossici di causare danni cellulari o morte cellulare. Negli ultimi anni sono stati sviluppati molti test per analizzare gli effetti citotossici dei nanomateriali, i quali si basano sull'osservazione della vitalità, dei cambiamenti morfologici, della capacità proliferativa o dell'attività metabolica delle cellule coltivate in vitro. [103] In seguito ai trattamenti delle cellule umane con le nanoparticelle, in questo lavoro di tesi sono stati condotte le seguenti analisi:

- saggi di vitalità cellulare in cellule umane coltivate in 2D e 3D;
- osservazione dei cambiamenti morfologici in vivo al microscopio ottico di cellule umane coltivate in 2D e 3D.

4.2.1 Saggio di proliferazione cellulare (MTS)

Il saggio MTS è un saggio colorimetrico progettato per valutare l'attività metabolica e la vitalità delle cellule. Il test prevede la riduzione del sale di tetrazolio MTS (5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazoli)-3-(4-solfofenil) tetrazolio) a formazano, un composto viola solubile. Questa conversione avviene solo nei mitocondri di cellule metabolicamente attive grazie agli enzimi deidrogenasi NADPH-dipendenti. (Figura 15) La quantità di formazano prodotto è quindi proporzionale al numero di cellule vitali in coltura e può essere quantificata misurando l'assorbanza a 492 nm con uno spettrofotometro.

Questo test risulta ideale per la misurazione della citotossicità perché è facile da usare, rapido, affidabile e poco costoso. [104]

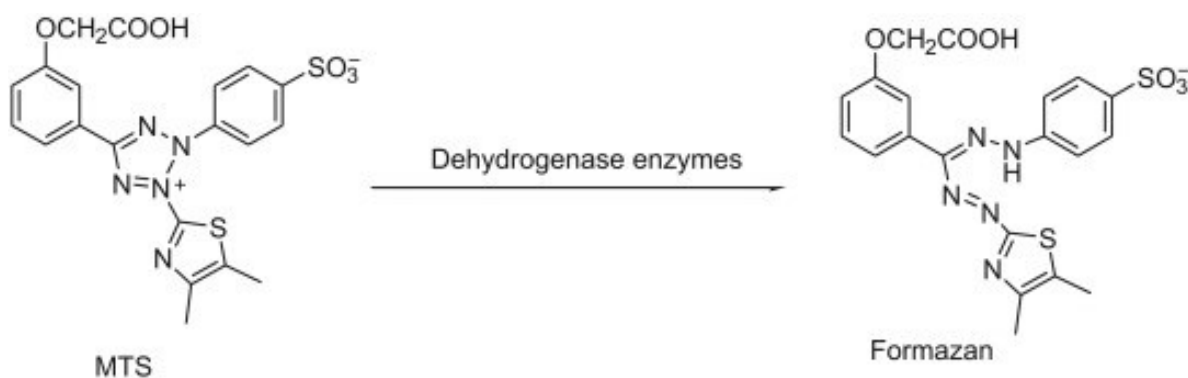


Figura 15: Riduzione dell'MTS a Formazano [105]

4.2.2. Saggio di proliferazione e morte cellulare (LIVE/DEAD)

Il saggio LIVE/DEAD permette di distinguere le cellule vive da quelle morte sfruttando due coloranti fluorescenti (Calceina AM/EthD-1) che misurano due caratteristici parametri di vitalità cellulare: l'attività dell'esterasi intracellulare e l'integrità della membrana plasmatica. La calceina AM (acetometossicalceina), permeabile alla membrana cellulare in quanto liposolubile, viene scissa dalle esterasi nelle cellule vive producendo un'intensa fluorescenza verde citoplasmatica (~515 nm). L'omodimero di etidio (EthD-1) è invece impermeabile alla membrana cellulare e colora con fluorescenza rossa (~635 nm) gli acidi nucleici delle cellule la cui integrità di membrana è stata compromessa. [106] Questo saggio può essere utilizzato per discriminare rapidamente e accuratamente le cellule vive da quelle morte sia in colture 2D che in 3D. La fluorescenza emessa viene osservata mediante un microscopio a fluorescenza.

4.2.3. Saggio clonogenico

Il saggio clonogenico è un test di sopravvivenza cellulare che si basa sull'abilità di una singola cellula di formare una colonia in vitro, che è considerata tale se composta da almeno 50 cellule. Il saggio valuta essenzialmente la capacità di proliferazione delle sole cellule vitali e sane dopo il trattamento con agenti citotossici, comprese le nanoparticelle. [107] Pertanto, è un test molto sensibile per valutare la potenziale tossicità delle NPs, rispetto ai comuni saggi colorimetrici, che invece si basano sulla rilevazione delle attività enzimatiche cellulari. [108] Tuttavia, i test clonogenici richiedono più tempo e sono più laboriosi rispetto ad altri test di vitalità. A seconda della linea cellulare, la formazione di cloni visibili può richiedere una o più settimane e il conteggio dopo la colorazione spesso non è automatizzabile. [109]

4.3. Funzionalizzazione delle nanoparticelle

Come già accennato nei capitoli precedenti, uno dei principali problemi riguardanti l'uso delle nanoparticelle è la loro instabilità in sospensione, che può essere dovuta a diversi fattori, quali dimensioni, forma e carica elettrica superficiale delle particelle. L'aggregazione e l'insolubilità dei nanomateriali in ambiente acquoso o fisiologico portano a fenomeni di precipitazione. La stabilità e la solubilità sono quindi due requisiti fondamentali per le applicazioni biomediche. Per questo motivo è necessario stabilizzare le nanoparticelle mediante funzionalizzazione superficiale per impedirne l'aggregazione. Esistono principalmente due strategie; la più semplice si basa sulla stabilizzazione attraverso la repulsione elettrostatica (ad esempio mediante rivestimento con citrato). Tuttavia, questo metodo non sempre riesce a fornire una stabilità colloidale sufficiente nei mezzi biologici. La seconda strategia consiste nella generazione di una barriera fisica sulla superficie delle nanoparticelle, chiamata stabilizzazione sterica. In questo caso si sfrutta principalmente l'adsorbimento di polimeri non tossici e biocompatibili, ad esempio polietilenglicole (PEG)[19][20], polivinilalcol (PVA) [21] e polivinilpirrolidone (PVP) [22]. La natura idrofila di questi polimeri induce anche un'ulteriore stabilizzazione attraverso l'interazione favorevole di molecole d'acqua, rendendo così solubili le nanoparticelle. Si è osservato inoltre che la funzionalizzazione con PEG è molto efficace nell'inibire il legame tra le nanoparticelle e le proteine del sangue e i macrofagi, riducendo la citotossicità dei nanomateriali. [110] Pertanto, la stabilizzazione sterica risulta più adeguata per i sistemi biologici. D'altra parte, i composti disperdenti possono aumentare significativamente il diametro idrodinamico delle nanoparticelle, andando ad alterare il tempo di circolazione nei fluidi biologici e l'assorbimento cellulare. [111]

L'ossido e il solfuro di zinco risultano quasi insolubili in acqua e questo rende difficile ottenere sospensioni stabili e ben disperse. La sonicazione con ultrasuoni permette di disperdere le nanoparticelle formando una sospensione stabile per brevi periodi [17]. La stabilizzazione permanente si ottiene in genere mediante le strategie di funzionalizzazione con i composti disperdenti descritti precedentemente.

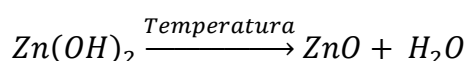
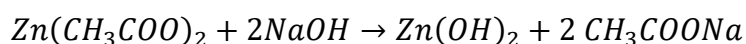
Capitolo 5

5. Risultati sperimentali e discussione

In questo Capitolo è presentata e discussa la caratterizzazione dei campioni di ossido e solfuro di zinco che sono stati sintetizzati per via chimica e biogenica. In particolare, vengono riportati i risultati riguardanti composizione, struttura cristallina e dimensione di tutti i campioni, mostrandone le differenze al variare dei parametri sperimentali (sezione 5.1 e 5.2). Per una selezione di campioni è stato possibile analizzare la morfologia, la stabilità delle sospensioni (sezione 5.3) e la citotossicità in cellule umane (sezione 5.5). Nella sezione 5.4 vengono descritte le prove di funzionalizzazione con il polietilenglicole (PEG) a diverso peso molecolare.

5.1. Sintesi ZnO

L'ossido di zinco è stato sintetizzato a partire da un sale di zinco (zinco acetato) e un agente precipitante, l'idrossido di sodio. Sia nel sale di zinco che nell'ossido di zinco, lo stato di ossidazione dello zinco è +2. Pertanto, non si verifica una riduzione come avviene nella formazione di nanoparticelle metalliche a partire da sali metallici. Il meccanismo di formazione di ZnO in ambiente acquoso è un processo complesso e può essere descritto brevemente dalle seguenti reazioni:



L'equilibrio di reazione è fortemente spostato verso la precipitazione dell'idrossido di zinco $\text{Zn}(\text{OH})_2$ a causa della sua bassa solubilità in acqua ($K_{\text{sp}} = 3,5 \times 10^{-17}$) [112]. Di conseguenza, l'idrolisi di Zn^{2+} senza la precipitazione dell'idrossido di zinco non avviene facilmente. Tuttavia, il pH e la temperatura possono influenzare drasticamente gli equilibri di reazione. In ambiente acido, a valori di pH inferiori a 6, è stabile lo ione $\text{Zn}^{2+}(\text{aq})$, a pH neutro o leggermente basico (pH 7-11) si ottiene la precipitazione dell'idrossido di zinco, mentre in ambiente fortemente basico, a valori di pH superiori a 12, è stabile lo ione complesso tetraidrossozincato, $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}(\text{aq})$. (Figura 16) [113] Gli idrossicompleksi di zinco possono decomporsi in ZnO, rilasciando ioni idrossido e acqua. [112]

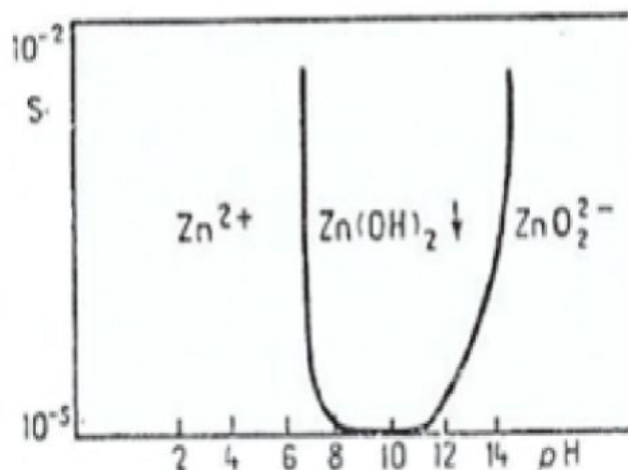


Figura 16: Solubilità apparente dell'idrossido di zinco in funzione del pH [113]

Anche la temperatura gioca un ruolo fondamentale nella sintesi delle nanoparticelle, infatti la conversione di Zn(OH)_2 in ZnO è favorita a temperature elevate, sia dal punto di vista termodinamico che cinetico. Inoltre, la disidratazione di Zn(OH)_2 in ZnO e H_2O è una reazione endotermica a temperatura ambiente ($\Delta H = +9,11 \text{ kJ mol}^{-1}$) ma il ΔG è leggermente negativo ($\Delta G = -1,7 \text{ kJ mol}^{-1}$) a causa del contributo entropico. [112]

5.1.1 Sintesi chimica

Per quanto riguarda la sintesi di nanoparticelle di ossido di zinco in assenza di microalghe, sono stati ottenuti campioni mediante il metodo di precipitazione in soluzione acquosa e per via idrotermale. Come fonte di ioni Zn^{2+} è stato utilizzato il precursore zinco acetato diidrato ($\text{Zn(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) mentre come agente precipitante l'idrossido di sodio (NaOH). La formazione di nanocristalli di ZnO a partire da zinco acetato e NaOH è già nota in letteratura. Già nel 1987 Bahnemann et al. hanno sperimentato la sintesi dell'ossido di zinco in soluzione etanolica con i precursori citati. [114] In seguito molti gruppi di ricerca hanno studiato e ottimizzato la sintesi di ZnO anche per via idrotermale. [23] [30] [115] [116] Le sintesi senza microalghe sono state effettuate per verificare i metodi sperimentali descritti in letteratura [114] [117] e per confrontare i risultati ottenuti con le sintesi biogeniche effettuate con le microalghe. Con i diversi metodi di sintesi adottati (bagno termico/riflusso/sintesi idrotermale) è stata studiata la variazione di temperatura nell'intervallo 40-135 °C. Inoltre, sono stati testati due rapporti molari tra i precursori (Zn^{2+} e NaOH) per ogni variazione di temperatura. Il tempo di reazione è stato mantenuto costante per tutte le sintesi effettuate con lo stesso metodo, in particolare 3 ore per il bagno termico o riflusso (Figura 17) e 24 ore per la sintesi idrotermale. Per le sintesi in bagno termico e a riflusso i campioni sono stati sintetizzati a partire da una

soluzione di zinco acetato diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ad una concentrazione di 0,2 M e da una soluzione di NaOH concentrata 1 M. Nelle sintesi idrotermali sono state utilizzate concentrazioni maggiori dei due precursori, rispettivamente 1M e 10 M per zinco acetato diidrato e NaOH, poiché, essendo i volumi di reazione inferiori rispetto alla sintesi in bagno termico, non si riusciva ad ottenere una massa di prodotto sufficiente da caratterizzare utilizzando concentrazioni minori.

In entrambi i metodi di sintesi la soluzione di NaOH è stata aggiunta goccia a goccia alla soluzione di zinco acetato, mantenendo quest'ultima sotto costante agitazione. Durante l'aggiunta dell'idrossido di sodio la soluzione (inizialmente trasparente) ha assunto un colore bianco lattiginoso e, come prodotto finale, è stata ottenuta una polvere bianca.



Figura 17: Sintesi dell'ossido di zinco a riflusso

Variazione dei parametri sperimentali e analisi dei campioni

Nelle sintesi in bagno termico svolte a 40 e 60 °C non è stato ottenuto ossido di zinco cristallino. Questi risultati indicano che la temperatura di reazione è un fattore cruciale nella formazione dell'ossido di zinco; infatti, nelle sintesi svolte al di sopra degli 80 °C è stato ottenuto il prodotto di interesse nella fase cristallina wurtzite, come già riportato da Bahnemann [114]. Ciò è stato confermato dalle analisi XRD poiché tutti i riflessi ottenuti potevano essere indicizzati con la struttura cristallina esagonale di ZnO con gruppo spaziale P6₃mc (COD 2300112) (186). Il diffrattogramma riportato in Figura 18 mostra la relativa indicizzazione dei riflessi mediante l'attribuzione dei corrispondenti indici di Miller. L'assenza di riflessi attribuibili ad altre fasi o altre possibili specie spurie indica la purezza del prodotto.

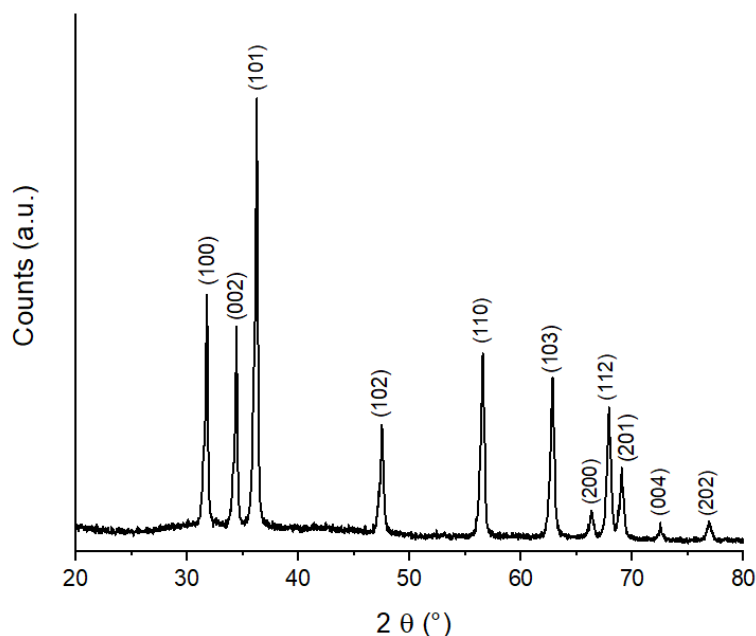


Figura 18: Diffrattogramma di ZnO (Wurtzite) con indici di Miller

Le analisi a spettroscopia infrarossa (IR) hanno permesso di verificare la presenza del legame Zn-O. Nello spettro FTIR si osserva infatti una banda di vibrazione tra 400 cm^{-1} e 500 cm^{-1} (Figura 19), attribuibile alla caratteristica vibrazione di *stretching* del legame Zn-O [118].

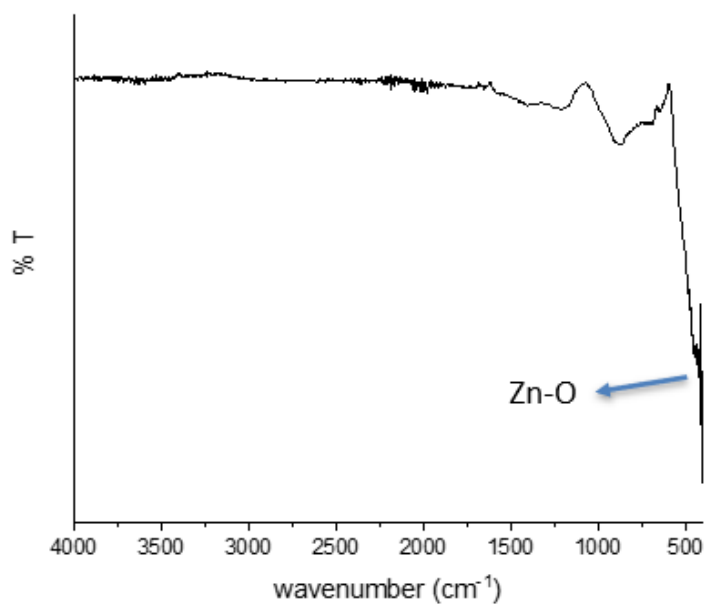


Figura 19: Spettro IR dell'ossido di zinco sintetizzato a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$

La variazione del rapporto molare tra i precursori (Zn^{2+} e NaOH) non ha influenzato particolarmente la resa della reazione; nella tabella 1 non si osservano infatti differenze apprezzabili in termini di resa. Tutti i campioni citati nella tabella sottostante (Tabella 1) presentano un elevato grado di cristallinità, come evidenziato dal profilo rettilineo della linea di base nei diffrattogrammi XRD (Figura 19). La dimensione media dei cristalliti è stata

calcolata mediante la formula di Scherrer. A 80 °C non vi è una differenza apprezzabile nella dimensione dei cristalliti ai due diversi rapporti molari. A 100 °C si comincia ad apprezzare una differenza: in particolare diminuendo il rapporto tra Zn^{2+} e NaOH, la dimensione dei cristalliti diminuisce. Con la sintesi idrotermale (campioni MCX11 e MCX12) è ancora più apprezzabile la differenza di dimensione dei cristalliti tra un rapporto e l'altro. Nei campioni sintetizzati a temperature maggiori di 80°C, a rapporti molari 1:1 tra Zn^{2+} e NaOH, all'aumentare della temperatura la dimensione media dei cristalliti aumenta (evidenziato in rosso in Tabella 1). Ciò conferma il fatto che la cristallizzazione, mediata dalla crescita dei nuclei, è favorita a temperature elevate. Tuttavia, a rapporti molari 1:0,5 (Zn^{2+} /NaOH) non sembra esserci una relazione tra dimensione dei cristalliti e temperatura.

Nome campione	Temperatura reazione (°C)	Rapporto molare Zn^{2+} /NaOH (mol/mol)	Resa	Dimensione cristalliti
MCX01	80	1:1	33%	33 nm
MCX02	80	1:0,5	33%	37 nm
MCX07	100	1:1	22%	34 nm
MCX08	100	1:0,5	20%	20 nm
MCX11	135	1:1	27%	64 nm
MCX12	135	1:0,5	30%	36 nm

Tabella 1: Resa e dimensioni dei cristalliti dei campioni di ZnO sintetizzati a 80,100 e 135 °C

Secondo l'equazione di Scherrer (vedi sezione 7.2) più stretti sono i riflessi, più grandi sono i cristalliti. Confrontando i dati ottenuti dalle analisi XRD si può notare che, all'aumentare della temperatura, i riflessi diventano più stretti (Figura 20), quindi aumentano le dimensioni medie dei cristalliti. Ciò conferma i dati riportati in tabella 1.

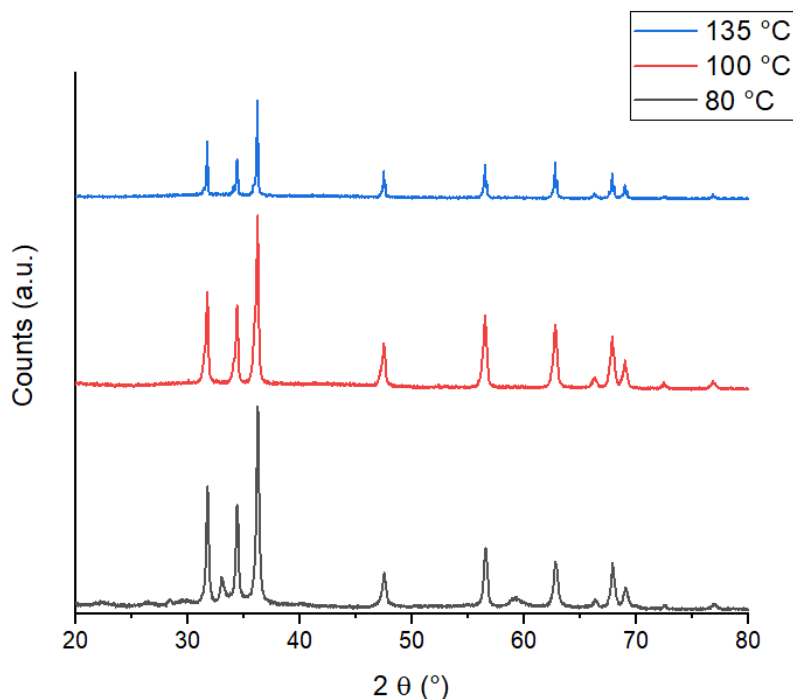


Figura 20: Confronto diffrattogrammi di ZnO a 80, 100, 135 °C

Grazie alle immagini ottenute al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) è stato possibile identificare la morfologia ed effettuare una stima dimensionale delle particelle di ZnO sintetizzate a 135 °C. Come si può osservare dalle immagini seguenti, le particelle prodotte hanno una forma esagonale a spigoli arrotondati e possiedono delle dimensioni medie di circa 6 μm , con una deviazione standard di 3 μm (Figura 21). Sembrano esserci anche delle particelle cubiche ma quello che si osserva sono probabilmente particelle con la stessa morfologia viste da un'angolazione diversa. Questa ipotesi può essere confermata con il SEM. L'indice di polidispersione (PDI), calcolato come rapporto tra la deviazione standard e il diametro medio delle nanoparticelle, è risultato 0,5 per il campione MCX11. Questo parametro può assumere valori compresi tra 0 e 1 e fornisce indicazioni sulla distribuzione dimensionale delle nanoparticelle. In generale per valori di $\text{PDI} \leq 0,2$ le dimensioni delle nanoparticelle sono molto simili tra loro e la sospensione viene considerata monodispersa, per valori compresi tra 0,2 e 0,5 la sospensione è considerata mediamente polidispersa e per valori maggiori di 0,6 polidispersa [119]. Queste strutture non possono essere definite nanoparticelle in quanto non rientrano nella scala nanometrica. Per applicazioni biomediche e in particolare nel *bioimaging* vengono richieste nanoparticelle con dimensioni comprese tra 10 e 200 nm, compatibili con le unità funzionali biologiche. Le particelle con dimensioni significativamente più elevate possono subire una rapida clearance tramite il RES (sistema reticoloendoteliale) mentre le particelle più piccole possono essere eliminate per via renale. [120]

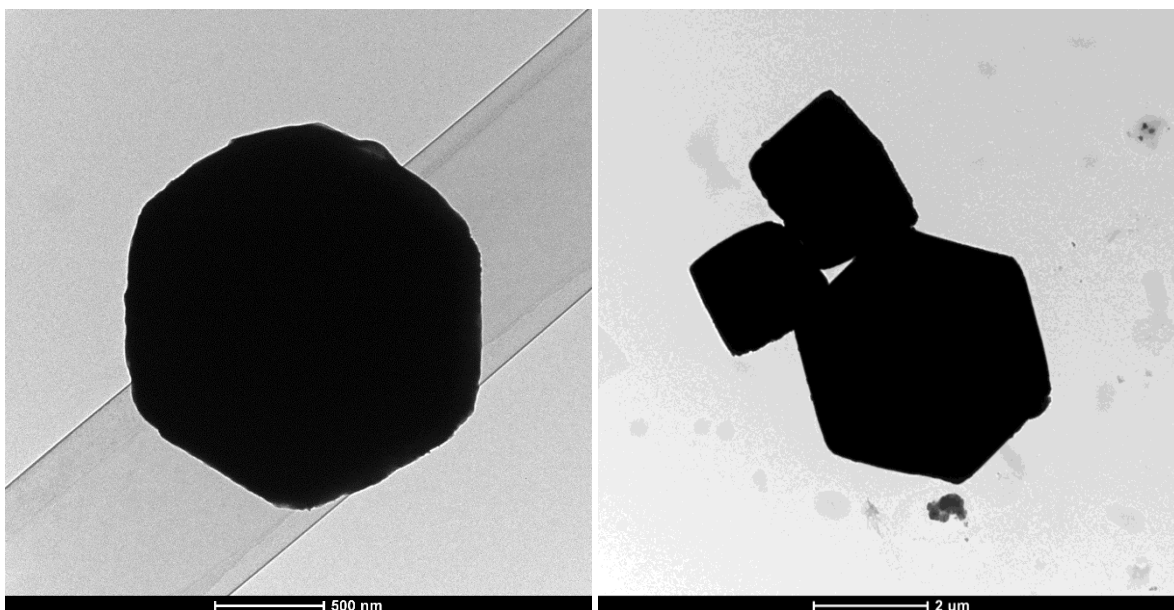


Figura 21: Immagini TEM di ZnO a 135 °C

Per cercare di ridurre le dimensioni delle particelle è stato sperimentato un secondo protocollo di sintesi idrotermale, ossia il protocollo di Diodati et al. [84]. Come fonte di ioni Zn^{2+} è stata utilizzata una soluzione di zinco acetilacetato, alla quale è stato aggiunto acido ossalico (in rapporto molare 1:1), un agente precipitante chelante che ha permesso di ottenere una sospensione di ossalato di zinco. A questa miscela sono stati aggiunti idrossido di tetraetilammonio al 20% p/p come agente peptizzante e una soluzione di idrossido di sodio (10 M) a temperatura ambiente per innalzare il pH della soluzione, quindi deprotonare l'acido ossalico e provocare la precipitazione dell'ossalato. La miscela risultante è stata sottoposta a trattamento idrotermale e, dopo isolamento, purificazione ed essiccazione del prodotto si è ottenuta una polvere bianca. Il pH della soluzione finale è risultato un fattore chiave nella sintesi, in quanto solamente a valori di pH superiori a 12 è stato possibile ottenere ZnO cristallino (vedi diffrattogramma in appendice) mentre a valori inferiori si otteneva ossalato di zinco. Ciò è in disaccordo con il protocollo Diodati [84], nel quale si è ottenuto il prodotto desiderato portando il pH della sospensione a 10. La dimensione media dei cristalliti, calcolata mediante la formula di Scherrer, è di 38 nm. Dalle analisi al TEM si è potuto osservare un cambiamento della morfologia e delle dimensioni delle particelle rispetto al protocollo testato precedentemente. Le particelle sintetizzate con il protocollo Diodati sono caratterizzate da una forma simile ad una stella e le dimensioni sono risultate inferiori, con una media di 1,8 μm per particella (rispetto ai 6 μm). (Figura 22) La resa di reazione è risultata molto elevata, intorno al 98 %, ma anch'esse non rientrano nel range della nanoscala e quindi non risultano adatte per applicazioni biomediche.

