

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



Sintesi idrotermale e biogenica di nanoparticelle di ZnO e ZnS drogate con europio

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

Correlatore: Prof. Marta Maria Natile
Dipartimento di Scienze Chimiche (DiSC)

Controrelatore: Prof. Luca Dell'Amico
Dipartimento di Scienze Chimiche (DiSC)

Laureando: Corrado Maucieri

Anno Accademico 2022/2023

Indice

LISTA DEGLI ACRONIMI	1
1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	3
1.1 Articolazione della Tesi	6
2. OSSIDO DI ZINCO	7
2.1. Proprietà chimico-fisiche e strutturali di ZnO	7
2.2. Proprietà ottiche di ZnO	9
2.3. Applicazioni dello ZnO	12
3. SOLFURO DI ZINCO	17
3.1. Proprietà chimico-fisiche e strutturali di ZnS	17
3.2. Proprietà ottiche di ZnS	19
3.3. Applicazioni dello ZnS	21
4. APPROCCI DI SINTESI	23
4.1 Sintesi Idrotermale	25
4.2 Sintesi Biogenica	27
4.2.1 Nannochloropsis gaditana	30
5. BIOIMAGING OTTICO	33
6. RISULTATI E DISCUSSIONE	37
6.1 Sintesi idrotermale	37
6.1.1 Solfuro di zinco	38
6.1.2 Ossido di zinco	51
6.2 Sintesi Biogenica	67
6.2.1 Solfuro di zinco	68
6.2.2 Ossido di zinco	74
6.3 Proprietà luminescenti dei campioni sintetizzati	79
6.3.1 Campioni sintetizzati mediante sintesi idrotermale	79
6.3.2 Campioni sintetizzati mediante sintesi biogenica	84
6.4 Confronto dei dati ottenuti mediante i due approcci sintetici	88
7. TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE	93
7.1 Diffrazione di Raggi X su polveri (XRD)	93
7.2 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	94
7.4 Fotoluminescenza	94

7.5 Microscopia elettronica a scansione (SEM) spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDX)-----	95
7.6 Spettrometria di massa a plasma accoppiato (ICP – MS)-----	96
8. PROCEDURE SPERIMENTALI-----	97
8.1. Reagenti-----	97
8.2. Sintesi biogenica-----	98
8.2.1. Preparazione dell'estratto algale -----	98
8.2.2 Sintesi biogenica di ZnO-----	98
8.2.2. Preparazione dell'estratto algale -----	99
8.2.3. Sintesi biogenica di ZnS-----	99
8.3. Sintesi idrotermale-----	100
8.3.1. Sintesi idrotermale di ZnO -----	100
8.3.2. Sintesi idrotermale di ZnS -----	101
8.4. Analisi ed elaborazione dati-----	101
9. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE-----	103
BIBLIOGRAFIA-----	106

LISTA DEGLI ACRONIMI

PXRD = Powder X-ray Diffraction

PDI = Polydispersity Index

TEM = Transmission Electron Microscopy

SEM = Scanning Electron Microscopy

EDX = Energy Dispersive X-ray spectroscopy

ICP – MS = Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy)