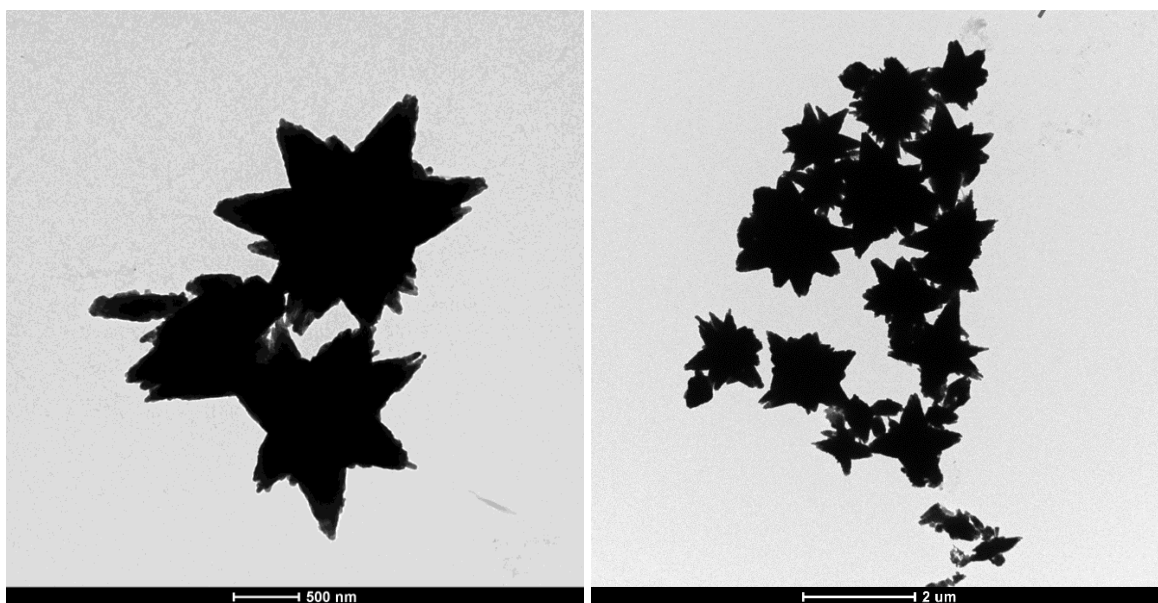


Figura 22: Immagini TEM di ZnO a 135 °C (con protocollo Diodati)

5.1.2 Sintesi biogenica

Uno dei principali obiettivi in campo scientifico e industriale è quello di adottare approcci più sostenibili per la sintesi di ZnO, mantenendo allo stesso tempo le proprietà funzionali rilevanti che caratterizzano questo materiale. Come accennato in precedenza, la sintesi biogenica rappresenta un approccio sostenibile e *green* per la sintesi di ZnO. Non è ancora ben chiaro il meccanismo di sintesi ma è promettente in quanto permette di ridurre il numero di reagenti chimici potenzialmente tossici, in accordo con i principi della chimica verde. Nella sintesi biogenica si sfruttano le molecole bioattive presenti nella microalga come agenti precipitanti e/o stabilizzanti quindi si possono ottenere nanoparticelle di ossido di zinco con il solo utilizzo di un sale di zinco precursore ed estratto di microalghe. Ad esempio Azizi et al. hanno sintetizzato nanoparticelle di ZnO con una dimensione media di 42 nm, partendo da acetato di zinco e l'estratto della macroalga bruna *Sargassum muticum* senza l'aggiunta di NaOH. [95] Inoltre si è osservato che la presenza dell'agente biogenico può contribuire alla stabilizzazione delle nanoparticelle sintetizzate [121]. Va però precisato che le sintesi con gli estratti di microalghe sono poco riproducibili a causa della variabilità della composizione dell'estratto, e lo scale-up è limitato a causa delle basse rese dei prodotti cristallini ottenuti.

Per effettuare la sintesi biogenica di nanoparticelle di ossido di zinco è stato necessario coltivare la microalga *Nannochloropsis gaditana* in fotobioreattori da 45 L per poi recuperare la biomassa mediante centrifugazione. In questo modo si è potuta ottenere una concentrazione

100 volte maggiore di microalghe, pari a 73 g/L. (Figura 23)

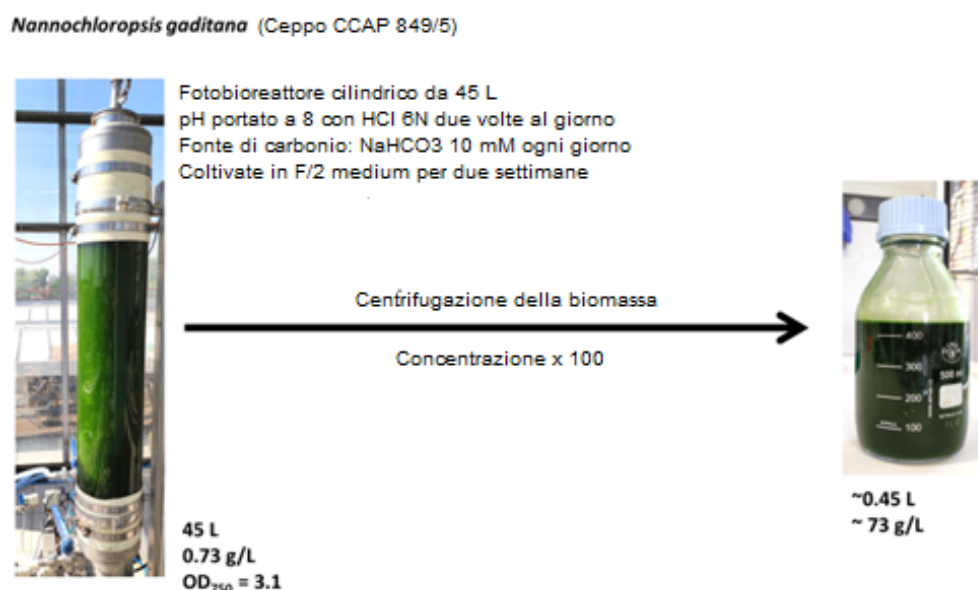


Figura 23: Fotobioreattore e concentrazione delle microalghe mediante centrifugazione

Come fonte di ioni Zn^{2+} è stato utilizzato lo zinco acetato diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a cui è stato aggiunto l'estratto di microalga (vedi sezione 6.2.3). Le sintesi sono state svolte a 100 °C a refluxo (Figura 24) e per via idrotermale a 135° C ma solamente nel primo caso si è ottenuto ossido di zinco cristallino. Ciò potrebbe essere dovuto alla degradazione dei composti bioattivi presenti nelle microalghe determinata dalla temperatura di 135 °C. Generalmente proteine ed enzimi tendono a denaturare a temperature elevate, a partire dai 60°C Tuttavia, secondo esperimenti svolti da Susanna Tinello nel suo lavoro di tesi magistrale [117], le temperature elevate hanno svolto un ruolo chiave nella sintesi biogenica di nanoparticelle di ossido di zinco poiché a temperature inferiori di 80 °C non è stato ottenuto alcun prodotto cristallino. Probabilmente la cinetica della reazione è favorita dalla temperatura e le biomolecole nell'estratto potrebbero avere un'azione di stabilizzazione/templato sul prodotto finale.

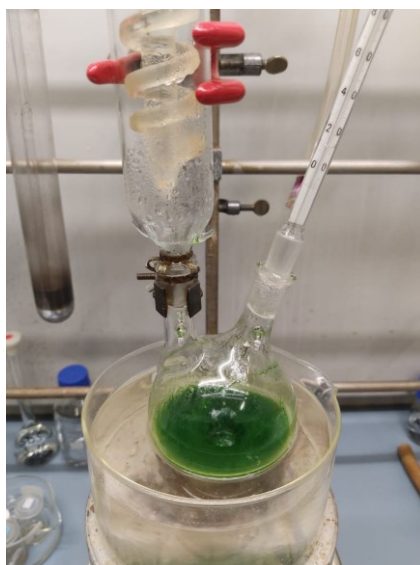


Figura 24: Sintesi biogenica di ZnO a 100 °C

Il campione, una volta sintetizzato, è stato caratterizzato tramite analisi IR, XRD e TEM. Lo spettro FTIR presenta la caratteristica banda di vibrazione tra 400 cm^{-1} e 500 cm^{-1} (Figura 25), attribuita alla vibrazione di *stretching* del legame Zn-O [118], ma contiene più picchi rispetto allo spettro dell'ossido sintetizzato a 100 °C senza microalghe. (Figura 19)

Analizzando lo spettro si possono osservare delle bande corrispondenti ai gruppi funzionali OH, C=O e C-OH [121] [122]. L'ampia banda a valori di lunghezza d'onda intorno ai 3300 cm^{-1} è dovuto alle vibrazioni di *stretching* degli ossidrili superficiali e all'acqua adsorbita superficialmente.

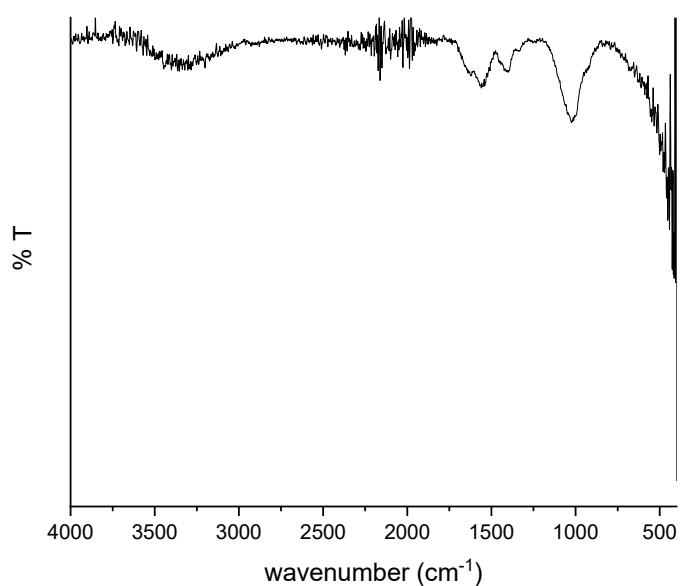


Figura 25: Spettro IR di ZnO biogenico sintetizzato a 100°C

L'analisi XRD ha consentito di attribuire al campione di ZnO ottenuto per via biogenica la fase cristallina wurtzite, con gruppo spaziale P6₃mc ed elevato grado di cristallinità (Figura 26). Nel diffrattogramma si osserva la presenza di due riflessi a 33° 2θ e 59° 2θ che non corrispondono ai tipici riflessi dello ZnO in forma wurtzite. Tali riflessi non sono stati attribuiti a nessun'altra fase cristallina e potrebbero essere impurità derivanti dal precursore acetato di zinco, ad esempio la formazione di acetato di sodio. La dimensione media dei cristalliti, calcolata con la formula di Scherrer, è di 43 nm.

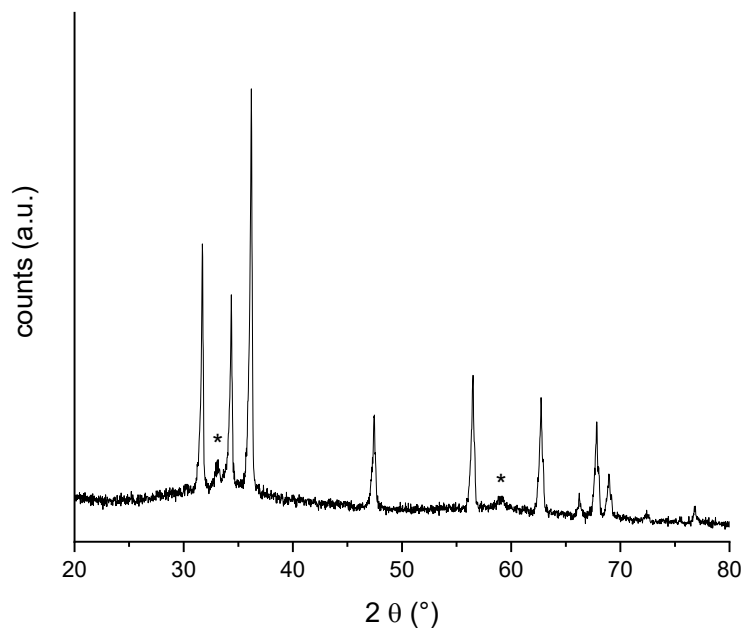


Figura 26: Spettro XRD di ZnO biogenico sintetizzato a 100 °C

** Riflessi a 33° 2θ e 59° 2θ, attribuibili a impurità non identificate*

Tramite TEM è stata osservata la morfologia delle particelle, caratterizzate da una forma esagonale con dimensioni medie di circa 2 μm per particella (Figura 27).

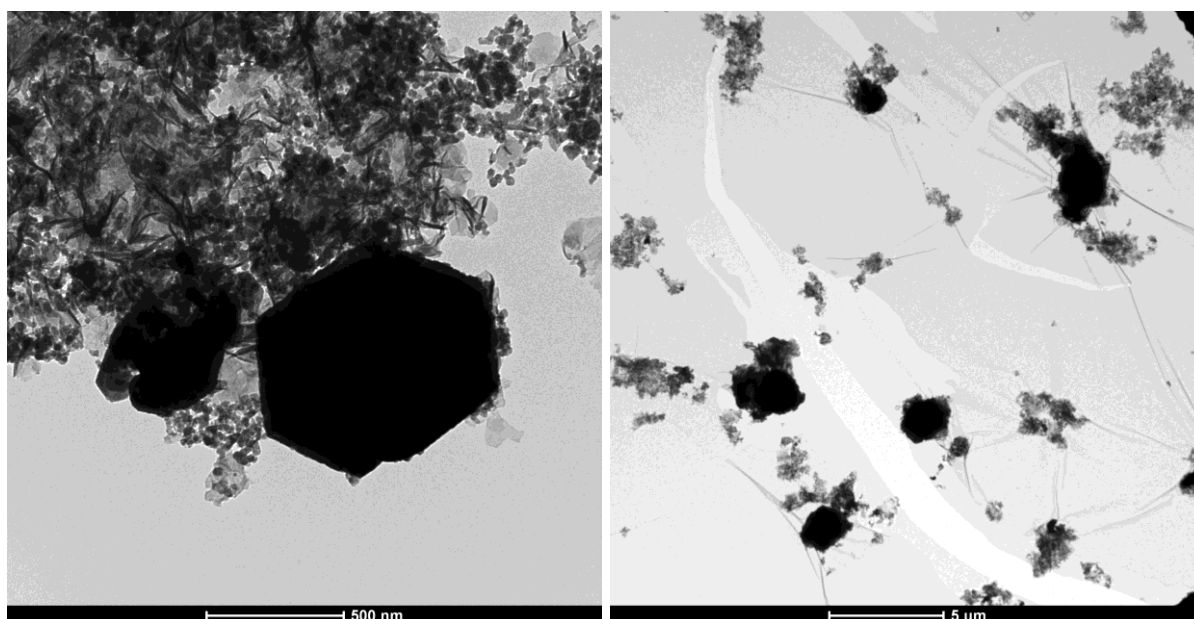


Figura 27: Immagini TEM di ZnO biogenico sintetizzato a 100°C

5.1.3 Confronto tra le sintesi

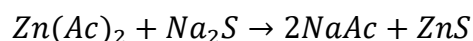
Le sintesi chimiche di ZnO, svolte a 80 e 135 °C, presentano rese di reazione comparabili ma, come già discusso, si notano differenze nelle dimensioni dei cristalliti, che risultano maggiori nella sintesi idrotermale. Con il protocollo Diodati la resa di reazione è risultata più elevata rispetto alle altre sintesi probabilmente grazie all'effetto della forte basificazione, che ha influenzato la precipitazione del prodotto e la sua resa. Entrambi i metodi di sintesi a riflusso hanno permesso di ottenere particelle di ossido di zinco cristallino a 100°C, anche se con rese molto differenti. La resa di reazione del campione MCX07 sintetizzato per via chimica è nettamente maggiore rispetto al campione MCX_Bio1 sintetizzato per via biogenica (vedi tabella 2). Si può quindi assumere che NaOH sia più efficace come agente precipitante rispetto alle biomolecole presenti nell'estratto di microalghe. Inoltre, la concentrazione delle molecole bioattive coinvolte nella formazione delle nanoparticelle è probabilmente inferiore alla concentrazione dell'idrossido di sodio utilizzato come precursore nella sintesi chimica. Ciò potrebbe spiegare il basso valore della resa di reazione del campione MCX_Bio1 (5%). La dimensione media dei cristalliti del campione di ZnO sintetizzato per via biogenica è risultata maggiore rispetto a quella dell'ossido sintetizzato con NaOH senza microalghe. Le biomolecole presenti nell'estratto potrebbero quindi avere un blando effetto stabilizzante durante la formazione dei cristalliti.

Nome campione	Temperatura reazione (°C)	Resa	XRD	Dimensione cristalliti
MCX07	100	22%	ZnO wurtzite	34 nm
MCX_Bio1	100	5%	ZnO wurtzite	43 nm

Tabella 2: Confronto campioni di ZnO sintetizzati per via chimica e biogenica

5.2. Sintesi ZnS

Le nanoparticelle di solfuro di zinco (ZnS) sono state preparate a partire da soluzioni acquose di acetato di zinco e solfuro di sodio (Na₂S). La reazione di precipitazione di ZnS in soluzione acquosa è descritta dall'equazione sottostante. Si ottiene quindi il solfuro di zinco precipitato con il sale di sodio disciolto. [123]



5.2.1 Sintesi chimica

Come visto in precedenza, ci sono numerosi metodi per sintetizzare nanoparticelle di solfuro di zinco e tutti richiedono una fonte di zolfo, oltre al sale di zinco. La fonte più usata è il solfuro di sodio poiché è facilmente disponibile, ma è anche facilmente ossidabile, il che lo rende complesso da manipolare. Altre due fonti di zolfo comunemente utilizzate per generare vari solfuri metallici sono la tiourea e la tioacetammide, anche se quest'ultima è molto tossica. [124] Per le sintesi di nanoparticelle di ZnS svolte in questo lavoro di tesi, sono stati scelti come fonte di ioni Zn²⁺ lo zinco acetato diidrato (Zn(CH₃COO)₂ · 2H₂O) mentre come fonte di zolfo si è utilizzato il solfuro di sodio nonaidrato (Na₂S · 9H₂O). Come per l'ossido di zinco, in assenza di microalghe, sono stati ottenuti diversi campioni mediante il metodo di precipitazione in soluzione acquosa e mediante sintesi idrotermale.

La formazione di nanocristalli di ZnS utilizzando questi metodi è già nota in letteratura. [125–127]. In questa tesi è stato preso come riferimento il protocollo ottimizzato da Dengo et al. [125]. Le sintesi chimiche sono state effettuate per verificare i metodi sperimentali descritti in letteratura e per confrontare i risultati ottenuti con le sintesi biogeniche effettuate con le microalghe. Grazie ai diversi metodi di sintesi adottati (bagno termico/riflusso/sintesi idrotermale) è stata studiata la variazione di temperatura nell'intervallo 40°C-135°C. Inoltre, sono stati testati due rapporti molari tra i precursori (Zn²⁺ e Na₂S) per ogni variazione di temperatura. Il tempo di reazione è stato mantenuto costante per tutte le sintesi effettuate con

lo stesso metodo, in particolare 3 h per il bagno termico o riflusso mentre per la sintesi idrotermale 24 h. Per le sintesi in bagno termico e a riflusso i campioni sono stati sintetizzati a partire da una soluzione di zinco acetato diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e una soluzione di solfuro di sodio nonaidrato (Na_2S), entrambe ad una concentrazione pari a 0,2 M e in rapporti molari Zn:S 1:2 e 1:1. Queste due soluzioni contenenti le molecole precursori sono state unite e mantenute in costante agitazione. (Figura 28) Per le sintesi idrotermali sono state utilizzate concentrazioni minori dei due precursori (0,1 M) e il solfuro di sodio è stato disciolto direttamente nel liner contenente la soluzione di zinco acetato. Durante l'aggiunta del solfuro di sodio, la soluzione (inizialmente trasparente) ha assunto un colore bianco lattiginoso, è diventata una sospensione, e come prodotto finale è stata ottenuta una polvere bianca, come si è osservato per l'ossido.



Figura 28: Sintesi di ZnS in bagno termico a 80°C

Variazione dei parametri sperimentali e analisi campioni

Nelle sintesi in bagno termico svolte a 40 e 60 °C non è stato ottenuto solfuro di zinco cristallino. Anche in questo caso la temperatura di reazione è un fattore cruciale nella cinetica di formazione del prodotto desiderato; nelle sintesi svolte al di sopra degli 80 °C è stato ottenuto solfuro di zinco nella forma cristallina sfalerite. Ciò è stato confermato dalle analisi XRD poiché i riflessi ottenuti potevano essere indicizzati con la struttura cristallina cubica di ZnS con gruppo spaziale $F\bar{4}3m$ (COD 9000107) (216). Il diffrattogramma riportato in Figura 29 mostra la relativa indicizzazione dei riflessi mediante l'attribuzione dei corrispondenti indici di Miller. L'assenza di riflessi attribuibili ad altre fasi o altre possibili specie spurie indica la purezza del prodotto.

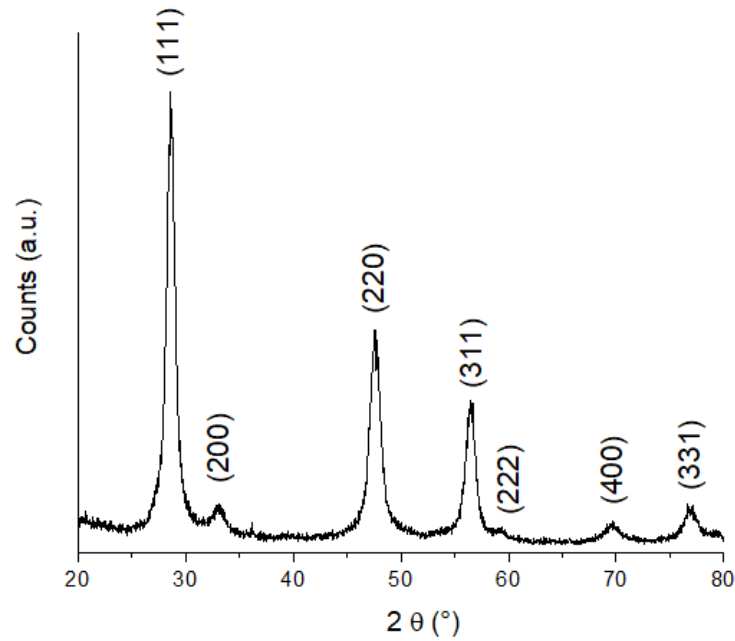


Figura 29: Diffrattogramma di ZnS (Sfalerite) con indici di Miller

Le analisi a spettroscopia infrarossa (IR) hanno permesso di verificare la presenza del legame Zn-S. Nello spettro FTIR, si osserva infatti una banda di vibrazione tra 560 e 680 cm^{-1} , che viene attribuita alla caratteristica vibrazione di *stretching* del legame Zn-S [126]. Il gruppo di picchi intorno a 1000 cm^{-1} indica la presenza di gruppi solfati dovuti all'ossidazione superficiale. [129] L'ampio picco a valori di lunghezza d'onda intorno ai 3300 cm^{-1} è dovuto alle vibrazioni di *stretching* degli ossidrili superficiali e all'acqua adsorbita superficialmente. (Figura 30)

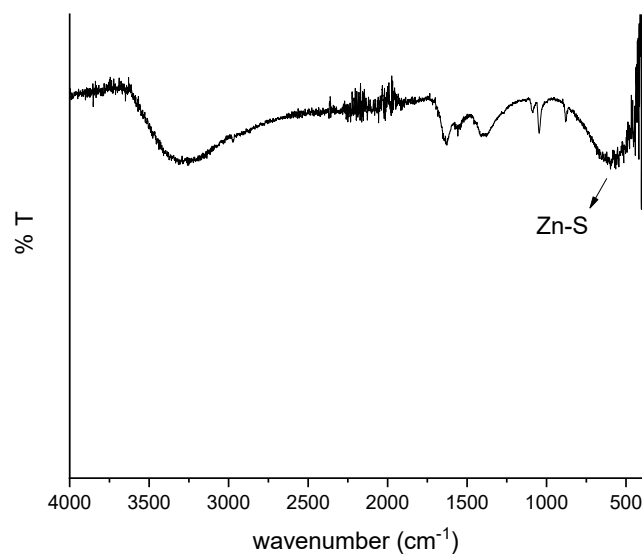


Figura 30: Spettro IR di ZnS

La variazione del rapporto molare tra i precursori (Zn^{2+} e Na_2S) non ha influenzato significativamente la resa della reazione, che è risultata molto elevata nella maggior parte dei campioni. Valori così elevati potrebbero essere indice di un'essiccazione incompleta dei prodotti. Il campione MCS07 presenta una resa più bassa rispetto agli altri campioni, tuttavia, data la percentuale di resa molto elevata per il campione MCS08, ciò si può attribuire alla perdita di prodotto durante i passaggi di purificazione. Tutti i campioni presentano un elevato grado di cristallinità, come evidenziato dal profilo rettilineo della linea di base nei diffrattogrammi XRD (Figura 31). La dimensione media dei cristalliti è stata calcolata mediante la formula di Scherrer. Come si può osservare nella tabella seguente (Tabella 3), per entrambi i rapporti molari testati, all'aumentare della temperatura la dimensione media dei cristalliti aumenta. Mantenendo invece costante la temperatura di reazione e diminuendo il rapporto molare tra i precursori la dimensione dei cristalliti decresce.

Nome campione	Temperatura reazione (°C)	Rapporto molare $\text{Zn}^{2+} / \text{Na}_2\text{S}$ (mol/mol)	Resa	Dimensione cristalliti
MCS01	80	1:2	94,5%	6 nm
MCS02	80	1:1	99,5%	3 nm
MCS07	100	1:2	57%	9 nm
MCS08	100	1:1	99%	4 nm
MCS09	135	1:2	87%	15 nm
MCS10	135	1:1	85%	6 nm

Tabella 3 Resa e dimensioni dei cristalliti dei campioni di ZnS sintetizzati a 80, 100 e 135 °C

Confrontando i dati ottenuti dalle analisi XRD si può notare che, all'aumentare della temperatura, i riflessi diventano più stretti (Figura 31). Questo conferma l'aumento delle dimensioni medie dei cristalliti, in accordo con l'equazione di Scherrer (vedi sezione 7.2).

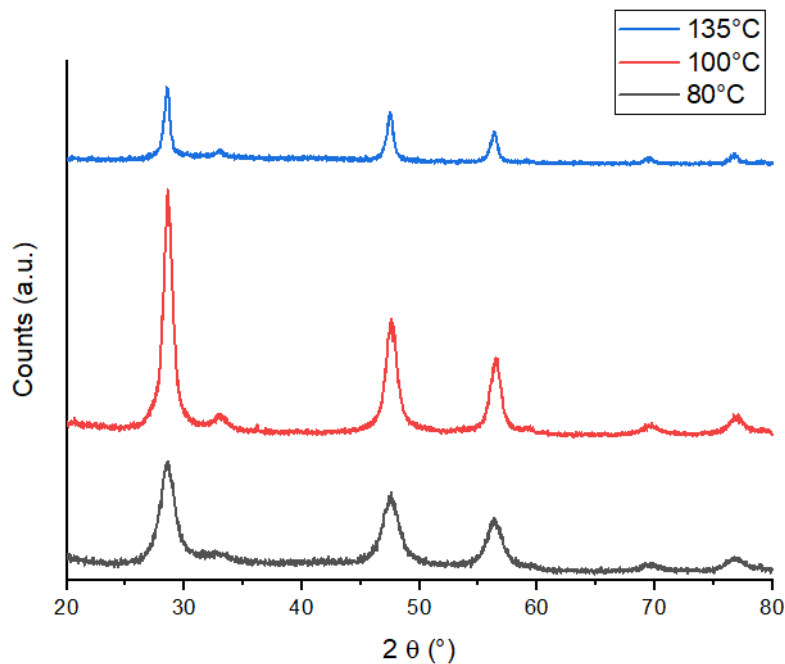


Figura 31: Confronto diffrattogrammi di ZnS a 80, 100, 135 °C

Dalle analisi TEM effettuate sul campione ottenuto a 135°C si osserva che le nanoparticelle prodotte hanno una forma sferica. Grazie alle immagini TEM è stata poi ricavata una stima della dimensione delle particelle, che risultano avere un diametro medio di 25 ± 4 nm (Figura 32). L'indice di polidispersione (PDI) di questo campione (MCS09) è risultato 0,2, indicando un'ottima omogeneità dimensionale ($PDI \leq 0,2$).

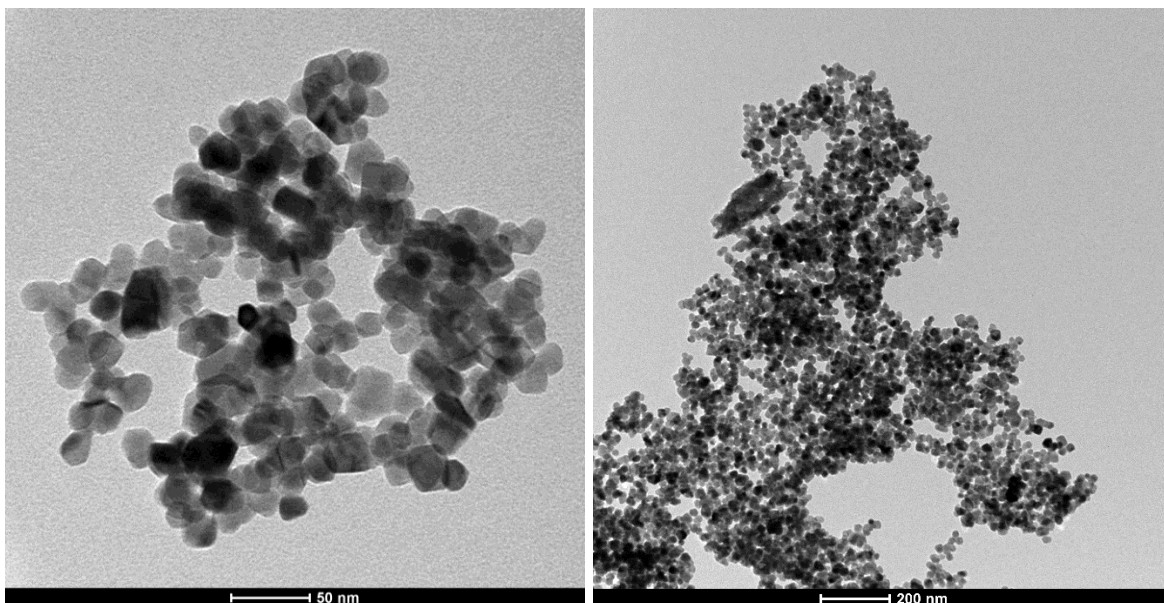


Figura 32: Immagini TEM di ZnS sintetizzato a 135 °C

Per il campione MCS09 è stata effettuata anche un'analisi SEM che ha permesso di analizzare la morfologia tridimensionale delle nanostrutture. Come è possibile osservare dalla figura 33,

le nanoparticelle di ZnS risultano piuttosto aggregate. Questo aspetto è dovuto al fatto che le nanoparticelle risultano di per sé instabili nei confronti dell'aggregazione e quindi tendono a formare *clusters* se non stabilizzate. Inoltre, anche il metodo stesso di preparazione dei campioni per eseguire le analisi tende a far aggregare la soluzione una volta posta sul retino: le nanoparticelle vengono preparate per l'analisi ponendo una goccia di soluzione su un retino di rame che viene poi lasciata essiccare; ciò comporta inevitabilmente che si verifichi l'aggregazione delle nanoparticelle contenute nel campione.

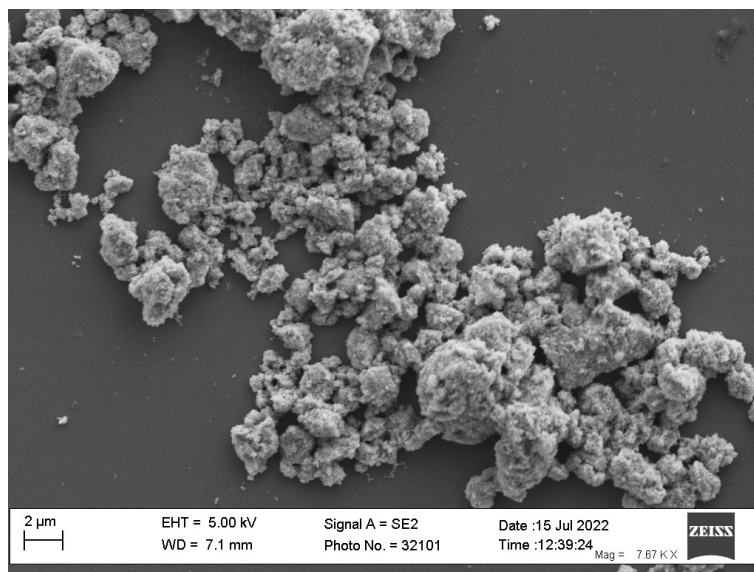


Figura 33: Immagine SEM di ZnS sintetizzato per via idrotermale

Le nanostrutture di ZnS ottenute in questo lavoro di tesi sono dotate di caratteristiche analoghe a quelle sintetizzate nel lavoro precedente di Dengo et al. [125], utilizzando una simile procedura sperimentale. Questa osservazione evidenzia l'ottima riproducibilità del metodo di sintesi impiegato. Se opportunamente drogate, le nanoparticelle ottenute possono essere utilizzate nel *bioimaging* o in altre applicazioni biomediche poiché possiedono dimensioni inferiori ai 100 nm.

5.2.2 Sintesi biogenica

Come per l'ossido di zinco si è pensato di sfruttare la sintesi biogenica come approccio sostenibile e *green* per la produzione di nanoparticelle di ZnS. Da studi di letteratura sono emersi vari protocolli che utilizzano diversi organismi o suoi componenti per la sintesi biogenica di nanoparticelle di ZnS; per esempio, il batterio fototrofico immobilizzato *Rhodobacter sphaeroides* [130], il lattice della pianta *Jatropha curcas* [131] e *Fusarium oxysporum*, un fungo comune [132]. Per questo lavoro di tesi è stata scelta come agente

biogenico la microalga *Nannochloropsis gaditana*. Quest'ultima è stata quindi coltivata, raccolta e concentrata mediante centrifugazione, come descritto precedentemente (vedi sezione 5.1.2). Nella maggior parte dei protocolli che sfruttano gli estratti acquosi di piante per sintetizzare nanostrutture di ZnS vengono utilizzate entrambe le molecole precursori, ossia una fonte di zolfo e il sale di zinco. [96] [133] [134] Rispetto alla sintesi biogenica dell'ossido di zinco non è possibile ridurre il numero di reagenti chimici in quanto entrambi i precursori sono risultati essenziali per far avvenire la reazione. Le molecole bioattive presenti nella microalga hanno probabilmente agito solo come agenti stabilizzanti essendo povere di zolfo. Per effettuare le sintesi biogeniche di nanoparticelle di ZnS sono state scelte le stesse molecole precursori utilizzate nelle precedenti sintesi chimiche, ossia lo zinco acetato diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) come fonte di ioni Zn^{2+} e il solfuro di sodio nonaidrato ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) come fonte di zolfo. Alla soluzione contenente questi due precursori è stato aggiunto l'estratto di microalga (vedi sezione 6.3.3). Le sintesi sono state svolte mediante il metodo di precipitazione in soluzione acquosa a 100°C e mediante sintesi idrotermale a 135°C.

Variazione dei parametri sperimentali e analisi dei campioni

Anche in questo caso, si è proceduto con un'analisi composizionale, strutturale e morfologica dei campioni testati. Lo spettro FTIR dei campioni di ZnS ottenuti per via biogenica presenta la caratteristica banda di vibrazione tra 560 e 680 cm^{-1} , attribuita alla caratteristica vibrazione di *stretching* del legame Zn-S [126]. Il gruppo di picchi tra 1000 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} può indicare la presenza di gruppi solfati dovuti all'ossidazione superficiale [129] e la presenza dei gruppi funzionali OH, C=O e C-OH [121] [122]. La banda larga a valori di lunghezza d'onda intorno ai 3300 cm^{-1} è dovuta alle vibrazioni di *stretching* degli ossidrili superficiali e all'acqua adsorbita superficialmente. (Figura 34)

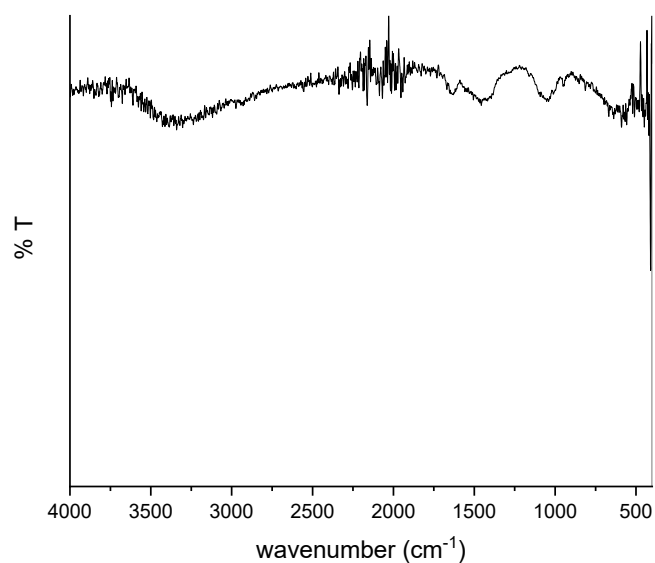


Figura 34: Spettro IR ZnS biogenico

L'analisi XRD ha consentito di attribuire ai campioni di ZnS ottenuto per via biogenica la fase cristallina sfalerite, con gruppo spaziale $F\bar{4}3m$ ed elevato grado di cristallinità (Figura 35).

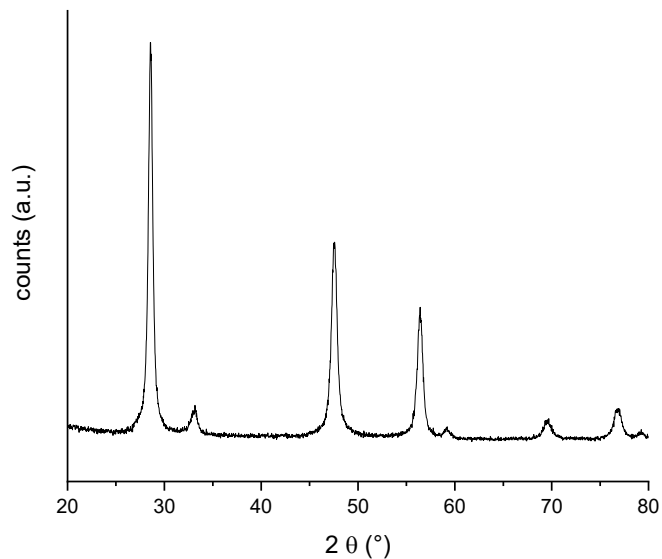


Figura 35: Diffrattogramma di ZnS biogenico

La resa di reazione è risultata molto elevata in tutti i campioni, probabilmente grazie all'inserimento di entrambi i precursori nella miscela di reazione. La dimensione media dei cristalliti è stata calcolata mediante la formula di Scherrer. Come si può osservare nella tabella 4, alla temperatura di 135°C la dimensione media dei cristalliti è maggiore rispetto a quella del campione sintetizzato a 100°C.

Nome campione	Temperatura reazione (°C)	Rapporto molare Zn^{2+} / Na_2S (mol/mol)	Resa	XRD	Dimensione cristalliti
MCS_Bio1	100	1:2	96%	ZnS sfalerite	7 nm
MCS_Bio2	135	1:2	97%	ZnS sfalerite	18 nm
MCS_Bio3	135	1:2	81 %	ZnS sfalerite	14 nm

Tabella 4: Resa e dimensione dei cristalliti dei campioni di ZnS sintetizzati per via biogenica

Dalle immagini TEM è stata poi osservata la morfologia sferica abbastanza regolare ed è stata ricavata una stima della dimensione delle particelle, che risultano avere un diametro medio di 22 ± 3 nm (Figura 36). L'indice di polidispersione (PDI) del medesimo campione (MCS_Bio2) è risultato 0,14, quindi la sospensione può essere considerata monodispersa ($PDI \leq 0,2$). Le dimensioni sono simili a quelle ottenute per via idrotermale quindi la microalga non sembra avere un effetto sulla morfologia delle nanoparticelle.

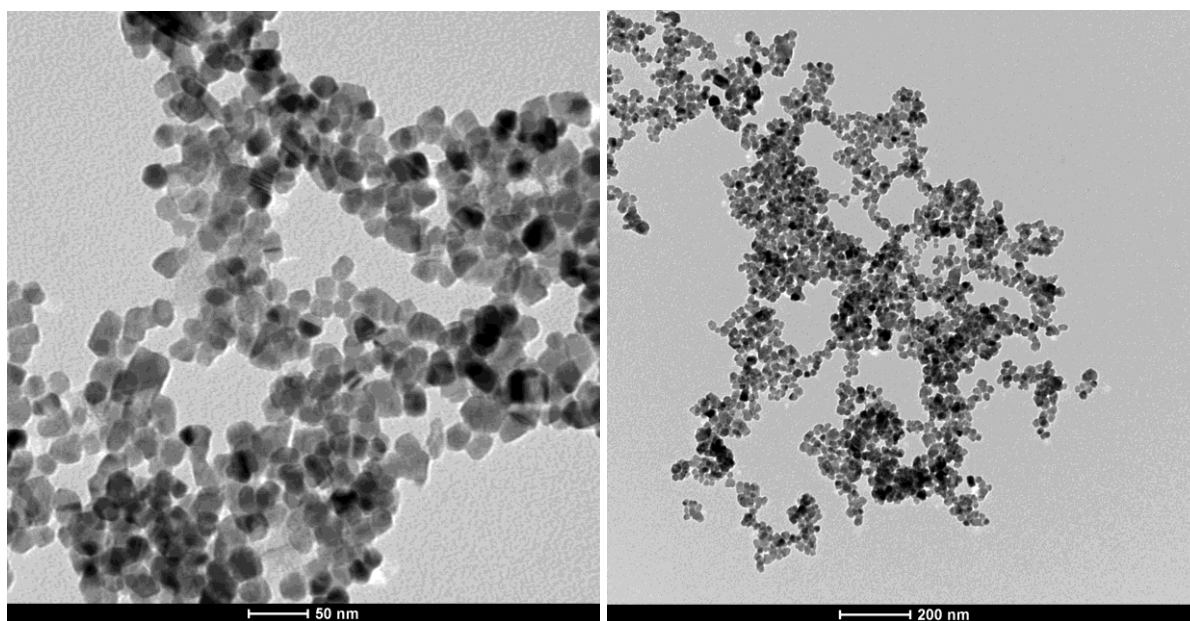


Figura 36: Immagini TEM di ZnS biogenico sintetizzato a 135 °C

5.2.3 Confronto tra le sintesi

Sono state ottenute nanoparticelle di solfuro di zinco a 100°C e 135°C con entrambi i metodi di sintesi e con rese elevate piuttosto simili. Nei campioni sintetizzati per via biogenica la resa è maggiore perché è presente anche la componente organica delle alghe nel prodotto finale. Le dimensioni dei cristalliti risultano comparabili al variare del metodo di sintesi, mantenendo costante la temperatura di reazione. (Tabella 5) Sia nel caso di ZnS che ZnO sintetizzati per via idrotermale, i cristalliti sono risultati un po' più grandi rispetto alle sintesi effettuate a

temperature inferiori. La sintesi idrotermale sembra quindi essere il metodo più adatto per ottenere cristalliti con dimensioni elevate. Le immagini al TEM (Figura 32 e 36) mostrano l'elevata comparabilità morfologica e dimensionale tra i campioni MCS09 e MCS_Bio2. Le biomolecole presenti nell'estratto di microalghe non hanno portato a variazioni significative dei prodotti quindi non si può attribuire alle stesse alcun effetto stabilizzante.