NIR = Near-InfraRed

DMS = Diluted Magnetic Semiconductor

FDA = Food and Drug Administration

MPA = Multi Photon Absorption

SPION = Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles

MSN = Mesoporous Silica Nanoparticles

PET = Positron Emission Tomography

FWHM = Full Width at Half Maximum

UV = Ultra-Violet

MSN = Mesoporous Silica Nanoparticles

Capitolo 1

1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La storia sull'utilizzo di nanomateriali da parte dell'essere umano ha lontane origini; infatti diverse popolazioni antiche ne hanno sfruttato inconsapevolmente le loro proprietà per varie scopi e utilizzi: gli Egizi, impiegavano nanoparticelle di PbS in una formulazione volta alla tintura per capelli[1,2]; altre testimonianze affermano l'utilizzo, 4500 anni fa, da parte di esseri umani, di nanofibre di asbesto con il fine di rafforzare miscele ceramiche[3]; le fuliggini di carbonio elementari, composti da strati di frammenti di grafene formanti nonosfere, sono state adoperate nelle scritture rupestri[4]. Nonostante ciò, la presa coscienza da parte del genere umano sulla presenza di materiali presentanti dimensioni dell'ordine dei nanometri avviene in epoca moderna, quando, nel 1914, per la prima volta venne citato il termine "nanometro" da parte del chimico austriaco Richard Adolf Zsigmondy per indicare la dimensione di particelle grandi un miliardesimo di metro[5]. Ma il concetto di nanotecnologia venne introdotto dal fisico teorico Richard Feynman nel 1959 durante il famoso discorso intitolato "*There's Plenty of Room at the Bottom*" tenutosi durante il convegno dell'*American Physical Society*, in cui affermava che le leggi della natura non limitano l'abilità umana nell'operare a livelli molecolari e atomici, e che l'unica barriera è rappresentata dalle tecniche adottate e dalla strumentazione disponibile[6]. Da qui viene coniato il termine "nanomateriali", in cui vengono inclusi materiali con dimensione compresa tra 1 e 100 nm[7]. Materiali con tali dimensioni presentano caratteristiche specifiche che li differenziano dal corrispettivo materiale con dimensioni superiori (i.e. massivo, *bulk*). In particolar modo viene riscontrato un aumento progressivo del contributo della superficie rispetto al massivo, con conseguente incremento della reattività e variazioni di proprietà chimico-fisiche del sistema[8]. Inoltre, si va incontro ad una variazione della struttura elettronica del materiale, che, in questo modo, non può più essere descritta da bande come nel materiale massivo, ma viene rappresentata in maniera più accurata da livelli energetici discreti. Ciò comporta la variazione di diverse proprietà funzionali del

sistema, tra cui proprietà ottiche, elettriche e magnetiche del materiale[9]. La modulazione delle proprietà di un materiale in relazione alle sue dimensioni ha procurato un interesse crescente da parte dei ricercatori di tutto il mondo e nel 1974 si iniziò a parlare di “Nanotecnologie”; termine utilizzato per la prima volta dall’ingegnere Norio Taniguchi[10]. Il campo delle nanotecnologie è in continua evoluzione e ad oggi sono disponibili approcci di sintesi e di caratterizzazione che permettono la produzione di nanomateriali con un maggior controllo delle dimensioni e di conseguenza delle proprietà correlate. Questo permette l’impiego dei nanomateriali in svariati campi applicativi tra cui: elettronica, cosmetica, bonifica ambientale, produzione di sensori e dispositivi che permettono l’accumulo di energia e nel *bio-imaging* ottico[11]. In relazione a quest’ultimo ambito, i nanomateriali semiconduttori, in particolar modo i calcogenuri dei metalli di transizione (per esempio CdSe e ZnS), hanno attratto un interesse crescente, come marcatori fluorescenti o agenti ottici di contrasto[12], grazie alla loro capacità di non andare incontro a *photobleaching* (processo in cui la luce provoca la perdita di attività di una molecola organica), a differenza dei fluorofori organici, e di modulare la loro emissione dal visibile alla regione NIR (*Near-InfraRed*) al variare delle loro dimensioni o della loro composizione[13]. Tuttavia, una delle problematiche principali nell’utilizzo di alcuni *quantum dots* (termine che indica nanocristalli di semiconduttori) in ambito biomedico, è la loro citotossicità. Ne sono un esempio le nanoparticelle di seleniuro e telluro di cadmio (rispettivamente CdSe e CdTe) e nanoparticelle di ferro ossido superparamagnetico (SPIONs), citotossiche ad alte concentrazioni[14]. Proprio per questo motivo, negli ultimi anni la ricerca si sta orientando su materiali alternativi con una ridotta tossicità cellulare, come nanoparticelle metalliche (di Au e di Ag) e *quantum dots* che non contengono elementi tossici come il cadmio e il selenio. Tra questi sono di rilevante importanza il solfuro di zinco e l’ossido di zinco, semiconduttori caratterizzati da buona stabilità termica e bassa tossicità[15,16], che possono essere drogati con ioni luminescenti al fine di modulare le loro proprietà fluorescenti[17]. Entrambi i materiali appartengono alla classe II-VI dei semiconduttori e grazie al loro ampio band gap sono particolarmente adatti per applicazioni opto-elettroniche[16,18]. Nanoparticelle di tali materiali vengono ottenute mediante diversi approcci sintetici, con un