Nome campione	Temperatura reazione (°C)	Rapporto molare Zn^{2+} / Na_2S (mol/mol)	Resa	XRD	Dimensione cristalliti
MCS07	100	1:2	57%	ZnS sfalerite	9 nm
MCS09	135	1:2	87%	ZnS sfalerite	15 nm
MCS_Bio1	100	1:2	96%	ZnS sfalerite	7 nm
MCS_Bio2	135	1:2	97%	ZnS sfalerite	18 nm
MCS_Bio3	135	1:2	81 %	ZnS sfalerite	14 nm

Tabella 5: Confronto campioni di ZnS sintetizzati per via chimica e biogenica

5.3. Analisi di stabilità delle nanoparticelle

Tra i requisiti richiesti dalla potenziale applicazione delle nanostrutture sintetizzate nel settore biomedico, è di rilevante importanza la stabilità colloidale nei confronti dell'aggregazione in sospensione acquosa. La stabilità delle nanoparticelle di ossido e solfuro di zinco può essere ottenuta per via elettrostatica o per via sterica, come già discusso nel capitolo 4. Innanzitutto, è stato necessario studiare la chimica della superficie delle nanoparticelle sintetizzate in questo lavoro di Tesi. La superficie dell'ossido di zinco presenta gruppi ossidrilici e acqua adsorbita. La chimica di superficie degli ossidi metallici è caratterizzata dalla presenza sulla superficie di gruppi idrossido (M-OH). Le molecole d'acqua possono essere adsorbite sia fisicamente che chimicamente sulla superficie delle particelle di ossido disperse. I gruppi ossidrilici polari (-OH) possono far sì che la superficie attragga e adsorba fisicamente uno o più strati aggiuntivi di molecole di acqua polare. Una superficie di ossido o idrossido (M-OH) può caricarsi reagendo con ioni H^+ o OH^- in funzione del pH. A valori di pH minori del punto isoelettrico di ZnO, le superfici di idrossido adsorbono i protoni per produrre superfici cariche positivamente ($M-OH_2^+$). A pH superiori al punto isoelettrico di ZnO perdono protoni per produrre superfici caricate negativamente ($M-O^-$). [135]

La superficie del solfuro di zinco è caratterizzata dalla presenza di gruppi tiolici e acqua adsorbita, oltre a gruppi solfato e solfito dovuti all'ossidazione superficiale. In questo caso, a

seconda del pH delle sospensioni colloidali, l'acqua adsorbita sulla superficie, così come i gruppi -SH superficiali, possono essere protonati, neutri o deprotonati. La carica superficiale delle particelle di ossido e solfuro di zinco è quindi determinata dal pH della soluzione. Il punto isoelettrico di ZnO e ZnS, ossia il valore di pH a cui il loro potenziale zeta è nullo, è rispettivamente intorno a 9 [136] e 7 [137]. L'ambiente di reazione leggermente basico comporta quindi la presenza di gruppi solfuro deprotonati sulla superficie delle nanoparticelle di ZnS sintetizzate e quindi una carica globale negativa. Questa carica negativa superficiale garantisce una buona stabilità colloidale delle nanostrutture, grazie alla repulsione tra le particelle stesse. Secondo il punto isoelettrico, l'ossido di zinco dovrebbe avere carica positiva a pH neutro. Tuttavia il suo potenziale zeta è risultato negativo probabilmente a causa dell'adsorbimento delle proteine del siero (FBS) [138]. Per quantificare la stabilizzazione elettrostatica delle sospensioni colloidali sono state effettuate misure del potenziale zeta delle stesse. Una sospensione viene considerata stabile quando il suo potenziale zeta è superiore a ± 30 mV [139].

Alcuni campioni di ossido e solfuro di zinco sotto forma di polveri sono stati sospesi in acqua e siero al 3% v/v alle concentrazioni di 0,4 e 1 mg/mL. Come si può osservare nella tabella 6, i valori di potenziale zeta misurato il giorno stesso e il giorno seguente sono risultati più bassi del valore di ± 30 mV, confermando l'instabilità delle particelle in ambiente acquoso. I campioni di solfuro di zinco (MCS01) hanno riportato valori leggermente più elevati rispetto a quelli di ossido di zinco (MCX01). Ciò è attribuibile alle diverse dimensioni e alla differente chimica superficiale delle particelle che ne modifica la repulsione elettrostatica delle stesse.

Nome campione	Solvente	Concentrazione (mg/mL)	Potenziale zeta (mV)	Potenziale zeta 2 gg (mV)
MCX01	H ₂ O +siero 3% v/v	0,4	-23,6	-17,4
MCX01	H ₂ O +siero 3% v/v	1	-21,3	-18,9
MCX07	H ₂ O +siero 3% v/v	1	-1,8	/
MCX11	H ₂ O +siero 3% v/v	1	-8,6	/
MCS01	H ₂ O +siero 3% v/v	0,4	-26,1	-24,6
MCS01	H ₂ O +siero 3% v/v	1	-24,5	-25,6

Tabella 6: Potenziale zeta dei campioni di ZnO e ZnS

Successivamente si è pensato di sospendere il solfuro di zinco in acqua e siero prima di farlo essiccare per mantenere lo strato stabilizzante di acqua adsorbita. In questo caso le misure di potenziale zeta dei campioni di ZnS sono risultate piuttosto soddisfacenti in quanto in due

campioni è stato raggiunto il valore minimo di stabilità (-30 mV). (Tabella 7)

Nome campione	Solvente	Concentrazione (mg/mL)	Potenziale Zeta (mV)
MCS12 (bagnato)	H ₂ O +siero 3% v/v	2	-30
MCS13 (bagnato)	H ₂ O +siero 3% v/v	1	-22
MCS_Bio2 (bagnato)	H ₂ O +siero 3% v/v	1	-30

Tabella 7: Potenziale zeta di campioni di ZnS non seccati

La sospensione del campione MCS12 è rimasta opalescente per circa una settimana, indice di una buona stabilità colloidale. Col passare del tempo si è poi osservata una progressiva precipitazione dovuta a fenomeni di aggregazione delle nanoparticelle. (Figura 37)

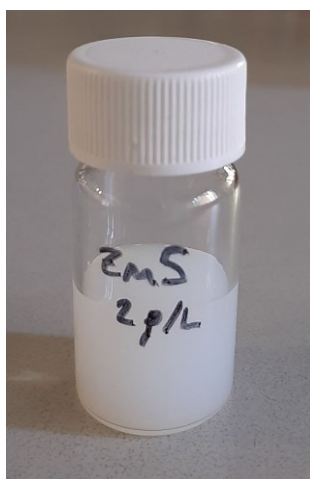


Figura 37: Sospensione campione MCS12 alla concentrazione di 2 g/L

5.4. Prove di funzionalizzazione

Mentre nel campo della sintesi sono riportate molteplici ed efficaci procedure di sintesi per nanostrutture di ossido e solfuro di zinco, la letteratura relativa alla funzionalizzazione degli stessi è molto limitata e, in vari casi, incompleta e lacunosa. Ciò va correlato alla scarsa caratterizzazione e conoscenza della chimica di superficie di questi materiali. Recenti studi di Dengo et al. hanno portato ad un'ottima caratterizzazione superficiale delle NPs di ZnS sintetizzate per via idrotermale, mostrando una composizione di ZnS abbastanza pura e una notevole quantità di molecole d'acqua adsorbite [140]. Per stabilizzare le nanoparticelle di ossido di zinco in soluzione acquosa sono stati effettuati diversi protocolli di funzionalizzazione con PEG, attuando sia strategie di post-funzionalizzazione che di funzionalizzazione diretta (vedi sezione 6.4). Entrambe le strategie non hanno portato a risultati promettenti in quanto il

PEG non sembra essersi legato alla superficie delle nanostrutture. Come si può osservare dai due grafici, nella figura 38A sono presenti i picchi caratteristici del PEG, i quali non sono presenti nel campione di ZnO teoricamente funzionalizzato con PEG (figura 38B). La mancanza delle bande vibrazionali relative al PEG (*stretching* O-H (3400 cm^{-1}), *stretching* C-H (2880 cm^{-1}), *bending* C-O-H (1340 cm^{-1}), *stretching* C-O-C (1100 cm^{-1}), *stretching* C-C ($1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$), *bending* C-H ($840\text{ e }1460\text{ cm}^{-1}$) [141]) indica quindi che la funzionalizzazione non è andata a buon fine.

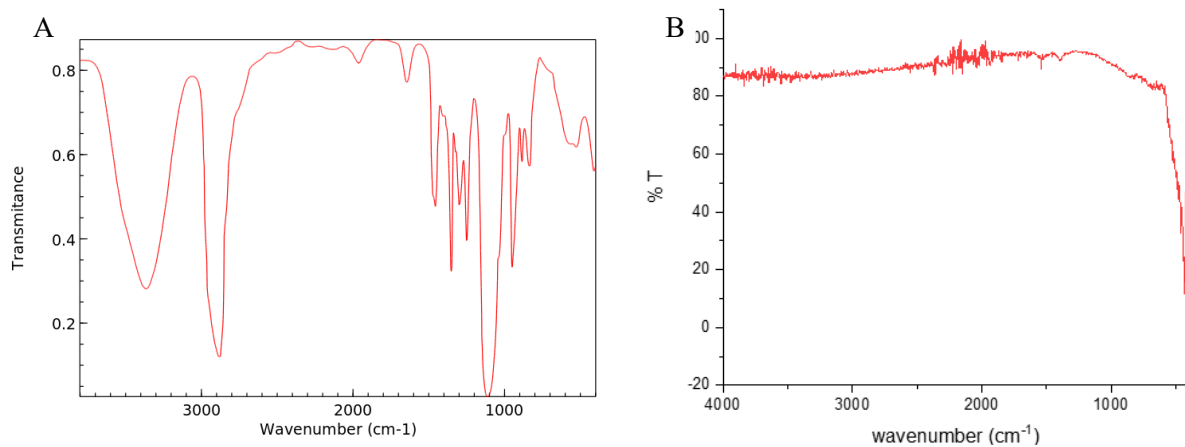


Figura 38: A) Spettro IR del PEG [141]; B) Spettro IR di ZnO+PEG

5.5. Analisi della citotossicità delle nanoparticelle di ZnS

In questa tesi è stata analizzata la citotossicità delle nanoparticelle di solfuro di zinco, che essendo molto piccole e piuttosto stabili in acqua, hanno permesso di effettuare i test di citotossicità su una linea di cellule umane del cancro al colon, chiamata HTC116. Purtroppo, le elevate dimensioni (2-6 μm) e la bassa stabilità (potenziale $Z < -30 \text{ mV}$) delle nanoparticelle di ossido di zinco non hanno permesso di valutare la loro citotossicità in queste cellule umane.

5.5.1 Citotossicità delle nanoparticelle di ZnS in cellule umane coltivate in 2D

Le cellule HCT116, fatte crescere in 2D, sono state incubate per 24 ore con le sospensioni delle nanoparticelle di solfuro di zinco (ZnS) sintetizzate per via idrotermale, in concentrazione compresa tra 0 e 500 $\mu\text{g/ml}$ (vedi sezione 6.5.1). La citotossicità indotta dalle nanoparticelle è stata valutata mediante saggio MTS in 3 esperimenti indipendenti, ciascuno condotto in triplicato. Inizialmente sono state testate sospensioni di nanoparticelle di ZnS non filtrate e filtrate, ma si è osservato che quelle non filtrate non erano adatte per il saggio in quanto le impurità presenti nella sospensione nanoparticellare alteravano la lettura di assorbanza allo spettrofotometro. Quindi nei saggi successivi sono state testate solo sospensioni di ZnS purificate con filtro a pori di 0,22 μm . Come prima valutazione della citotossicità, le cellule HCT116 seminate nei pozzetti sono state osservate al microscopio ottico. Come si può notare dall'immagine in Figura 38B, le cellule sono apparse vitali dopo incubazione di 24h con la dose più alta di nanoparticelle sintetizzate per via idrotermale (500 $\mu\text{g/ml}$). Inoltre, non sono state osservate variazioni morfologiche e/o dimensionali tra le cellule incubate con le nanoparticelle e quelle di controllo incubate con il solo terreno (Figura 39A-B). Anche le cellule incubate con le nanoparticelle di ZnS sintetizzate per via biogenica sono apparse vitali e non hanno mostrato segni visibili di alterazioni morfologiche. Da questa prima analisi si può già escludere un effetto altamente tossico delle nanoparticelle di ZnS in quanto questo avrebbe causato visibili alterazioni morfologiche e dimensionali delle cellule.

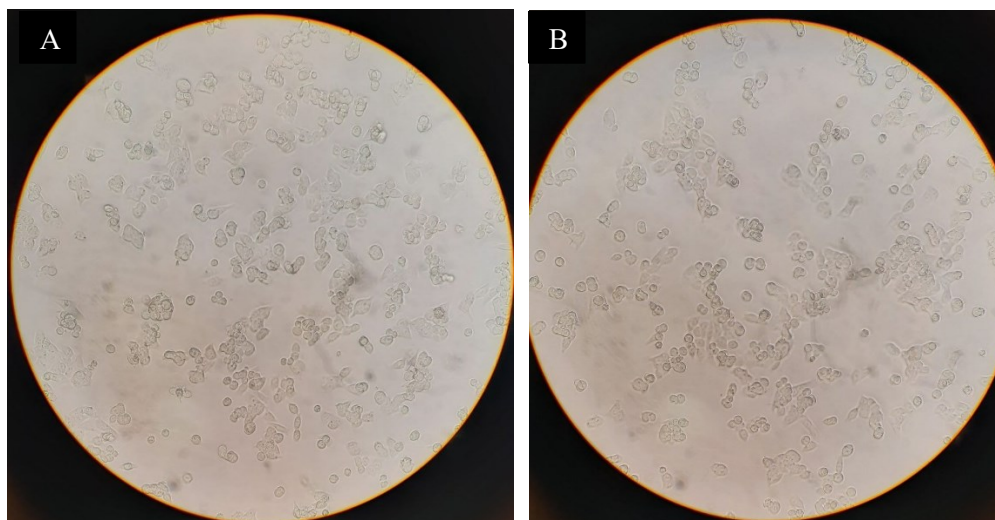


Figura 39: Cellule HCT116 osservate al microscopio ottico; A) Cellule di controllo senza NPs, B) Cellule incubate con ZnS NPs alla concentrazione di 500 µg/ml sintetizzate per via idrotermale.

In Figura 40 sono riportati i risultati di citotossicità derivanti dal saggio MTS. I risultati mostrano che vi è una leggera diminuzione della vitalità cellulare all'aumentare della concentrazione delle nanoparticelle di solfuro di zinco. Fino alla concentrazione di 400 µg/ml di ZnS la percentuale di vitalità cellulare decresce, anche se non linearmente, rimanendo intorno al 90 %. Alla concentrazione di 500 µg/ml di nanoparticelle si distingue un maggior effetto citotossico poiché il valore di vitalità cellulare risulta intorno al 76%. (Figura 40) In conclusione, le nanoparticelle di ZnS sintetizzate per via idrotermale possono essere considerate lievemente tossiche per le cellule HCT116 a partire da concentrazioni ≥ 100 microgrammi/mL. Dai valori di deviazione standard, si osserva che vi sono variazioni tra i 3 esperimenti, e questo è atteso quando si lavora con cellule vive, dato che esiste una variabilità inter-sperimentale a livello di conta cellulare per la semina nelle piastre del saggio, così come piccole variazioni di crescita cellulare, così come lievi differenze nella durata dell'incubazione del saggio MTS. A questo si aggiunge una concentrazione della sospensione nanoparticellare non esattamente identica in tutti gli esperimenti.

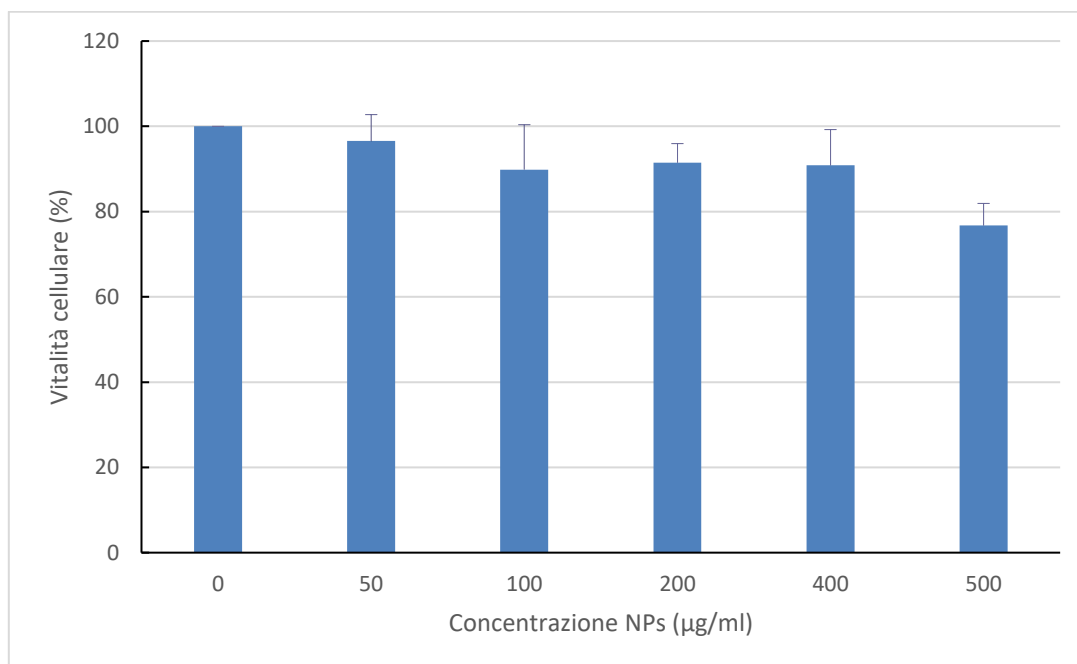


Figura 40: Vitalità delle cellule HCT116 dopo 24 ore di incubazione con ZnS idrotermale. I dati sono la media $\pm$ deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti ciascuno condotto in triplicato per ciascuna dose di nanoparticelle.

In Figura 41 sono stati riportati i risultati di citotossicità determinata con saggio MTS derivanti dalla media di tre esperimenti indipendenti, questa volta incubando le cellule HCT116 con nanoparticelle di ZnS sintetizzate per via biogenica. Anche in questo caso i risultati mostrano che vi è una leggera diminuzione della vitalità cellulare all'aumentare della concentrazione delle nanoparticelle di solfuro di zinco. I dati ottenuti sono molto simili ai precedenti (Figura 40), infatti fino alla concentrazione di 400 µg/ml di ZnS la percentuale di vitalità si trova all'interno del range 80-95%, mentre alla concentrazione di 500 µg/ml il valore scende intorno al 76 %. In questo caso l'attività citotossica potrebbe essere dovuta anche alle microalghe che rimangono attaccate sulla superficie delle nanoparticelle. Infatti, nonostante i passaggi di purificazione, il prodotto può contenere dei residui organici sulla superficie e questi potrebbero avere un effetto citotossico. L'andamento della vitalità cellulare decresce in modo più lineare rispetto a quello delle nanoparticelle di ZnS sintetizzate per via idrotermale (Figura 41). Ciò può essere dovuto alla concentrazione più omogenea del campione. Il grafico presenta però elevati valori di deviazione standard, indicando sempre un'alta variabilità tra i 3 esperimenti. Anche le nanoparticelle di ZnS sintetizzate per via biogenica possono essere considerate lievemente tossiche per le cellule HCT116 a basse concentrazioni, con effetto paragonabile a quelle sintetizzate per via idrotermale.

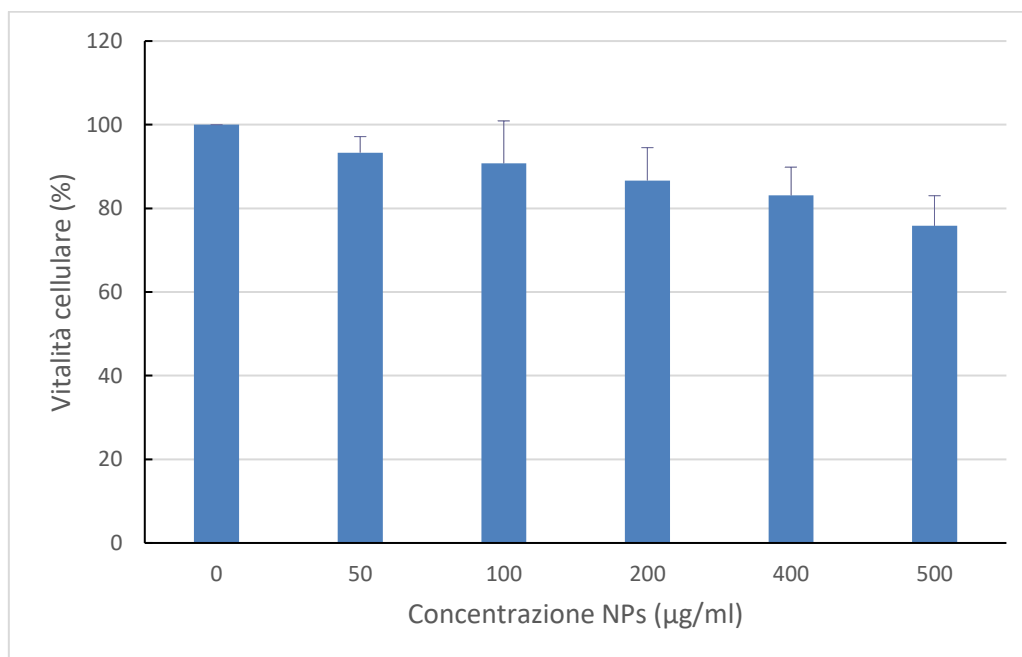


Figura 41: Vitalità delle cellule HCT116 dopo 24 ore di incubazione con ZnS biogenico. I dati sono la media $\pm$ deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti ciascuno condotto in triplicato per ciascuna dose di nanoparticelle.

Il saggio clonogenico ha permesso di valutare la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule HCT116, incubate con 3 diverse concentrazioni di nanoparticelle di ZnS; 50 µg/ml, 200 µg/ml e 500 µg/ml (vedi sezione 6.5.2). Le cellule opportunamente diluite sono state seminate in capsule di petri da 5 mL (21 totali) in terreno RPMI con 10% siero (FBS). In seguito al trattamento con le nanoparticelle di ZnS sintetizzate per via idrotermale e biogenica, si è atteso il tempo necessario affinché le cellule formassero dei cloni macroscopicamente visibili, il che può variare da una a tre settimane a seconda della linea cellulare. Dopo soli 4 giorni si è potuto osservare la formazione di colonie cellulari ben distinte nella superficie di tutte le capsule (Figura 42).



Figura 42: Cloni di cellule HCT116 vive osservati al microscopio ottico in contrasto di fase a 8 gg dalla semina.

Allo scopo di confrontare e contare i cloni ottenuti nelle diverse capsule, quest'ultimi sono stati fissati e colorati. Dalle immagini 43A e 43B si nota che le capsule di controllo presentano circa lo stesso numero di cloni di quelle trattate con i due tipi di nanoparticelle (idrotermali e biogeniche). Nelle capsule contenenti i cloni trattati con le nanoparticelle biogeniche (Figura 43B) sembrano esserci meno cloni rispetto alle capsule trattate con le nanoparticelle idrotermali (Figura 43A), tuttavia, vi è solo una distribuzione più omogenea dei cloni nelle capsule.

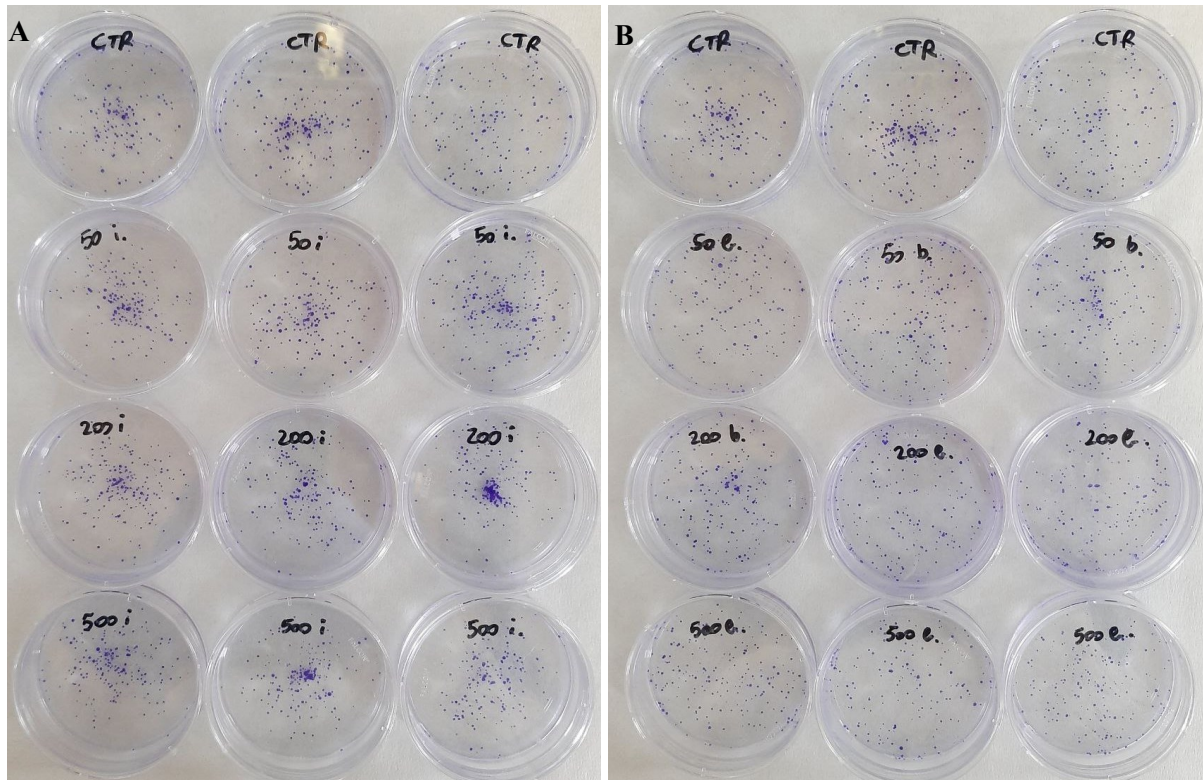


Figura 43: Immagini dei cloni colorati dopo trattamento con ZnS NPs idrotermali (A) e dopo trattamento con ZnS NPs biogenico (B).

Dopo aver effettuato la conta dei cloni sono state calcolate l'efficienza di clonaggio e la sopravvivenza cellulare per ogni concentrazione e tipo di nanoparticella (vedi tabella in appendice). Questi parametri sono risultati molto elevati per ogni tipo di capsula, con valori intorno al 100%. (Figura 44) Ciò indica che le nanoparticelle di ZnS sintetizzate per via idrotermale (barre blu) e biogenica (barre verdi) non hanno avuto alcun tipo di effetto sulla formazione delle colonie. Le cellule HCT116 sono sopravvissute e hanno mantenuto la capacità proliferativa per ogni dose testata di nanoparticelle, compresa quella più alta (500 µg/ml). Va precisato che questo saggio è stato condotto con la stessa sospensione di ZnS utilizzata nei precedenti saggi di MTS; col passare del tempo è possibile che le NPs si siano in parte aggregate e quindi non si vedano gli effetti attesi poiché questo tipo di saggio è più sensibile del saggio MTS.

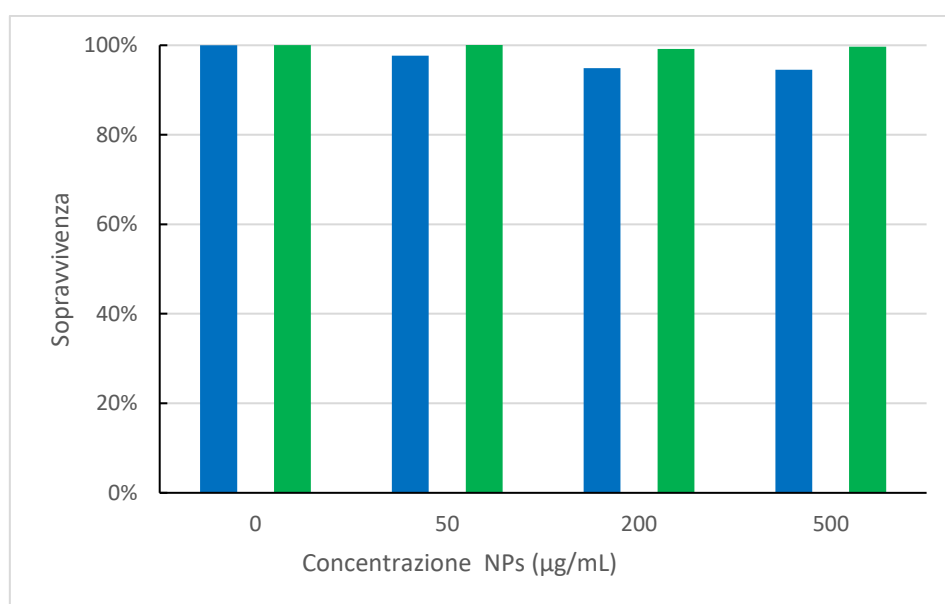


Figura 44: Sopravvivenza delle cellule HCT116 dopo trattamento di 24 h con ZnS NPs idrotermali (blu) e dopo trattamento con ZnS NPs biogenico (verde). I dati si riferiscono ad un unico esperimento condotto in triplicato.

5.5.2 Citotossicità delle nanoparticelle di ZnS in cellule umane coltivate in 3D

La citotossicità delle nanoparticelle di ZnS è stata valutata anche su modelli 3D di cellule HCT116 utilizzando il kit *LIVE/DEAD*. Come già accennato precedentemente, i modelli 3D, noti come sferoidi, risultano più adatti dei modelli 2D nella ricerca tossicologica [142]. Gli sferoidi formati da cellule HCT116 sono stati incubati con la sospensione più concentrata (500 µg/ml) delle nanoparticelle di ZnS e il giorno seguente con la soluzione contenente i due coloranti fluorescenti (calceina AM/EthD-1) (vedi sezione 6.5.3). Il saggio LIVE/DEAD ha quindi permesso di valutare qualitativamente la vitalità cellulare osservando la fluorescenza verde o rossa emessa dagli sferoidi, mediante un microscopio a fluorescenza.

Lo sferoide di controllo non trattato con le nanoparticelle ha una forma sferica (Figura 45A), mentre lo sferoide incubato con le nanoparticelle sintetizzate per via idrotermale presenta una forma ellittica (Figura 45C), dovuta probabilmente ad una sua deformazione durante il lavaggio. Dalle immagini ottenute al microscopio a fluorescenza (Figura 45) si può notare una localizzazione delle cellule vive, colorate in verde, nella parte esterna degli sferoidi e la presenza di cellule morte (rosse) principalmente a livello della zona centrale, chiamata anche nucleo necrotico o zona ipossica. Secondo studi riguardanti sferoidi multicellulari tumorali, durante la fase di crescita si sviluppano tre aree istologiche distinte; una “crosta” esterna proliferativa, uno strato non proliferativo e un “core” centrale necrotico [143] [144]. Queste

diverse aree istologiche si sviluppano con la crescita dello sferoide in risposta alle limitazioni dei nutrienti e all'interazione cellulare. La mancanza di ossigeno e nutrienti all'interno dello sferoide, come anche la privazione dei fattori di crescita e l'aumento della pressione limitano la divisione delle cellule tumorali, causandone spesso la necrosi [144]. La morte cellulare che si osserva dalle immagini 45B-D, in accordo con i risultati ottenuti nei saggi MTS, non è quindi attribuibile all'effetto citotossico delle nanoparticelle di ZnS. Inoltre, quest'ultime, essendo internalizzate in primo luogo dalle cellule più esterne, dovrebbero causare prima la morte delle cellule superficiali e difficilmente raggiungono l'interno dello sferoide.

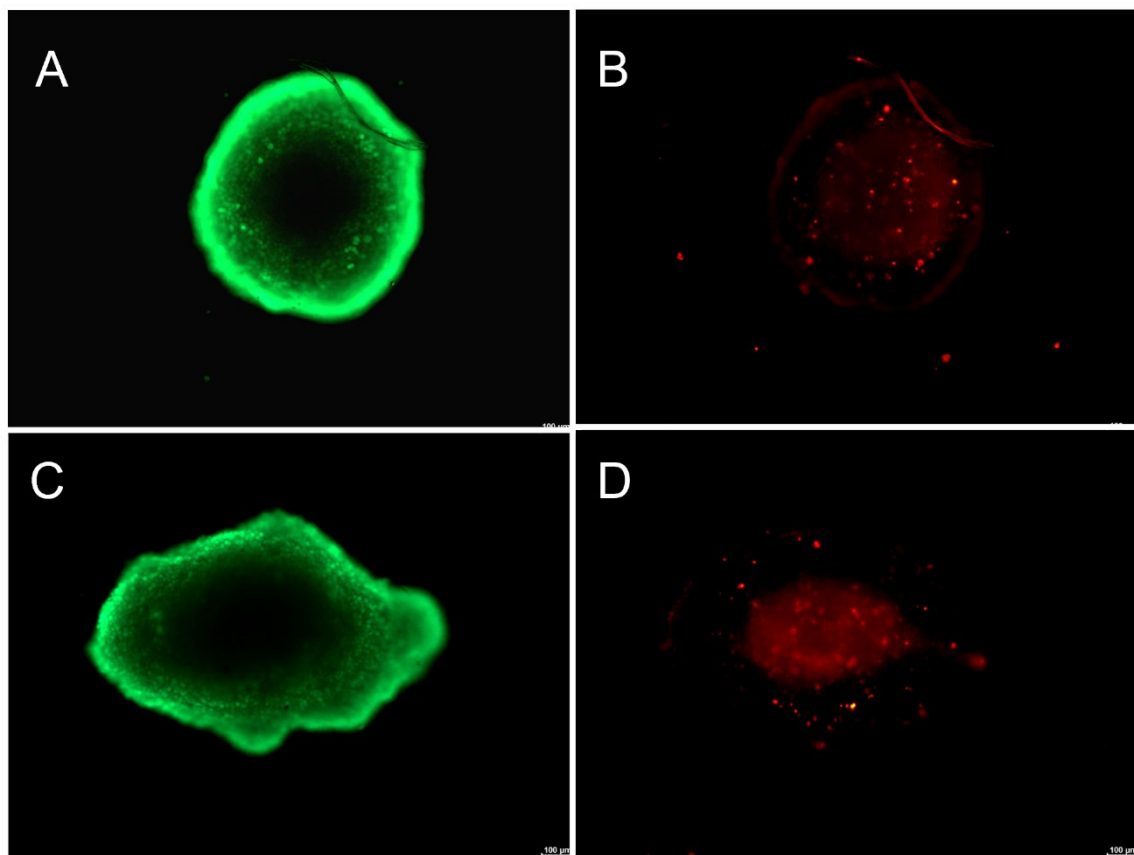


Figura 45: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza dello sferoide di HCT116 di controllo non trattato (A-B) e di quello incubato con le nanoparticelle ZnS idrotermali alla concentrazione di 500 µg/ml (C-D).

Lo sferoide di controllo (Figura 46 A) e lo sferoide incubato con le nanoparticelle sintetizzate per via biogenica (Figura 46 C) presentano entrambi una forma sferica. Come nel caso precedente, dalle immagini a fluorescenza si può osservare una localizzazione delle cellule vive (verdi) nella parte esterna degli sferoidi e delle cellule morte (rosse) nella zona centrale ipossica. Anche in questo caso la morte cellulare non è attribuibile all'effetto citotossico delle nanoparticelle di ZnS, bensì alla mancanza di ossigeno e nutrienti all'interno dello sferoide.

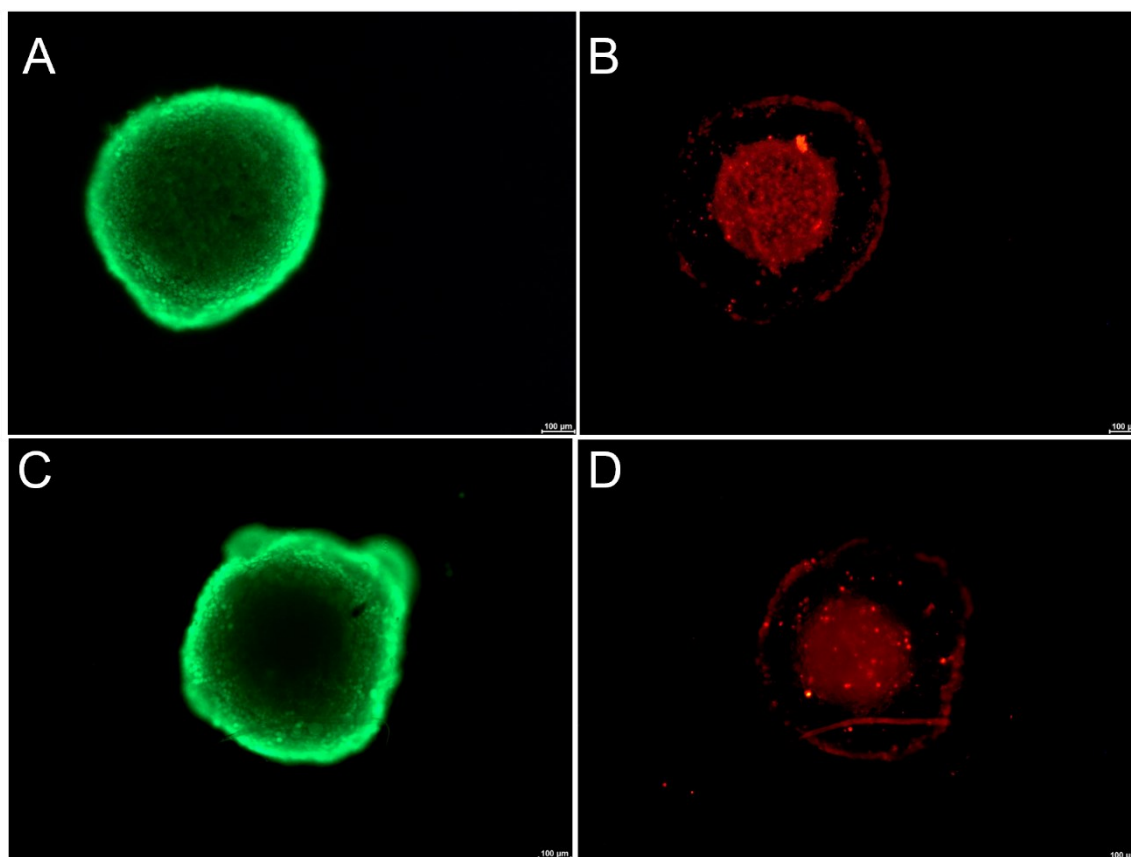


Figura 46: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza dello sferoide di controllo (A-B) e dello sferoide incubato con le nanoparticelle ZnS biogeniche alla concentrazione di 500 µg/ml (C-D)

Per verificare e confermare i risultati del saggio di citotossicità LIVE/DEAD sono stati allestiti dei campioni positivi trattando gli sferoidi con metanolo, una sostanza altamente tossica per le cellule. Analizzando le immagini di fluorescenza (Figura 47) si osserva la presenza di moltissime cellule morte (rosse), soprattutto nella parte esterna degli sferoidi. Questo dimostra il fatto che il metanolo ha reagito principalmente con le cellule più esterne, causandone la morte.

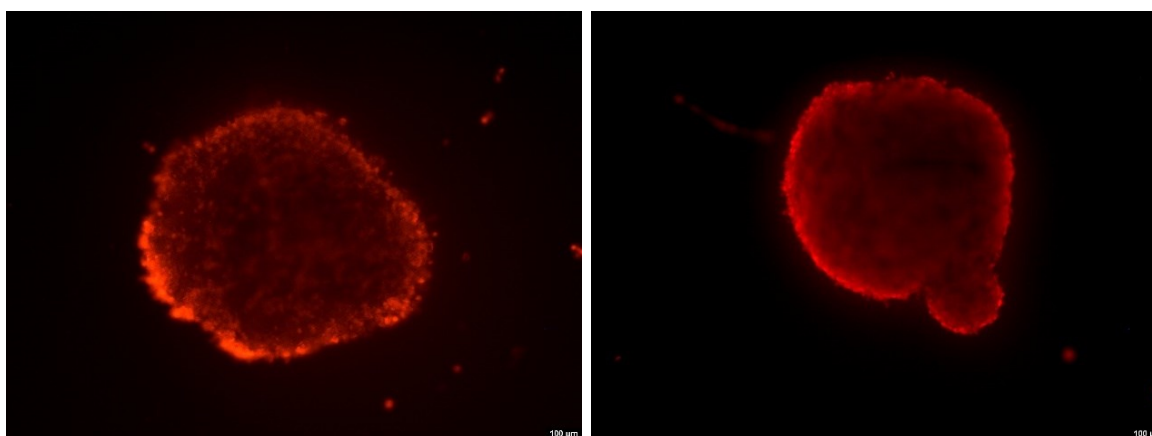


Figura 47: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza degli sferoidi di cellule HCT116 trattati con metanolo.

Questi risultati hanno confermato il lieve effetto citotossico del solfuro di zinco anche in modelli 3D. Va però precisata la necessità di effettuare ulteriori test di citotossicità in condizione di crescita 3D ottimizzati con l'utilizzo di supporti che prevedono matrici artificiali ottimizzate per creare un microambiente 3D in cui non sia presente la zona ipossica centrale. Questi test andrebbero svolti alle stesse condizioni per ottenere dei replicati sperimentali e con tempi di incubazione > 24h per valutare la citotossicità delle nanoparticelle di ZnS a lungo termine.

Capitolo 6

6. Parte sperimentale

6.1. Reagenti

I reagenti impiegati per le sintesi delle nanoparticelle sono elencati nella tabella seguente.

(Tabella 8)

Nome	Formula	Massa molecolare (g/mol)	CAS	Fornitore
Acetato di zinco diidrato	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	219,51	5970-45-6	Merck
Idrossido di sodio	NaOH	40	1310-73-2	VWR
Zinco acetilacetato	$\text{Zn}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_2$	263,61	102503-47-5	Sigma-Aldrich
Acido ossalico diidrato	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_6$	126,07	6153-56-6	Carlo Erba
Idrossido di tetraetilammonio (20% p/p)	$(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}(\text{OH})$	147,26	77-98-5	Aldrich
Solfuro di sodio nonaidrato	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	240,18	1313-84-4	Sigma-Aldrich

Tabella 8: Reagenti impiegati nelle sintesi delle nanoparticelle

La biomassa della microalga *Nannochloropsis gaditana* è stata fornita dal Prof. Tomas Morosinotto (Dipartimento di Biologia, Università di Padova) e le cellule HTC-116 dalla Prof.ssa Maddalena Mognato (Dipartimento di Biologia, Università di Padova).

6.2. Sintesi ZnO

6.2.1 Sintesi in bagno termico e a riflusso

Per le sintesi in bagno termico e a riflusso i campioni sono stati sintetizzati a partire da una soluzione di zinco acetato diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ad una concentrazione di 0,2 M e una soluzione di NaOH concentrata 1 M. In un matraccio da 100 ml sono stati disciolti 4,39 g (0,02 mol) di zinco acetato in acqua deionizzata e in un becher di plastica è stata preparata la soluzione di NaOH (1M). La soluzione di zinco acetato è stata poi trasferita in una beuta o in un pallone da 250 ml ed è stata scaldata alla temperatura desiderata in bagno termico o a

riflusso. Raggiunta la temperatura impostata sono stati aggiunti goccia a goccia 20 ml o 10 ml di soluzione di NaOH, per ottenere rispettivamente rapporti molari di $\text{Zn}^{2+}/\text{NaOH}$ 1:1 o 1:0,5. La miscela risultante è stata mantenuta in costante agitazione per 3 ore in bagno termico per le sintesi svolte a 40/60/80 °C e 3 ore a riflusso per le sintesi svolte a 100 °C. Poi la soluzione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e il prodotto è stato isolato mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). I precipitati ottenuti sono stati purificati due volte mediante lavaggi con acqua deionizzata e isolati nuovamente mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). Infine, il prodotto è stato seccato a vuoto o in forno a 80 °C per una notte e macinato in un mortaio per ottenere una polvere bianca.

6.2.2 Sintesi idrotermale

Per le sintesi idrotermali sono stati disciolti in un matraccio da 10 ml 2 g (0,01 mol) di zinco acetato diidrato in acqua deionizzata, mentre in un becher di plastica è stata preparata una soluzione di NaOH (10 M). La soluzione di zinco acetato è stata poi trasferita all'interno di un contenitore in PTFE A255AC (detto liner) e sotto agitazione sono stati aggiunti goccia a goccia 1 ml o 0,5 ml della soluzione di NaOH preparata precedentemente (rispettivamente rapporti molari di $\text{Zn}^{2+}/\text{NaOH}$ 1:1 o 1:0,5). Il liner è stato posto all'interno di un'autoclave in acciaio inossidabile (*4745 General Purpose Acid-Digestion Bomb, Parr Instrument Company*) che viene poi riscaldato a 135 °C per 24 ore in forno. Il prodotto è stato lasciato raffreddare a temperatura ambiente e isolato mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). Le polveri ottenute sono state lavate due volte con acqua deionizzata e isolate mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). Si è quindi asciugato il prodotto in forno a 80 °C per una notte e lo si è macinato.

Per quanto riguarda il protocollo Diodati [84] si è preparata all'interno del liner una sospensione di ossalato di zinco (10 ml) a partire da una miscela acquosa di acetilacetato di zinco (0,1 M) e acido ossalico diidrato (0,1 M), in rapporto molare 1:1. A questa sospensione, mantenuta in costante agitazione, sono stati aggiunti 0,2 ml di idrossido di tetraetilammonio al 20% p/p come agente peptizzante e, goccia a goccia una soluzione di idrossido di sodio (10 M) per portare il pH della soluzione a 12. La soluzione risultante è stata poi sigillata, posta all'interno dell'autoclave in acciaio ed è stata riscaldata a 135 °C per 24 ore in forno. Come nelle sintesi precedenti si è lasciata raffreddare la soluzione a temperatura ambiente, si isola il prodotto mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti) e si effettuano i due lavaggi con acqua deionizzata. Infine, il prodotto è stato seccato in forno a 80 °C per una notte e macinato nel mortaio fino ad ottenere una fine polvere bianca.

6.2.3 Sintesi biogenica

Per questo tipo di sintesi si è preparato un estratto di microalghe mediante riscaldamento della biomassa di *Nannochloropsis gaditana* (73 g/L) a 100°C per 20 minuti sotto agitazione, e successiva filtrazione su carta da filtro *Macherey-Nagel* con pori da 16 µm. La sintesi biogenica è stata svolta a riflusso a 100°C e per via idrotermale a 135°C. Nel primo caso, in un matraccio da 100 ml sono stati disciolti 4,39 g (0,02 mol) di zinco acetato in acqua deionizzata. Questa soluzione è stata poi trasferita in un pallone da 250 ml a cui sono stati aggiunti 13 ml di estratto, corrispondenti a circa 1 g di microalga. La miscela risultante è stata riscaldata e mantenuta a 100 °C per 3 ore sotto costante agitazione. Nella sintesi svolta per via idrotermale è stato necessario ridurre i volumi per poter caricare la soluzione in un'autoclave da 100 ml. Sono stati disciolti in un matraccio da 50 ml 4,39 g (0,02 mol) di zinco acetato diidrato in acqua deionizzata, a cui è stato aggiunto l'estratto di microalghe (13 ml) diluito in acqua deionizzata per arrivare ad un volume finale di 100 ml. La soluzione risultante è stata poi sigillata, posta all'interno dell'autoclave in acciaio e riscaldata a 135 °C per 24 ore in forno. Il precipitato verde ottenuto da entrambe le reazioni è stato isolato mediante tre cicli di centrifugazione (12000 rpm per 5 min) e purificato effettuando due lavaggi con acetone, centrifugando ad ogni passaggio a 12000 rpm per 5 min. Il prodotto solido è stato essiccato per una notte in forno a 80° e macinato nel mortaio.

6.3. Sintesi ZnS

6.3.1 Sintesi in bagno termico e a riflusso

Per le sintesi in bagno termico e a riflusso i campioni sono stati sintetizzati a partire da una soluzione di zinco acetato diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e una soluzione di solfuro di sodio nonaidrato ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), entrambe ad una concentrazione pari a 0,2 M. Si sono disciolti in acqua deionizzata 2,195 g (0,01 mol) di zinco acetato in un matraccio da 50 ml e 4,804 g (0,02 mol) di sodio solfuro nonaidrato in un matraccio da 100 ml (rapporti molari Zn:S 1:2). Per le sintesi con rapporti molari Zn:S 1:1 sono stati disciolti in acqua deionizzata 2,402 g (0,01 mol) di sodio solfuro nonaidrato in un matraccio da 50 ml. Le due soluzioni contenenti le molecole precursori sono state unite in una beuta o in un pallone da 250 ml. La risultante sospensione è stata scaldata alla temperatura desiderata e lasciata in costante agitazione per 3 ore in bagno termico per le sintesi svolte a 40/60/80°C e 3 ore a riflusso per le sintesi svolte a 100 °C. Poi si è lasciata raffreddare la soluzione a temperatura ambiente e si è isolato il prodotto mediante

centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). I precipitati ottenuti sono stati lavati due volte con acqua deionizzata e isolati nuovamente mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). Infine, il prodotto è stato seccato in forno a 80 °C per una notte e macinato in un mortaio per ottenere una polvere bianca.

6.3.2 Sintesi idrotermale

Si sono pesati 0,219 g (1 mmol) di zinco acetato, poi disciolti in 10 ml di acqua deionizzata e trasferiti all'interno di un contenitore in PTFE A255AC (liner). A questa soluzione sono stati aggiunti 0,4804 g (2 mmol) di sodio solfuro nonaidrato (rapporti molari Zn:S 1:2), lasciando agitare per 10 minuti. Per le sintesi con rapporti molari Zn:S 1:1 sono stati aggiunti alla soluzione 0,2402 g (1 mmol) di sodio solfuro nonaidrato. La sospensione è stata sigillata all'interno del contenitore poi posto all'interno di un'autoclave in acciaio (*4745 General Purpose Acid-Digestion Bomb, Parr Instrument Company*), che è stata riscaldata a 135 °C per 24 ore in forno. Il prodotto è stato lasciato raffreddare a temperatura ambiente e isolato mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). Le polveri ottenute sono state quindi lavate due volte con acqua deionizzata, isolando il prodotto sempre per centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). Si è quindi seccato il prodotto in forno a 80 °C per una notte e lo si è macinato.

6.3.3 Sintesi biogenica

Si è preparato l'estratto di microalghe come già visto precedentemente, ossia mediante riscaldamento della biomassa di *Nannochloropsis gaditana* (73 g/L) a 100 °C sotto agitazione e successiva filtrazione su carta da filtro *Macherey-Nagel* con pori da 16 µm. La sintesi biogenica è stata svolta a riflusso a 100°C e per via idrotermale a 135°C. Nel primo caso, in un matraccio da 100 ml sono stati disciolti 2,195 g (0,01 mol) di zinco acetato in acqua deionizzata. Questa soluzione è stata poi trasferita in un pallone da 250 ml a cui sono stati aggiunti 13 ml di estratto (corrispondenti a circa 1 g di microalga) e 4,804 g (0,02 mol) di sodio solfuro nonaidrato (rapporti molari Zn:S 1:2). La miscela risultante è stata riscaldata e mantenuta a 100 °C per 3 ore sotto costante agitazione. Nella sintesi svolta per via idrotermale è stato necessario ridurre i volumi per poter caricare la soluzione in un'autoclave da 100 ml. Sono stati disciolti in un matraccio da 50 ml 2,195 g (0,01 mol) di zinco acetato diidrato in acqua deionizzata, a cui sono stati aggiunti 4,804 g (0,02 mol) di sodio solfuro nonaidrato e l'estratto di microalghe (13 ml) diluito in acqua deionizzata per arrivare ad un volume finale di 100 ml. La soluzione risultante è stata poi sigillata, posta all'interno dell'autoclave in acciaio e riscaldata a 135 °C

per 24 ore in forno. Il precipitato verde ottenuto da entrambe le reazioni è stato isolato mediante tre cicli di centrifugazione (12000 rpm per 5 min) e purificato effettuando due lavaggi con acqua deionizzata, centrifugando ad ogni passaggio a 12000 rpm per 5 min. Il prodotto solido è stato essiccato per una notte in forno a 80° e macinato nel mortaio.

6.4. Funzionalizzazione NPs

Sono stati testati diversi protocolli di funzionalizzazione delle nanoparticelle di ossido di zinco, attuando sia strategie di post-funzionalizzazione che di funzionalizzazione diretta (vedi tabella). Nel primo caso il PEG è stato aggiunto alle nanoparticelle già sintetizzate (risospese in sospensione) mentre nel secondo caso il PEG è stato inserito direttamente nel liner con le soluzioni contenenti i precursori. In questo modo si può ottenere una funzionalizzazione “diretta”, ossia contemporanea alla sintesi idrotermale delle nanoparticelle.

Post-funzionalizzazione

Nei protocolli di post-funzionalizzazione una piccola quantità di ossido di zinco (0,2 g) è stata sospesa in acqua deionizzata. Si è preparata poi una soluzione di PEG, la quale è stata unita alla soluzione di ZnO e lasciata agitare per 24 o 48 ore a seconda del protocollo di riferimento. Come si osserva nella tabella 9 sono state testate catene polimeriche a diverso peso molecolare (PEG-1000, PEG-200 e PEG-8000). Al termine della reazione sono state svolte delle prove di sospensione dei prodotti ottenuti a diverse concentrazioni in acqua e siero al 3%. (tabella 9)

Nome campione	Rapporto molare tra ZnO e PEG (mol/mol)	Concentrazione ZnO (mg/mL)	Stabilità in acqua e siero al 3%	Protocollo di riferimento
MCX01+PEG1000	1:0,5	0,4	precipitato	[145]
MCX01+PEG1000	1:0,5	1	precipitato	[145]
MCX01+PEG200	1:1,5	0,2	precipitato	[146]
MCX01+PEG200	1:1,5	0,4	precipitato	[146]
MCX01+PEG200	1:1,5	1	precipitato	[146]
MCX02+PEG8000	1:0,0005	0,2	precipitato	[19]
MCX02+PEG8000	1:0,0005	0,4	precipitato	[19]
MCX02+PEG8000	1:0,0005	1	precipitato	[19]

Tabella 9: Risultati di stabilità delle NPs di ZnO funzionalizzate con PEG a diverso peso molecolare

Per favorire la funzionalizzazione si è aumentato il rapporto molare tra PEG e ZnO, per avere

un eccesso di PEG, e la miscela risultante è stata posta a riflusso a 100°C per 8 ore. In questo caso è stato scelto il PEG-1000 e i seguenti rapporti molari ZnO:PEG; 1:10 e 1:20. I prodotti sono stati poi purificati mediante dialisi in acqua (*Sigma Aldrich D9777-100FT Dialysis Tubing Cellulose Membrane*). La sospensione ottenuta è stata introdotta in un sacchetto da dialisi con pori da 12 kDa, il quale è stato poi immerso in un becher contenente acqua deionizzata. In questo modo il PEG che non si è legato alle nanoparticelle è uscito dai pori mentre le nanoparticelle sono state trattenute all'interno del sacchetto.

Funzionalizzazione diretta

Per effettuare la funzionalizzazione diretta sono state preparate delle soluzioni di zinco acetato diidrato, alle quali è stato aggiunto un certo quantitativo di PEG (ai rispettivi rapporti molari indicati in tabella 10) e NaOH all'interno di un contenitore in PTFE A255AC (liner). La miscela è stata poi posta all'interno di un'autoclave in acciaio (4745 General Purpose Acid-Digestion Bomb, Parr Instrument Company), che è stata riscaldata a 135 °C per 24 ore in forno. Al termine della reazione sono state svolte delle prove di sospensione dei prodotti ottenuti in acqua e siero al 3% v/v. (tabella 10)

Nome campione	P.M. PEG	Rapporto molare tra ZnO e PEG (mol/mol)	Stabilità in acqua e siero al 3%	Protocollo di riferimento
MCXB9	400	1:10	precipitato	[147]
MCXB10	400	1:20	precipitato	[147]
MCXB11	1000	1:10	precipitato	[145]
MCXB12	10000	1:1,5	precipitato	[148]

Tabella 10: Risultati di stabilità delle NPs di ZnO funzionalizzate con PEG a diverso peso molecolare durante la sintesi

6.5. Saggi di citotossicità

6.5.1 Saggi MTS

La citotossicità delle nanoparticelle di ZnS è stata valutata su cellule HCT116, ossia una linea di cellule umane del cancro al colon. Il saggio MTS viene svolto in tre giorni. Il primo giorno si seminano in piastre da 96 pozzetti 5000 cellule a pozzetto in un volume di 200 µl di terreno RPMI con 10% siero (FBS) e 1% di antibiotico (penicillina/streptomicina). La piastra viene poi lasciata in incubatore a 37°C per 24 ore per far aderire le cellule. Il secondo giorno viene rimosso il terreno e le cellule vengono incubate con le sospensioni delle nanoparticelle

sintetizzate. Le nanoparticelle in sospensione sono state purificate con un filtro per siringa da 0,22 micrometri sterile (Merck Millex™-GS) e sono state preparate cinque diverse sospensioni a concentrazione crescente di ZnS in terreno RPMI 3% di siero fetale bovino (FBS). Per ogni concentrazione scelta di ZnS è stato prelevato un certo volume di sospensione madre contenente le nanoparticelle di ZnS alla concentrazione di 7 mg/mL (ZnS idrotermale) o 3 mg/mL (ZnS biogenico), calcolato con la seguente formula:

$$V_p = \frac{C_f \cdot V_f}{C_i}$$

dove V_p è il volume da prelevare, C_f la concentrazione finale (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml), V_f il volume finale, ossia il volume necessario per riempire i pozzetti della stessa riga e C_i la concentrazione della sospensione madre.

La piastra è stata allestita come segue: (Figura 48)

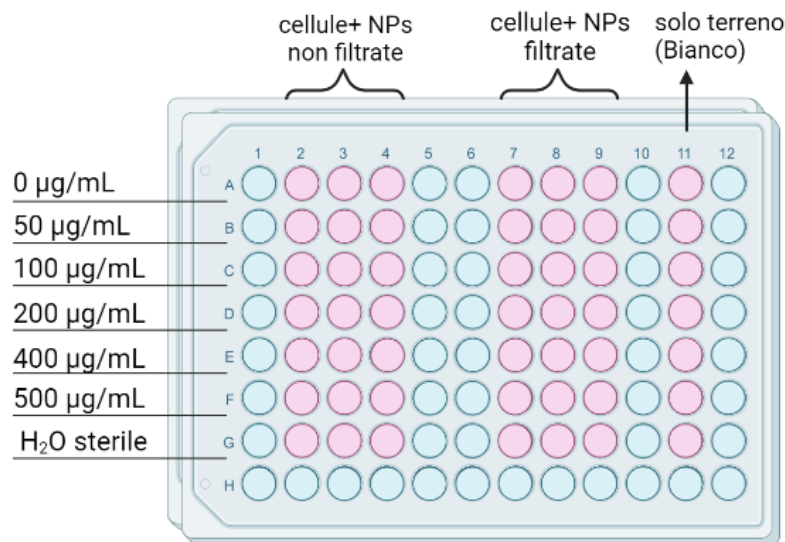


Figura 48: Schema di allestimento della piastra da 96 pozzetti per il saggio MTS

Il terzo giorno si elimina il terreno di coltura dai pozzetti e si aggiungono 100 µl di terreno RPMI senza siero. Al buio vengono aggiunti in ogni pozzetto 20 µl di MTS (5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazoli)-3-(4-solfofenil) tetrazolio). La piastra viene incubata a 37°C per circa un'ora per far avvenire la reazione di riduzione del sale di tetrazolio (MTS) in formazano. Quando si osserva un netto cambiamento di colore nei pozzetti contenenti le cellule si va a leggere l'assorbanza del formazano a 492 nm con un lettore per micropiastre (Spectramax 190, Molecular Device®).

6.5.2 Saggio clonogenico

Per effettuare il saggio clonogenico, dopo opportune diluizioni seriali, circa 200 cellule

HCT116 sono state seminate in ogni capsula di petri da 5 mL (21 totali), in terreno RPMI con 10% siero (FBS). Le 21 capsule contenenti le cellule sono state poste in incubatore a 37°C per 3 giorni per far aderire le cellule. Successivamente, in 18 capsule il terreno è stato rimosso e le cellule sono state incubate per 24 ore con 3 diverse dosi di nanoparticelle di ZnS in 5 mL di terreno RPMI al 3% FBS. In particolare, sono state testate in triplicato le seguenti concentrazioni di NPs sintetizzate per via idrotermale e per via biogenica; 50 µg/mL, 200 µg/mL e 500 µg/mL. Al termine del trattamento è stato rimosso il terreno contenente le nanoparticelle e sono stati aggiunti in ogni capsula 5 mL di terreno RPMI al 10 % siero (FBS). Le tre capsule rimanenti non sono state trattate con le NPs e rappresentano i controlli positivi. Per permettere la formazione dei cloni tutte le capsule sono state lasciate in incubatore a 37°C per 4 giorni. I cloni macroscopicamente visibili sono stati trattati per 15 minuti con il colorante violetto di genziana al 2% (1 mL per capsula) e poi lavati con acqua per effettuarne il conteggio. L'efficienza di clonaggio e la sopravvivenza cellulare sono state calcolate con le seguenti formule:

$$\text{Efficienza di clonaggio (\%)} = \frac{\text{media dei cloni delle 3 repliche}}{200} \times 100$$

$$\text{Sopravvivenza cellulare (\%)} = \frac{\text{Efficienza di clonaggio con NPs}}{\text{Efficienza di clonaggio ctr}} \times 100$$

6.5.3 Saggio LIVE/DEAD

Il saggio LIVE/DEAD è stato effettuato su modelli 3D di cellule HCT116 utilizzando il kit *LIVE/DEAD ® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells** (Invitrogen™). Le cellule HCT116 sono state poste in una particolare piastra da 96 pozzetti con fondo a U (*PrimeSurface 96U plate 3-D cell culture plate MS-9096UZ*, Sbio™) in terreno RPMI con 10% siero (FBS) e 1% di antibiotico (penicillina/streptomina). La piastra viene poi lasciata in incubatore a 37°C per 7 giorni. Gli sferoidi ottenuti sono stati incubati con la sospensione più concentrata (500 µg/ml) delle nanoparticelle di ZnS in terreno RPMI 3% FBS, precedentemente purificate con un filtro per siringa da 0,22 micrometri sterile (Merck Millex™-GS). Il giorno seguente è stato rimosso il terreno dai pozzetti, gli sferoidi sono stati lavati con PBS 1X e sono stati aggiunti 150 µl di soluzione contenente i due coloranti fluorescenti presenti nel kit (2 µM calceina AM e 4 µM EthD-1). Gli sferoidi vengono quindi incubati al buio per 45 minuti a temperatura ambiente e poi vengono osservati al microscopio a fluorescenza (Leica DMI4000 con obiettivo 5x).

Capitolo 7

7. Tecniche di caratterizzazione

7.1. Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Le nanoparticelle sintetizzate sono state caratterizzate attraverso spettroscopia infrarossa (FT-IR), la quale permette di ricavare informazioni sulla composizione chimica e in particolare sui legami chimici presenti. Questa tecnica si basa sull'interazione fra la radiazione infrarossa (IR) e la materia. Quando una molecola viene colpita da una radiazione IR, ad una determinata frequenza, l'energia ceduta dalla radiazione viene convertita in energia vibrazionale, comportando uno stiramento dei legami chimici (*stretching*) o una deformazione degli angoli di legame (*bending*). Questo avviene solo se la frequenza della radiazione ha un valore ben preciso che dipende dalle caratteristiche chimiche della molecola. I vari gruppi funzionali assorbono a frequenze ben precise, quindi saranno identificabili nello spettro di un composto incognito poiché saranno presenti i segnali relativi alle loro transizioni vibrazionali (*stretching* e *bending*) ad una determinata frequenza.

In questo lavoro di tesi sono stati effettuati esperimenti FTIR in modalità ATR, la quale prevede il passaggio della radiazione infrarossa attraverso un particolare cristallo, che permette all'onda elettromagnetica di essere riflessa al suo interno molte volte. Il campione viene pressato sulla superficie superiore del cristallo (solitamente di ZnSe, Ge o diamante), quindi la radiazione IR si riflette attraverso il cristallo e penetra all'interno del campione per qualche frazione di micron venendone in piccola parte assorbita (o attenuata). Dopo alcune riflessioni, l'attenuazione dell'intensità del raggio IR è sufficiente per essere rilevata dallo spettrofotometro, dando uno spettro FT-IR in riflettanza totale attenuata (ATR). [149]

Gli spettri sono stati acquisiti con lo strumento NEXUS 870 FT-IR (NICOLET; Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova) dotato di accessorio ATR con cristallo in diamante, operante nell'intervallo $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ raccogliendo 32 scansioni per campione con risoluzione di 4 cm^{-1} .

7.2. Diffrazione di raggi X (XRD)

Le analisi XRD consentono di determinare, in modo non distruttivo, la struttura cristallina delle nanostrutture sfruttando la diffrazione dei raggi X. Inoltre, permettono di valutare la purezza e la dimensione media dei cristalliti. L'analisi è stata effettuata facendo incidere sul campione un fascio collimato di raggi X, che viene diffratto dai piani atomici del cristallo; se i raggi diffusi sono in fase, questi interferiscono in modo costruttivo e si ottiene l'intensità massima a quella particolare angolazione. Questo avviene quando viene soddisfatta la seguente legge di Bragg;

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$$

dove d_{hkl} rappresenta la distanza tra piani reticolari paralleli (hkl), θ è l'angolo di incidenza della radiazione, n è l'ordine di diffrazione e λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente. (figura 49) [150] Le posizioni angolari dei riflessi nel diffrattogramma sono dunque inversamente correlate alle distanze tra i piani che li generano.

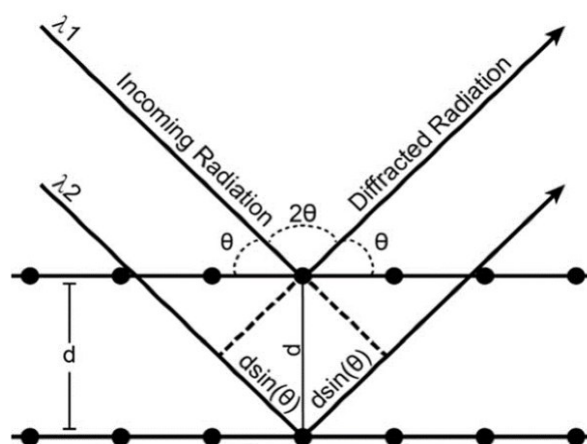


Figura 49: Illustrazione geometrica della legge di Bragg [151]

Dalle misure dell'ampiezza a mezza altezza (FWHM – *Full Width at Half Maximum*) dei riflessi è possibile ricavare la dimensione media dei cristalliti, mediante la formula di Scherrer:

$$D = k \frac{\lambda}{\beta \cos \theta}$$

dove D è la dimensione media dei cristalliti, K è una costante adimensionale correlata alla forma della cella cristallina (per cristalliti cubici $K = 0,94$), λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente, β è l'ampiezza a mezza altezza del riflesso e θ è l'angolo di incidenza della radiazione (angolo di Bragg). [150]

I campioni di ossido e solfuro di zinco sono stati analizzati con un diffrattometro Bruker D8 Advance (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova), utilizzando una sorgente di radiazione $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). L'accuratezza angolare dello strumento è $0,001^\circ$, mentre la risoluzione angolare è migliore di $0,01^\circ$. I diffrattogrammi sono stati acquisiti

nell'intervallo 20-80°. L'identificazione delle fasi cristalline è stata eseguita attraverso una procedura di *Search and Match* utilizzando il *software* Bruker Diffrac EVA.

7.3. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Per analizzare le dimensioni e la morfologia delle nanoparticelle è stato utilizzato il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) FEI Tecnai G², presso i Laboratori di Microscopia Elettronica (LME) del Dipartimento di Biologia (Università degli Studi di Padova). In questo microscopio si sfrutta un fascio di elettroni che subisce *scattering* in seguito al contatto con gli atomi del campione. L'onda trasmessa viene amplificata da un sistema di lenti e poi raggiunge il rivelatore, costituito in genere da un dispositivo ad accoppiamento di carica (CCD) o da un piatto fotografico. Ciò consente di ottenere immagini 2D ad elevata risoluzione, dove le aree più luminose corrispondono ad una maggiore trasmissione degli elettroni mentre quelle più scure, caratterizzate da uno *scattering* maggiore, sono dovute alla presenza di atomi pesanti o zone più spesse del campione. I campioni sono stati preparati depositando una goccia di sospensione contenente le nanoparticelle su un reticolo di rame rivestito di carbonio. Le immagini TEM sono state acquisite mediante le telecamere Olympus Veleta e TVIPS F114 del microscopio FEI Tecnai G2, operante a 100 kV.

Per l'analisi delle dimensioni delle nanoparticelle è stato utilizzato il programma ImageJ.

7.4. Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La morfologia tridimensionale di alcuni campioni di ZnS è stata determinata utilizzando la microscopia elettronica a scansione di emissione di campo (FE-SEM).

Il microscopio FE-SEM sfrutta un fascio di elettroni focalizzato che permette di effettuare una scansione superficiale del campione grazie alla rilevazione degli elettroni riemessi dalla superficie del nanomateriale. In particolare, si analizza la retrodiffusione di elettroni ad alta energia e di elettroni secondari, provenienti dagli strati più superficiali del campione. Le analisi SEM sono state ottenute utilizzando un microscopio Zeiss SUPRE 40VP, accoppiato con un rivelatore EDX (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova). Le immagini FE-SEM sono state ottenute utilizzando una tensione di accelerazione del fascio primario di 2,0-5,0 kV. I campioni sono stati preparati depositando una goccia di sospensione del campione in esame su un supporto in carbonio.

7.5. Diffusione dinamica della luce (DLS)

Il *Dynamic light scattering* (DLS) è una tecnica che permette di misurare il diametro idrodinamico delle nanoparticelle in sospensione. La sospensione viene illuminata con un laser e si vanno a misurare le variazioni di intensità di scattering dovute al movimento browniano delle particelle, in funzione del tempo. Per calcolare il diametro idrodinamico delle nanoparticelle si utilizza l'equazione di Stokes-Einstein riportata in seguito, la quale mette in relazione la dimensione delle nanoparticelle con la velocità del moto browniano, definito dal coefficiente di diffusione traslazionale (D).

$$D = \frac{TK_b}{6 \pi \eta R_h}$$

K_b è la costante di Boltzmann, T è la temperatura assoluta sperimentale, η è la viscosità del mezzo e R_h è il raggio idrodinamico delle particelle in sospensione. [152]

A parità di temperatura e di viscosità, più piccola è la particella più il suo coefficiente di diffusione è elevato e le variazioni dell'intensità di *scattering* sono più rapide, mentre le particelle più grandi inducono variazioni d'intensità più lente perché si muovono più lentamente. [153] Lo strumento utilizzato per le analisi DLS consente anche di prevedere la stabilità delle dispersioni attraverso la misura del potenziale zeta delle particelle. Un valore di potenziale zeta elevato (<-30 mV o >+30 mV) garantisce che le nanoparticelle rimangano lontane l'una dall'altra grazie a forze repulsive di tipo elettrostatico, impedendone l'aggregazione. [139]

Le nanoparticelle di ossido e solfuro di zinco sono state sospese in acqua e siero al 3% e le misure del potenziale Z sono state effettuate tramite lo strumento DLS Zetasizer Nano S Malvern (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova).

Analisi dei dati

I dati ottenuti con le diverse tecniche di caratterizzazione vengono analizzati ed elaborati utilizzando OriginPro 2019b.

Capitolo 8

8. Conclusioni

Questo lavoro di Tesi ha consentito di conseguire interessanti risultati sperimentali relativi alla sintesi di nanostrutture cristalline di ossido e solfuro di zinco, mediante diversi approcci sintetici. In particolare, l'attenzione è stata rivolta agli approcci di *wet chemistry*, ossia il metodo di precipitazione in acqua, la sintesi idrotermale e la sintesi biogenica. Questi metodi, basati sulla sintesi in soluzione acquosa, vengono considerati semplici, riproducibili e “verdi”. Nelle sintesi svolte a 40 °C e 60 °C non è stato ottenuto alcun prodotto cristallino mentre nelle sintesi svolte sopra gli 80 °C si è ottenuto ossido di zinco nella forma wurtzite e solfuro di zinco nella forma cristallina sfalerite. La temperatura di reazione è risultata quindi un fattore cruciale nella formazione dell'ossido e del solfuro di zinco. I campioni ottenuti sono stati caratterizzati con diverse tecniche di analisi: la diffrazione di raggi X, la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier, la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e a scansione (SEM). Gli spettri FTIR hanno confermato la presenza del legame Zn-O e del legame Zn-S, rispettivamente nelle nanoparticelle di ossido e solfuro di zinco. I diffrattogrammi derivanti dalle analisi XRD hanno permesso di attribuire ai campioni di ZnO la fase cristallina wurtzite, con gruppo spaziale P6₃mc, e ai campioni di ZnS la fase cristallina sfalerite con gruppo spaziale F4₃m. Inoltre, queste analisi hanno evidenziato un elevato grado di cristallinità e un'ottima purezza dei prodotti, ad eccezione del campione di ZnO biogenico che ha mostrato qualche piccola impurità.

Analizzando in dettaglio i diversi campioni di ZnO, si è osservato che la variazione del rapporto molare tra i precursori (Zn²⁺ e NaOH) non ha influenzato la resa della reazione e che all'aumentare della temperatura la dimensione media dei cristalliti è aumentata. Ciò indica che la cristallizzazione è favorita a temperature elevate. Dalle analisi TEM, le particelle di ZnO sintetizzate a 135 °C in bomba idrotermale risultano caratterizzate da una forma esagonale con dimensioni medie di circa 6 µm. Quelle sintetizzate con il protocollo di Diodati et al. mostrano invece una forma a stella con dimensioni inferiori, attorno ai 2 µm. Infine, la sintesi biogenica, svolta a 100 °C, ha portato alla formazione di nanoparticelle esagonali di ZnO con dimensioni medie di 2 µm. In questo caso la resa di reazione è risultata molto bassa, probabilmente perché l'idrossido di sodio ha un effetto maggiore come agente precipitante rispetto alle biomolecole presenti nell'estratto di microalghe. Quest'ultime potrebbero però garantire un blando effetto

stabilizzante. Le dimensioni micrometriche delle particelle di ZnO sintetizzate con entrambi gli approcci sintetici non hanno consentito di svolgere le successive analisi di citotossicità.

Per quanto riguarda il solfuro di zinco, le rese di reazione di quasi tutti i campioni sono risultate molto elevate. Va tuttavia precisato che sono state utilizzate entrambe le molecole precursori anche nella sintesi biogenica. Per entrambi i rapporti molari testati, all'aumentare della temperatura la dimensione media dei cristalliti è aumentata. Diminuendo invece il rapporto molare tra i precursori e mantenendo costante la temperatura, la dimensione dei cristalliti è diminuita. Le sintesi a 135 °C con e senza microalga hanno permesso di ottenere in entrambi i casi nanoparticelle con dimensione media di circa 20-25 nm, caratterizzate da una forma sferica, come confermato dalle analisi SEM e TEM. Le differenze riscontrate tra i due metodi sintetici sono minime; le biomolecole presenti nell'estratto di microalghe non hanno portato a variazioni significative delle dimensioni dei cristalliti e le immagini al TEM hanno mostrato l'elevata comparabilità morfologica e dimensionale tra i campioni MCS09 e MCS_Bio2. Tutte le nanoparticelle di ZnS ottenute sono risultate adatte per potenziali applicazioni nel *bioimaging*, poiché caratterizzate da dimensioni inferiori di 100 nm.

Per le applicazioni dei nanomateriali in biomedicina, oltre alle dimensioni va valutata la stabilità nei confronti dell'aggregazione e la biocompatibilità. Anche se ZnO e ZnS sono stati approvati per usi cosmetici dalla FDA, il profilo tossicologico dettagliato e il meccanismo di citotossicità per questi nanomateriali non sono ancora ben chiari. Per questo motivo, nella prospettiva di un'eventuale applicazione delle nanoparticelle sintetizzate nel campo del *bioimaging* ottico, sono state studiate:

- la stabilità delle sospensioni dei nanosistemi in ambiente acquoso al 3% siero (v/v);
- la citotossicità delle stesse in cellule umane coltivate in 2D e 3D.

I valori di potenziale zeta dei campioni di ossido e solfuro di zinco hanno dimostrato l'instabilità delle particelle in ambiente acquoso con siero al 3% (v/v). Tuttavia, per alcuni campioni di ZnS non essiccati si è raggiunta una buona stabilità colloidale, confermata dal valore di potenziale zeta di -30 mV. Tale evidenza sperimentale è stata attribuita alla stabilizzazione di natura unicamente elettrostatica delle nanoparticelle.

I protocolli di funzionalizzazione con PEG, effettuati per cercare di stabilizzare le nanoparticelle di ossido di zinco in soluzione acquosa, non hanno portato a risultati promettenti in quanto il PEG non si è legato alla superficie delle nanostrutture.

La citotossicità delle nanoparticelle di ZnS è stata analizzata in cellule HCT116, mediante il saggio MTS e il saggio clonogenico nelle colture in 2D e il saggio LIVE/DEAD in modelli 3D. I risultati derivanti dai saggi MTS hanno mostrato una leggera diminuzione della vitalità

cellulare all'aumentare della concentrazione delle nanoparticelle di solfuro di zinco puro. Nonostante la possibile presenza di residui organici sulla superficie (dovuti alle microalghe), le nanoparticelle di ZnS sintetizzate per via biogenica hanno portato a risultati comparabili ai precedenti. Il saggio clonogenico ha mostrato che entrambi i tipi di nanoparticelle di ZnS non hanno influenzato la capacità proliferativa delle cellule HCT116. Tale risultato è inatteso dal momento che anche alla dose più alta di nanoparticelle non si è visto alcun effetto mentre nei saggi MTS si è osservato un 80% di vitalità. Probabilmente le sospensioni di NPs hanno subito una progressiva aggregazione nel tempo; pertanto, è necessario validare questi esperimenti preliminari con ulteriori saggi clonogenici condotti con formulazioni fresche di NPs.

Le immagini degli sferoidi ottenute al microscopio a fluorescenza confermano il lieve effetto citotossico del solfuro di zinco anche in modelli 3D. Gli sferoidi di controllo presentano la medesima morfologia e fluorescenza verde/rossa degli sferoidi incubati con le nanoparticelle. Tutti i saggi effettuati hanno mostrato come la vitalità cellulare non abbia subito significative diminuzioni dalla presenza delle nanoparticelle di solfuro di zinco puro.

8.1. Prospettive Future

Per un'eventuale applicazione delle nanostrutture sintetizzate in campo biomedico è necessario effettuare un appropriato drogaggio e una funzionalizzazione superficiale delle stesse, al fine di ottimizzarne la fluorescenza e garantirne una buona stabilità e dispersione in ambiente fisiologico. Inoltre, le condizioni di sintesi delle nanoparticelle di ZnO andrebbero ottimizzate per cercare di ridurre le dimensioni delle particelle. Per la funzionalizzazione si potrebbero sfruttare le poliossazoline, molecole già utilizzate dal gruppo di ricerca per stabilizzare sia l'ossido che il solfuro di zinco, mostrando eccellenti risultati. [108] [154]

Riguardo la sintesi biogenica si potrebbe estendere la ricerca a diverse specie di microalghe, ad esempio specie ricche di zolfo, al fine di ridurre il numero di reagenti chimici anche nelle sintesi di ZnS. Infine, per validare in modo completo l'effettiva applicazione in campo biomedico delle nanostrutture sintetizzate, è necessario un approfondimento della valutazione della citotossicità in altri tipi di cellule, anche non tumorali. Per evitare la formazione della zona ipossica nei modelli cellulari 3D si potrebbe usare un sistema di crescita diverso, il *VITVO 3D cell platform* (Rigenerand). Quest'ultimo è un bioreattore dotato di una speciale matrice che permette di creare un microambiente 3D favorendo la corretta inter-distanza e comunicazione cellula-cellula, la circolazione dei nutrienti e la simulazione del flusso interstiziale.

Bibliografia

1. Baig, N., Kammakam, I., Falath, W., e Kammakam, I. (2021) Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, **2** (6), 1821–1871.
2. Borsella, E. (2008) Nanoscienze e nanotecnologie. 120.
3. Schmid, G. (2006) Nanoparticles: From Theory to Application, 2nd, Completely Revised and Updated Edition. *Wiley VCH*.
4. The Royal Society, The Royal Academy of Engineering (Great Britain) (2004) Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. *The Royal Society*.
5. Alivisatos, A.P. (1996) Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science*, **271** (5251), 933–937.
6. Klingshirn, C.F. (2007) ZnO: Material, Physics and Applications. *ChemPhysChem*, **8** (6), 782–803.
7. Fang, X., Zhai, T., Gautam, U.K., Li, L., Wu, L., Bando, Y., e Golberg, D. (2011) ZnS nanostructures: From synthesis to applications. *Progress in Materials Science*, **56** (2), 175–287.
8. Azpiroz, J.M., Mosconi, E., e Angelis, F.D. (2011) Modeling ZnS and ZnO nanostructures: Structural, electronic, and optical properties. *Journal of Physical Chemistry C*, **115** (51), 25219–25226.
9. He, W., Jia, H., Cai, J., Han, X., Zheng, Z., Wamer, W.G., e Yin, J.-J. (2016) Production of Reactive Oxygen Species and Electrons from Photoexcited ZnO and ZnS Nanoparticles: A Comparative Study for Unraveling their Distinct Photocatalytic Activities. *J. Phys. Chem. C*, **120** (6), 3187–3195.
10. Selvan, S.T., Yang Tan, T.T., Kee Yi, D., e Jana, N.R. (2010) Functional and multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing. *Langmuir*, **26** (14), 11631–11641.
11. Bretos, I., Diodati, S., Jiménez, R., Tajoli, F., Ricote, J., Bragaggia, G., Franca, M., Calzada, M.L., e Gross, S. (2020) Low-Temperature Solution Crystallization of Nanostructured Oxides and Thin Films. *Chemistry – A European Journal*, **26** (42), 9157–9179.
12. Della Gaspera, E. (2021) Special Issue “Wet Chemical Synthesis of Functional Nanomaterials”. *Nanomaterials*, **11** (4), 1044.
13. Gorai, S. (2019) A review on biogenic synthesis of ZnS nanoparticles and potential applications. *J. Indian Chem. Soc.*, **97**, 2972–2980.
14. Taghizadeh, S.M., Morowvat, M.H., Negahdaripour, M., Ebrahiminezhad, A., e Ghasemi, Y. (2021) Biosynthesis of Metals and Metal Oxide Nanoparticles Through Microalgal Nanobiotechnology: Quality Control Aspects. *BioNanoScience*, **11** (1), 209–226.
15. Iravani, S. (2011) Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, **13** (10), 2638–2650.
16. Naveed Ul Haq, A., Nadhman, A., Ullah, I., Mustafa, G., Yasinzai, M., e Khan, I. (2017) Synthesis Approaches of Zinc Oxide Nanoparticles: The Dilemma of Ecotoxicity. *Journal of Nanomaterials*, **2017**.
17. Kaur, I., Ellis, L.-J., Romer, I., Tantra, R., Carriere, M., Allard, S., Mayne-L’Hermite, M., Minelli, C., Unger, W., Potthoff, A., Rades, S., e Valsami-Jones, E. (2017) Dispersion of Nanomaterials in Aqueous Media: Towards Protocol Optimization. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (130), 23.
18. https://www.hielscher.com/it/nano_01.htm.
19. Martinez, C.R., Joshi, P., Vera, J.L., Ramirez-Vick, J.E., e Singh, S.P. (2011) Cytotoxic studies of PEG functionalized ZnO Nanoparticles on MCF-7 cancer cells. *TechConnect Briefs*, **5**.
20. Deepa, N., Aanantharaj, K., Vimala Juliet, A., Sujith, R., e Sherine, J. (2021) Suitability of PEG capped carboxylic acid terminated fluorescent ZnS nanoparticles for NDV peptide binding. *Appl Nanosci*, **11** (8), 2337–2346.
21. Asadpour, S., Raeisi vanani, A., Kooravand, M., e Asfaram, A. (2022) A review on zinc oxide/poly(vinyl alcohol) nanocomposites: Synthesis, characterization and applications. *Journal of Cleaner Production*, **362**, 132297.

22. Agulto, V.C., Empizo, M.J.F., Kawano, K., Minami, Y., Yamanoi, K., Sarukura, N., Yago, A.C.C., e Sarmago, R.V. (2018) Two-step fabrication of ZnO-PVP composites with tunable visible emissions. *Optical Materials*, **76**, 317–322.
23. Baruah, S., e Dutta, J. (2009) Hydrothermal growth of ZnO nanostructures. *Science and Technology of Advanced Materials*, **10** (1).
24. Asadian, M. (2013) Thermodynamic Analysis of ZnO Crystal Growth from the Melt. *Journal of Crystallization Process and Technology*, **03**, 75–80.
25. Zare, M., Namratha, K., Ilyas, S., Sultana, A., Hezam, A., Sunil, L., Surmeneva, M.A., Surmenev, R.A., Nayan, M.B., Ramakrishna, S., Mathur, S., e Byrappa, K. (2022) Emerging Trends for ZnO Nanoparticles and Their Applications in Food Packaging. *ACS Food Science and Technology*, **2**, 763–781.
26. Zhang, Z.-Y., e Xiong, H.-M. (2015) Photoluminescent ZnO Nanoparticles and Their Biological Applications. *Materials*, **8** (6), 3101–3127.
27. Morkoç, H., e Özgür, Ü. (2009) Zinc Oxide: Fundamentals, Materials and Device Technology. *Wiley VCH*, 1–76.
28. Lin Wang, Z. (2004) Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *J. Phys.: Condens. Matter*, **16**, 829–858.
29. Samadi, M., Zirak, M., Naseri, A., Kheirabadi, M., Ebrahimi, M., e Moshfegh, A.Z. (2019) Design and tailoring of one-dimensional ZnO nanomaterials for photocatalytic degradation of organic dyes: a review. *Research on Chemical Intermediates*, **45** (4), 2197–2254.
30. Mohan, S., Vellakkat, M., Aravind, A., e Reka, U. (2020) Hydrothermal synthesis and characterization of Zinc Oxide nanoparticles of various shapes under different reaction conditions. *Nano Express*, **1** (3).
31. Zhang, Y., Leu, Y.-R., Aitken, R.J., e Riediker, M. (2015) Inventory of Engineered Nanoparticle-Containing Consumer Products Available in the Singapore Retail Market and Likelihood of Release into the Aquatic Environment. *Int J Environ Res Public Health*, **12** (8), 8717–8743.
32. Kołodziejczak-Radzimska, A., e Jesionowski, T. (2014) Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. *Materials (Basel)*, **7** (4), 2833–2881.
33. Hong, R.Y., Li, J.H., Chen, L.L., Liu, D.Q., Li, H.Z., Zheng, Y., e Ding, J. (2009) Synthesis, surface modification and photocatalytic property of ZnO nanoparticles. *Powder Technology*, **189** (3), 426–432.
34. Smijs, T.G., e Pavel, S. (2011) Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol Sci Appl*, **4**, 95–112.
35. Sharma, D.K., Shukla, S., Sharma, K.K., e Kumar, V. (2022) A review on ZnO: Fundamental properties and applications. *Materials Today: Proceedings*, **49**, 3028–3035.
36. Zhang, Y., Nayak, T.R., Hong, H., e Cai, W. (2013) Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials. *Curr Mol Med*, **13** (10), 1633–1645.
37. Sun, H., Du, W., Peng, Q., Lv, Z., Mao, H., e Kopittke, P.M. (2020) Development of ZnO Nanoparticles as an Efficient Zn Fertilizer: Using Synchrotron-Based Techniques and Laser Ablation to Examine Elemental Distribution in Wheat Grain. *J. Agric. Food Chem.*, **68** (18), 5068–5075.
38. Xiong, H.-M. (2013) ZnO Nanoparticles Applied to Bioimaging and Drug Delivery. *Advanced Materials*, **25** (37), 5329–5335.
39. Gil, H.M., Price, T.W., Chelani, K., Bouillard, J.-S.G., Calaminus, S.D.J., e Stasiuk, G.J. (2021) NIR-quantum dots in biomedical imaging and their future. *iScience*, **24** (3), 102189.
40. Yong, K.-T., Wang, Y., Roy, I., Rui, H., Swihart, M.T., Law, W.-C., Kwak, S.K., Ye, L., Liu, J., Mahajan, S.D., e Reynolds, J.L. (2012) Preparation of Quantum Dot/Drug Nanoparticle Formulations for Traceable Targeted Delivery and Therapy. *Theranostics*, **2** (7), 681–694.
41. Tang, X., Choo, E.S.G., Li, L., Ding, J., e Xue, J. (2009) One-Pot Synthesis of Water-Stable ZnO Nanoparticles via a Polyol Hydrolysis Route and Their Cell Labeling Applications. *Langmuir*, **25** (9), 5271–5275.
42. Zhang, L., Yin, L., Wang, C., lun, N., Qi, Y., e Xiang, D. (2010) Origin of Visible Photoluminescence of ZnO Quantum Dots: Defect-Dependent and Size-Dependent. *J. Phys. Chem. C*, **114** (21), 9651–9658.

43. Sharma, A., Singh, B.P., Dhar, S., Gondorf, A., e Spasova, M. (2012) Effect of surface groups on the luminescence property of ZnO nanoparticles synthesized by sol–gel route. *Surface Science*, **606** (3), L13–L17.
44. Xiong, H.-M. (2010) Photoluminescent ZnO nanoparticles modified by polymers. *J. Mater. Chem.*, **20** (21), 4251–4262.
45. Jiang, J., Pi, J., e Cai, J. (2018) The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorg Chem Appl*, **2018**, 18.
46. Xiong, H.-M., Xu, Y., Ren, Q.-G., e Xia, Y.-Y. (2008) Stable Aqueous ZnO@Polymer Core–Shell Nanoparticles with Tunable Photoluminescence and Their Application in Cell Imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (24), 7522–7523.
47. Tang, X., Choo, E.S.G., Li, L., Ding, J., e Xue, J. (2010) Synthesis of ZnO Nanoparticles with Tunable Emission Colors and Their Cell Labeling Applications. *Chem. Mater.*, **22** (11), 3383–3388.
48. Ma, Y.-Y., Ding, H., e Xiong, H.-M. (2015) Folic acid functionalized ZnO quantum dots for targeted cancer cell imaging. *Nanotechnology*, **26** (30), 305702.
49. Misra, K.P., e Misra, R.D.K. (2022) ZnO-Based Quantum Dots for Biosensing, Cancer Imaging and Therapy: An Overview. *Biomedical Materials & Devices*.
50. Wu, Y.L., Fu, S., Tok, A.I.Y., Zeng, X.T., Lim, C.S., Kwek, L.C., e Boey, F.C.Y. (2008) A dual-colored bio-marker made of doped ZnO nanocrystals. *Nanotechnology*, **19** (34), 10.
51. H. Müller, K., Kulkarni, J., Motskin, M., Goode, A., Winship, P., Skepper, J.N., Ryan, M.P., e Porter, A.E. (2010) pH-Dependent Toxicity of High Aspect Ratio ZnO Nanowires in Macrophages Due to Intracellular Dissolution. *ACS Nano*, **4** (11), 6767–6779.
52. A Rama Narsimha, R., e L, S. (2018) Evaluation of In Vitro Cytotoxicity of Zinc Oxide (Zno) Nanoparticles Using Human Cell Lines. *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, **4** (1).
53. Haynes, W.M. (2014) Handbook of Chemistry and Physics 95th Edition. *CRC Press*, 2705.
54. Yeh, C.Y., Lu, Z.W., Froyen, S., e Zunger, A. (1992) Zinc-blendewurtzite polytypism in semiconductors. *Physical Review B*, **46** (16), 13.
55. Vogt, P., e Esser, N. (2014) Surface and Interface Science. *Wiley VCH*, **3**, 101–176.
56. <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/z/zinc-sulfide.html>.
57. Kaur, N., Kaur, S., Singh, J., e Rawat, M. (2016) A Review on Zinc Sulphide Nanoparticles: From Synthesis, Properties to Applications. *J Bioelectron Nanotechnol*, **1** (1), 5.
58. Labiadh, H., Lahbib, K., Hidouri, S., Touil, S., e Chaabane, T.B. (2016) Insight of ZnS nanoparticles contribution in different biological uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **9** (8), 757–762.
59. Ajibade, P.A., Oluwalana, A.E., Sikakane, B.M., e Singh, M. (2020) Structural, photocatalytic and anticancer studies of hexadecylamine capped ZnS nanoparticles. *Chemical Physics Letters*, **755**, 7.
60. Caires, A.J., Mansur, A.A.P., Carvalho, I.C., Carvalho, S.M., e Mansur, H.S. (2020) Green synthesis of ZnS quantum dot/biopolymer photoluminescent nanoprobe for bioimaging brain cancer cells. *Materials Chemistry and Physics*, **244**, 122716.
61. Reber, J.F., e Meier, K. (1984) Photochemical production of hydrogen with zinc sulfide suspensions. *J. Phys. Chem.*, **88** (24), 5903–5913.
62. Pfaff, G. (2021) Zinc sulfide pigments. *Physical Sciences Reviews*, **6** (8), 369–373.
63. Wang, X., Shi, J., Feng, Z., Li, M., e Li, C. (2011) Visible emission characteristics from different defects of ZnS nanocrystals. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13** (10), 4715–4723.
64. Chen, H., Yuan, L., Song, W., Wu, Z., e Li, D. (2008) Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions. *Progress in Polymer Science*, **33** (11), 1059–1087.
65. Saavedra Rodriguez, G., Sanchez-Zeferino, R., Chapa, C., e Alvarez Ramos, M.E. (2021) Silica-Coated ZnS Quantum Dots for Multicolor Emission Tuning from Blue to White Light. *ACS Appl. Nano Mater.*, **4** (11), 12180–12187.
66. Luchini, A., e Vitiello, G. (2019) Understanding the Nano-bio Interfaces: Lipid-Coatings for Inorganic Nanoparticles as Promising Strategy for Biomedical Applications. *Front Chem*, **7**, 343.
67. Sajimol Augustine, M., Anas, A., Das, A.V., Sreekanth, S., e Jayalekshmi, S. (2015) Cytotoxicity and cellular uptake of ZnS:Mn nanocrystals biofunctionalized with chitosan and

- aminoacids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **136**, 327–333.
68. Bujňáková, Z., Dutková, E., Kello, M., Mojžiš, J., Baláž, M., Baláž, P., e Shpotyuk, O. (2017) Mechanochemistry of Chitosan-Coated Zinc Sulfide (ZnS) Nanocrystals for Bio-imaging Applications. *Nanoscale Research Letters*, **12** (1), 328.
 69. Hu, H., e Zhang, W. (2006) Synthesis and properties of transition metals and rare-earth metals doped ZnS nanoparticles. *Optical Materials*, **28** (5), 536–550.
 70. Birma, I., Mohammad, F., Yusof, N., Abdullah, J., Hussein, M., Alitheen, N., e Abu, N. (2016) Folic acid targeted Mn:ZnS quantum dots for theranostic applications of cancer cell imaging and therapy. *International Journal of Nanomedicine*, **11**.
 71. Ntziachristos, V., Bremer, C., e Weissleder, R. (2003) Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur Radiol*, **13** (1), 195–208.
 72. Tajoli, F., Dengo, N., Mognato, M., Dolcet, P., Lucchini, G., Faresin, A., Grunwaldt, J.-D., Huang, X., Badocco, D., Maggini, M., Kübel, C., Speghini, A., Carofiglio, T., e Gross, S. (2020) Microfluidic Crystallization of Surfactant-Free Doped Zinc Sulfide Nanoparticles for Optical Bioimaging Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **12** (39), 44074–44087.
 73. Mohammad, F., e Al-Lohedan, H.A. (2016) Toxicity assessment of engineered Mn–ZnS quantum dots in vitro. *J Mater Sci*, **51** (20), 9207–9216.
 74. Weilmann, J.N., Black, S.E., Chehata, V.J., Schmidt, M.P., Holt, K.L., Carl, L.M., Straka, C.J., Marsh, A.L., Patton, W.A., e Lappas, C.M. (2013) ZnS nanocrystal cytotoxicity is influenced by capping agent chemical structure and duration of time in suspension. *Journal of Applied Toxicology*, **33** (3), 227–237.
 75. Sarangi, B., Mishra, S.P., e Behera, N. (2022) Advances in green synthesis of ZnS nanoparticles: An overview. *Materials Science in Semiconductor Processing*, **147**, 106723.
 76. Nikam, A.V., Prasad, B.L.V., e Kulkarni, A.A. (2018) Wet chemical synthesis of metal oxide nanoparticles: a review. *CrystEngComm*, **20** (35), 5091–5107.
 77. Patil, N., Bhaskar, R., Vyavhare, V., Dhadge, R., Khaire, V., e Patil, Y. (2021) Overview on methods of synthesis of nanoparticles. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, **13**, 11–16.
 78. Mohammed, L., Gomaa, H.G., Ragab, D., e Zhu, J. (2017) Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, **30**, 1–14.
 79. LaMer, V.K., e Dinegar, R.H. (1950) Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.*, **72** (11), 4847–4854.
 80. Thanh, N.T.K., Maclean, N., e Mahiddine, S. (2014) Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem. Rev.*, **114** (15), 7610–7630.
 81. Walton, R.I. (2002) Subcritical solvothermal synthesis of condensed inorganic materials. *Chem. Soc. Rev.*, **31** (4), 230–238.
 82. Diodati, S., Pandolfo, L., Caneschi, A., Gialanella, S., e Gross, S. (2014) Green and low temperature synthesis of nanocrystalline transition metal ferrites by simple wet chemistry routes. *Nano Research*, **7** (7), 1027–1042.
 83. Einarsrud, M.A., e Grande, T. (2014) 1D oxide nanostructures from chemical solutions. *Chemical Society Reviews*, **43** (7), 2187–2199.
 84. Diodati, S., Hennemann, J., Fresno, F., Gialanella, S., Dolcet, P., Lavrenčič Štanger, U., Smarsly, B.M., e Gross, S. (2019) Easy and Green Route towards Nanostructured ZnO as an Active Sensing Material with Unexpected H₂S Dosimeter-Type Behaviour. *European Journal of Inorganic Chemistry*, (6), 837–846.
 85. Feng, S.-H., e Li, G.-H. (2017) Hydrothermal and Solvothermal Syntheses. *Modern Inorganic Synthetic Chemistry (Second Edition)*, 73–104.
 86. Rabenau, A. (1985) The Role of Hydrothermal Synthesis in Preparative Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 1026–1040.
 87. Byrappa, K., e Yoshimura, M. (2001) Handbook of hydrothermal technology: a technology for crystal growth and materials processing. *Noyes Publications*, 891.
 88. Chaudhary, R., Nawaz, K., Khan, A.K., Hano, C., Abbasi, B.H., e Anjum, S. (2020) An Overview of the Algae-Mediated Biosynthesis of Nanoparticles and Their Biomedical

- Applications. *Biomolecules*, **10** (11), 1498.
89. Li, X., Xu, H., Chen, Z.-S., e Chen, G. (2011) Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *Journal of Nanomaterials*, 270974.
 90. LewisOscar, F., Vismaya, S., Arunkumar, M., Thajuddin, N., Dhanasekaran, D., e Nithya, C. (2016) Algal Nanoparticles: Synthesis and Biotechnological Potentials. *IntechOpen*, 158–182.
 91. Dahoumane, S.A., Mechouet, M., Wijesekera, K., Filipe, C.D.M., Sicard, C., Bazylinski, D.A., e Jeffryes, C. (2017) Algae-mediated biosynthesis of inorganic nanomaterials as a promising route in nanobiotechnology-a review. *Green Chemistry*, **19** (3), 552–587.
 92. Khanna, P., Kaur, A., e Goyal, D. (2019) Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *Journal of Microbiological Methods*, **163**.
 93. Begum, N.A., Mondal, S., Basu, S., Laskar, R.A., e Mandal, D. (2009) Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **71** (1), 113–118.
 94. Ingle, A., Biswas, A., Vanlalveni, C., Lalfakzuala, R., Gupta, I., Ingle, P., Rokhum, S.L., e Rai, M. (2020) Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Their Role in the Management. *CRC Press*, 135–162.
 95. Azizi, S., Ahmad, M.B., Namvar, F., e Mohamad, R. (2014) Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using brown marine macroalga *Sargassum muticum* aqueous extract. *Materials Letters*, **116**, 275–277.
 96. Rajabi, H.R., Sajadiasl, F., Karimi, H., e Alvand, Z.M. (2020) Green synthesis of zinc sulfide nanophotocatalysts using aqueous extract of *Ficus Johannis* plant for efficient photodegradation of some pollutants. *Journal of Materials Research and Technology*, **9** (6), 15638–15647.
 97. Hibberd, D.J. (1981) Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **82** (2), 93–119.
 98. Lubián, M.L. (1982) *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Nannochloropsis Gaditana Sp. Nov., Una Nueva Eustigmatophyceae Marina*, **4**, 287–293.
 99. Cecchin, M., Berteotti, S., Paltrinieri, S., Vigliante, I., Iadarola, B., Giovannone, B., Maffei, M.E., Delledonne, M., e Ballottari, M. (2020) Improved lipid productivity in *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen-replete conditions by selection of pale green mutants. *Biotechnology for Biofuels*, **13** (1), 78.
 100. Lewinski, N., Colvin, V., e Drezek, R. (2008) Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small*, **4** (1), 26–49.
 101. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., e Lamperska, K. (2018) 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*, **14** (4), 910–919.
 102. Foglietta, F., Canaparo, R., Muccioli, G., Terreno, E., e Serpe, L. (2020) Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. *Life Sciences*, **254**, 117784.
 103. Tolosa, L., Donato, M.T., e Gómez-Lechón, M.J. (2015) General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay, in *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, vol. 1250, Springer New York, New York, NY, pp. 333–348.
 104. Aslantürk, Ö.S. (2018) In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *IntechOpen*, 18.
 105. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., e Sivas, H. (2017) Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables, in *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (a c. diKuete, V.), Academic Press, pp. 271–297.
 106. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L3224>.
 107. Franken, N., Rodermond, H., Stap, J., Haveman, J., e Bree, C. (2006) Clonogenic assay of cells. *Nature protocols*, **1**, 2315–9.
 108. De Fazio, A.F., Morgese, G., Mognato, M., Piotto, C., Pedron, D., Ischia, G., Causin, V., Rosenboom, J.-G., Benetti, E.M., e Gross, S. (2018) Robust and Biocompatible Functionalization of ZnS Nanoparticles by Catechol-Bearing Poly(2-methyl-2-oxazoline)s. *Langmuir*, **34** (38), 11534–11543.
 109. Brix, N., Samaga, D., Belka, C., Zitzelsberger, H., e Lauber, K. (2021) Analysis of clonogenic

- growth in vitro. *Nat Protoc*, **16** (11), 4963–4991.
110. Luo, M., Shen, C., Feltis, B.N., Martin, L.L., Hughes, A.E., Wright, P.F.A., e Turney, T.W. (2014) Reducing ZnO nanoparticle cytotoxicity by surface modification. *Nanoscale*, **6** (11), 5791–5798.
 111. Guerrini, L., Alvarez-Puebla, R., e Pazos-Perez, N. (2018) Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. *Materials*, **11** (7), 1154.
 112. Moezzi, A., Cortie, M., e McDonagh, A. (2011) Aqueous pathways for the formation of zinc oxide nanoparticles. *Dalton Trans.*, **40** (18), 4871–4878.
 113. Charlot, G. Qualitative Inorganic Analysis. John Wiley & Sons, Inc., New York. 1957.
 114. Bahnmann, D.W., Kormann, C., e Hoffmann, M.R. (1987) Preparation and characterization of quantum size zinc oxide: A detailed spectroscopic study. *Journal of Physical Chemistry*, **91** (14), 3789–3798.
 115. Osman, D., e Mustafa, M. (2015) Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles using Zinc Acetate Dihydrate and Sodium Hydroxide. *Journal of Nanoscience and Nanoengineering*, **1**, 248–251.
 116. Bharti, D.B., e Bharati, A.V. (2017) Synthesis of ZnO nanoparticles using a hydrothermal method and a study its optical activity. *Luminescence*, **32** (3), 317–320.
 117. Tinello Susanna, Optimisation of a green synthesis of zinc oxide nanoparticles exploiting an algal mediated biogenic approach, [tesi di laurea magistrale] Università degli studi di Padova, 2022.
 118. Nagaraju, G., Udayabhanu, Shivaraj, Prashanth, S.A., Shastri, M., Yathish, K.V., Anupama, C., e Rangappa, D. (2017) Electrochemical heavy metal detection, photocatalytic, photoluminescence, biodiesel production and antibacterial activities of Ag–ZnO nanomaterial. *Materials Research Bulletin*, **94**, 54–63.
 119. Kharisov, B.I., Kharissova, O.V., e Ortiz-Mendez, U. (a c. di) (2016) *CRC Concise Encyclopedia of Nanotechnology*, CRC Press, Boca Raton.
 120. Nune, S.K., Gunda, P., Thallapally, P.K., Lin, Y.-Y., Forrest, M.L., e Berkland, C.J. (2009) Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert opinion on drug delivery*, **6** (11), 1175.
 121. Siddiqi, K.S., e Husen, A. (2016) Fabrication of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Algae and their Toxic Effects. *Nanoscale Research Letters*, **11** (1).
 122. Wahab, R., Ansari, S.G., Kim, Y.S., Seo, H.K., Kim, G.S., Khang, G., e Shin, H.-S. (2007) Low temperature solution synthesis and characterization of ZnO nano-flowers. *Materials Research Bulletin*, **42** (9), 1640–1648.
 123. Bednář, J., Svoboda, L., Mančík, P., e Dvorský, R. (2019) Synthesis of ZnS nanoparticles of required size by precipitation in aerosol microdroplets. *Materials Science and Technology*, **35** (7), 775–781.
 124. Balakrishnan, A., Groeneveld, J.D., Pokhrel, S., e Mädler, L. (2021) Metal Sulfide Nanoparticles: Precursor Chemistry. *Chemistry – A European Journal*, **27** (21), 6390–6406.
 125. Dengo Nicola, Chimica di superficie del solfuro di zinco; un approccio combinato sperimentale e computazionale, [tesi di laurea magistrale] Università degli studi di Padova, 2015.
 126. Diodati, S., Dolcet, P., Casarin, M., e Gross, S. (2015) Pursuing the Crystallization of Mono- and Polymetallic Nanosized Crystalline Inorganic Compounds by Low-Temperature Wet-Chemistry and Colloidal Routes. *Chem. Rev.*, **115** (20), 11449–11502.
 127. Dolcet, P., Diodati, S., Casarin, M., e Gross, S. (2015) Very low temperature wet-chemistry colloidal routes for mono- and polymetallic nanosized crystalline inorganic compounds. *J Sol-Gel Sci Technol*, **73** (3), 591–604.
 128. Salavati-Niasari, M., Ranjbar, M., e Ghanbari, D. (2012) A rapid microwave route for the synthesis of ZnS nanoparticles. *JNS*, **1**, 231–235.
 129. Gilbert, B., Huang, F., Lin, Z., Goodell, C., Zhang, H., e Banfield, J.F. (2006) Surface Chemistry Controls Crystallinity of ZnS Nanoparticles. *Nano Lett.*, **6** (4), 605–610.
 130. Bai, H.-J., Zhang, Z.-M., e Gong, J. (2006) Biological Synthesis of Semiconductor Zinc Sulfide Nanoparticles by Immobilized Rhodospirillum rubrum. *Biotechnol Lett*, **28** (14), 1135–1139.
 131. Hudlikar, M., Joglekar, S., Dhaygude, M., e Kodam, K. (2012) Latex-mediated synthesis of ZnS nanoparticles: green synthesis approach. *J Nanopart Res*, **14** (5), 865.
 132. Mirzadeh, S., Darezereshki, E., Bakhtiari, F., Fazelipour, M.H., e Hosseini, M.R. (2013)

- Characterization of zinc sulfide (ZnS) nanoparticles Biosynthesized by *Fusarium oxysporum*. *Materials Science in Semiconductor Processing*, **16** (2), 374–378.
133. Alijani, H.Q., Pourseyedi, S., Torkzadeh Mahani, M., e Khatami, M. (2019) Green synthesis of zinc sulfide (ZnS) nanoparticles using *Stevia rebaudiana* Bertoni and evaluation of its cytotoxic properties. *Journal of Molecular Structure*, **1175**, 214–218.
 134. Munyai, S., Mahlaule-Glory, L.M., e Hintsho-Mbita, N.C. (2022) Green synthesis of Zinc sulphide (ZnS) nanostructures using *S. frutescences* plant extract for photocatalytic degradation of dyes and antibiotics. *Materials Research Express*, **9** (1).
 135. Degen, A., e Kosec, M. (2000) Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. *Journal of the European Ceramic Society*, **7**.
 136. Kittaka, S., e Morimoto, T. (1980) Isoelectric point of metal oxides and binary metal oxides having spinel structure. *Journal of Colloid and Interface Science*, **75** (2), 398–403.
 137. Teh, E.-J., Ishida, N., Skinner, W.M., Parsons, D., e Craig, V.S.J. (2019) Forces between zinc sulphide surfaces; amplification of the hydrophobic attraction by surface charge. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **21** (36), 20055–20064.
 138. Meißner, T., Oelschlägel, K., e Potthoff, A. (2014) Implications of the stability behavior of zinc oxide nanoparticles for toxicological studies. *Int Nano Lett*, **4** (3), 116.
 139. Gillot-Stokkink, A.J., e Cardozo, R.L. (1969) Zeta potential control applied to the treatment of radioactive effluent. *EUR 4401*, 54.
 140. Dengo, N., Vittadini, A., Natile, M.M., e Gross, S. (2020) In-Depth Study of ZnS Nanoparticle Surface Properties with a Combined Experimental and Theoretical Approach. *J. Phys. Chem. C*, **124** (14), 7777–7789.
 141. <https://webbook.nist.gov/cgi/formula?ID=B6009512&Mask=80>.
 142. Alzeeb, G., Arzur, D., Trichet, V., Talagas, M., Corcos, L., e Le Jossic-Corcos, C. (2022) Gastric cancer cell death analyzed by live cell imaging of spheroids. *Scientific Reports*, **12** (1).
 143. Conger, A.D., e Ziskin, M.C. (1983) Growth of Mammalian Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Research*, **43**, 5.
 144. Kempf, H., Bleicher, M., e Meyer-Hermann, M. (2010) Spatio-temporal cell dynamics in tumour spheroid irradiation. *Eur. Phys. J. D*, **60** (1), 177–193.
 145. Nabiyouni, G., Barati, A., e Saadat, M. Surface Adsorption of Polyethylene Glycol and Polyvinyl Alcohol with Variable Molecular Weights on Zinc Oxide Nanoparticles. **8** (1), 11.
 146. Pranjali, P., Meher, M.K., Raj, R., Prasad, N., Poluri, K.M., Kumar, D., e Guleria, A. (2019) Physicochemical and Antibacterial Properties of PEGylated Zinc Oxide Nanoparticles Dispersed in Peritoneal Dialysis Fluid. *ACS Omega*, **4** (21), 19255–19264.
 147. Li, Z., Xiong, Y., e Xie, Y. (2003) Selected-Control Synthesis of ZnO Nanowires and Nanorods via a PEG-Assisted Route. *Inorg. Chem.*, **42** (24), 8105–8109.
 148. Zeng, Y., Zhang, T., Wang, L., Wang, R., Fu, W., e Yang, H. (2009) Synthesis and Ethanol Sensing Properties of Self-Assembled Monocrystalline ZnO Nanorod Bundles by Poly(ethylene glycol)-Assisted Hydrothermal Process. *J. Phys. Chem. C*, **113** (9), 3442–3448.
 149. Gorassini, A. Spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata. **22**.
 150. Sharma, R., Bisen, D.P., Shukla, U., e Sharma, B.G. (2012) X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. *Recent Research in Science and Technology*, **3**.
 151. Stan, C.V., Beavers, C.M., Kunz, M., e Tamura, N. (2018) X-Ray Diffraction under Extreme Conditions at the Advanced Light Source. *Quantum Beam Science*, **2** (1), 4.
 152. M. Schulze, B., L. Watkins, D., Zhang, J., Ghiviriga, I., e K. Castellano, R. (2014) Estimating the shape and size of supramolecular assemblies by variable temperature diffusion ordered spectroscopy. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **12** (40), 7932–7936.
 153. Carvalho, P.M., Felício, M.R., Santos, N.C., Gonçalves, S., e Domingues, M.M. (2018) Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Frontiers in Chemistry*, **6**.
 154. Morgese, G., Causin, V., Maggini, M., Corrà, S., Gross, S., e Benetti, E.M. (2015) Ultrastable Suspensions of Polyoxazoline-Functionalized ZnO Single Nanocrystals. *Chem. Mater.*, **27** (8), 2957–2964.

Appendice

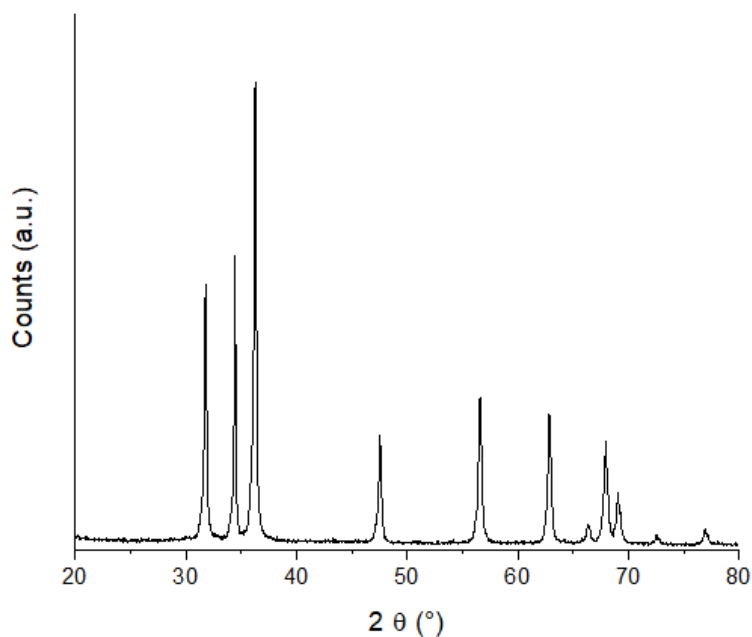


Figura 50 Diffrattogramma di ZnO NPs sintetizzate con il protocollo Diodati

	N° cloni						
	CTR	50 µg/mL NPs i.	200 µg/mL NPs i.	500 µg/mL NPs i.	50 µg/mL NPs b.	200 µg/mL NPs b.	500 µg/mL NPs b.
Replica n°1	215	196	181	175	212	201	216
Replica n°2	182	176	204	201	194	198	202
Replica n°2	210	221	191	198	205	203	187
Media n° cloni	202	198	192	191	204	201	202
Efficienza di clonaggio	101%	99%	96%	96%	102%	100%	101%
Sopravvivenza cellulare	100%	98%	95%	95%	101%	99%	100%

Tabella 11 N° cloni, efficiezza di clonaggio e sopravvivenza cellulare dopo incubazione con concentrazioni di 50/200/500 µg/mL di ZnS NPs

Indice figure

Figura 1: Strutture cristalline dell'ossido di zinco; Le sfere grigie e gialle rappresentano rispettivamente gli atomi di Zn e O. [25]	10
Figura 2: Struttura e superfici del polimorfo wurtzite [29]	10
Figura 3: Illustrazione schematica dei principali meccanismi luminescenti per ZnO. Nota: banda di valenza (VB); banda di conduttanza (CB). [44]	13
Figura 4: Strutture cristalline del solfuro di zinco. Le sfere bianche e nere rappresentano rispettivamente gli atomi di Zn e S. Adattata da [54]	16
Figura 5: Struttura e superfici della struttura sfalerite [55]	16
Figura 6: Rappresentazione schematica dei difetti puntuali che possono trovarsi nella struttura di ZnS. I_S = zolfo interstiziale, I_{Zn} = zinco interstiziale, V_S = vacanza di zolfo, V_{Zn} = vacanza di zinco. [63] .	18
Figura 7: Approcci di sintesi delle nanoparticelle [75]	21
Figura 8: Metodi di sintesi delle nanoparticelle di ZnO [16]	22
Figura 9: Diagramma di LaMer [80]	23
Figura 10: Schema di una bomba idrotermale [81]	24
Figura 11: Variazione di densità, prodotto ionico (K_w) e costante dielettrica dell'acqua a 30 Mpa, in funzione della temperatura. [83]	25
Figura 12: Relazione tra temperatura e pressione in funzione del grado di riempimento del reattore. [85]	26
Figura 13: Meccanismo di formazione delle nanoparticelle con le alghe [92]	27
Figura 14: Tecniche utilizzate per generare colture cellulari 3D.	30
Figura 15: Riduzione dell'MTS a Formazano [105]	31
Figura 16: Solubilità apparente dell'idrossido di zinco in funzione del pH [113]	34
Figura 17: Sintesi dell'ossido di zinco a riflusso	35
Figura 18: Difrattogramma di ZnO (Wurtzite) con indici di Miller	36
Figura 19: Spettro IR dell'ossido di zinco sintetizzato a 100 °C	36
Figura 20: Confronto diffrattogrammi di ZnO a 80, 100, 135 °C	38
Figura 21: Immagini TEM di ZnO a 135 °C	39
Figura 22: Immagini TEM di ZnO a 135 °C (con protocollo Diodati)	40
Figura 23: Fotobioreattore e concentrazione delle microalghe mediante centrifugazione	41
Figura 24: Sintesi biogenica di ZnO a 100 °C	42
Figura 25: Spettro IR di ZnO biogenico sintetizzato a 100°C	42
Figura 26: Spettro XRD di ZnO biogenico sintetizzato a 100 °C	43
Figura 27: Immagini TEM di ZnO biogenico sintetizzato a 100°C	44
Figura 28: Sintesi di ZnS in bagno termico a 80°C	46
Figura 29: Difrattogramma di ZnS (Sfalerite) con indici di Miller	47
Figura 30: Spettro IR di ZnS	47
Figura 31: Confronto diffrattogrammi di ZnS a 80, 100, 135 °C	49
Figura 32: Immagini TEM di ZnS sintetizzato a 135 °C	49
Figura 33: Immagine SEM di ZnS sintetizzato per via idrotermale	50
Figura 34: Spettro IR ZnS biogenico	52
Figura 35: Difrattogramma di ZnS biogenico	52
Figura 36: Immagini TEM di ZnS biogenico sintetizzato a 135 °C	53
Figura 37: Sospensione campione MCS12 alla concentrazione di 2 g/L	56
Figura 38: A) Spettro IR del PEG [141]; B) Spettro IR di ZnO+PEG	57
Figura 39: Cellule HCT116 osservate al microscopio ottico; A) Cellule di controllo senza NPs, B) Cellule incubate con ZnS NPs alla concentrazione di 500 µg/ml sintetizzate per via idrotermale.	59
Figura 40: Vitalità delle cellule HCT116 dopo 24 ore di incubazione con ZnS idrotermale. I dati sono la media ± deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti ciascuno condotto in triplicato per ciascuna dose di nanoparticelle	60
Figura 41: Vitalità delle cellule HCT116 dopo 24 ore di incubazione con ZnS biogenico. I dati sono la media ± deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti ciascuno condotto in triplicato per ciascuna dose di nanoparticelle	61

Figura 42: Cloni di cellule HCT116 vive osservati al microscopio ottico in contrasto di fase a 8 gg dalla semina.....	61
Figura 43: Immagini dei cloni colorati dopo trattamento con ZnS NPs idrotermali (A) e dopo trattamento con ZnS NPs biogenico (B).	62
Figura 44: Sopravvivenza delle cellule HCT116 dopo trattamento di 24 h con ZnS NPs idrotermali (blu) e dopo trattamento con ZnS NPs biogenico (verde). I dati si riferiscono ad un unico esperimento condotto in triplicato.	63
Figura 45: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza dello sferoide di HCT116 di controllo non trattato (A-B) e di quello incubato con le nanoparticelle ZnS idrotermali alla concentrazione di 500 µg/ml (C-D).....	64
Figura 46: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza dello sferoide di controllo (A-B) e dello sferoide incubato con le nanoparticelle ZnS biogeniche alla concentrazione di 500 µg/ml (C-D).....	65
Figura 47: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza degli sferoidi di cellule HCT116 trattati con metanolo.	65
Figura 48: Schema di allestimento della piastra da 96 pozzetti per il saggio MTS	73
Figura 49: Illustrazione geometrica della legge di Bragg [151].....	76
Figura 50 Diffrattogramma di ZnO NPs sintetizzate con il protocollo Diodati	90

Indice tabelle

Tabella 1: Resa e dimensioni dei cristalliti dei campioni di ZnO sintetizzati a 80,100 e 135 °C	37
Tabella 2: Confronto campioni di ZnO sintetizzati per via chimica e biogenica	45
Tabella 3 Resa e dimensioni dei cristalliti dei campioni di ZnS sintetizzati a 80,100 e 135 °C.....	48
Tabella 4: Resa e dimensione dei cristalliti dei campioni di ZnS sintetizzati per via biogenica.....	53
Tabella 5: Confronto campioni di ZnS sintetizzati per via chimica e biogenica.....	54
Tabella 6: Potenziale zeta dei campioni di ZnO e ZnS	55
Tabella 7: Potenziale zeta di campioni di ZnS non seccati	56
Tabella 8: Reagenti impiegati nelle sintesi delle nanoparticelle	67
Tabella 9: Risultati di stabilità delle NPs di ZnO funzionalizzate con PEG a diverso peso molecolare	71
Tabella 10: Risultati di stabilità delle NPs di ZnO funzionalizzate con PEG a diverso peso molecolare durante la sintesi.....	72
Tabella 11 N° cloni, efficenza di clonaggio e sopravvivenza cellulare dopo incubazione con concentrazioni di 50/200/500 µg/mL di ZnS NPs.....	90

Ringraziamenti

Giunta al termine del mio lavoro di ricerca, e dei miei anni universitari, desidero ringraziare le persone che hanno permesso la realizzazione di questa Tesi e tutti coloro che mi hanno incoraggiato e sostenuto. Desidero esprimere la mia riconoscenza alla mia relatrice Prof.ssa Silvia Gross e la mia correlatrice Prof.ssa Maddalena Mognato, che mi hanno sempre guidato e fornito preziosi consigli in questo periodo di ricerca. Ringrazio anche la Prof.ssa Regina Tavano, mia controrelatrice, per gli utili suggerimenti e per le critiche costruttive che mi ha dato durante i nostri incontri. Un sentito grazie a Susanna, Alisa e Davide che mi hanno sempre aiutata e indirizzata durante il mio periodo di ricerca con disponibilità e amicizia. Ringrazio Martina, Corrado, Vincenzo e gli altri componenti del gruppo AK Colloidi per la compagnia e i consigli che mi hanno dato.

Grazie di cuore ai miei genitori che hanno sempre avuto fiducia in me, dimostrandomi il loro grande affetto. Infine, il ringraziamento più grande va a mia sorella Elisa, che mi sopporta e sostiene da sempre.