controllo ottimale su dimensioni e proprietà ottiche del prodotto finale. Le metodiche di sintesi impiegate maggiormente fanno parte di quei metodi di sintesi denominati *soft* e sono: la precipitazione a partire dai precursori in soluzione, la miniemulsione, approcci idrotermali, sintesi sol-gel e la decomposizione di precursori metallorganici[19].

Spesso, queste tipologie di sintesi prevedono l'utilizzo di tensioattivi o leganti che interagiscono con la superficie delle nanoparticelle, in modo da contenerne la crescita dimensionale; tuttavia, il controllo dimensionale sul prodotto finale si può ottenere anche senza l'impiego di tali sostanze.

A tal proposito, negli ultimi anni, la ricerca si è incentrata verso lo studio di approcci di sintesi più sostenibili soprattutto nella produzione di reagenti e materiali, allo scopo di diminuire, se non eliminare, l'uso di reagenti inquinanti e di sfruttare, quando possibile, il riciclo dei prodotti[20].

Gli approcci *wet-chemistry* basati principalmente sui processi di sintesi soft in termini di pressione e temperatura, sono particolarmente promettenti in quest'ottica, ma al giorno d'oggi la sfida principale è la riduzione dei consumi energetici, condizione che deve essere necessariamente considerata nel raggiungimento di un processo sostenibile, competitivo e rispettoso dell'ambiente.

Tra gli approcci di sintesi *soft*, un'alternativa proposta per la produzione di nanoparticelle metalliche e binarie è la sintesi biogenica, che rispetta otto dei dodici “*Principles of Green Chemistry*”, introdotti nel 1988 da Paul Anastas e John Warner[20], che, in generale, hanno lo scopo di orientare i ricercatori verso il raggiungimento della sostenibilità. In particolare, la sintesi biogenica limita molto l'utilizzo di reagenti tossici e pericolosi, i prodotti ottenuti sono sicuri e non persistono nell'ambiente e l'energia richiesta da parte del processo chimico è ridotta. Si tratta di un approccio di *wet chemistry* supportato dallo sfruttamento delle possibilità offerte dalla natura. Al giorno d'oggi, enzimi, microorganismi, funghi, estratti di alghe e di piante possono essere usati come “*green scaffold*”, in particolare come riducenti e/o stabilizzanti per promuovere la formazione di nanoparticelle inorganiche metalliche e binarie (ossidi e solfuri)[21].

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di Tesi, in cui sono state sintetizzate nanoparticelle di ossido di zinco e solfuro di zinco mediante approccio idrotermale e biogenico. Per quanto riguarda quest'ultimo, la sintesi è stata effettuata utilizzando estratti algali della specie *Nannochloropsis gaditana*. Le polveri ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico, strutturale e funzionale. Lo scopo principale di questo lavoro prevedeva il confronto tra le due metodiche di sintesi con discussione dei loro vantaggi e svantaggi. Inoltre, obiettivo correlato della tesi era lo studio dell'effetto dell'introduzione di europio (Eu^{3+}), come drogante, a diverse percentuali atomiche all'interno di tali nanoparticelle, in maniera tale da modulare le loro proprietà di luminescenza, nell'ottica di un'eventuale applicazione nel campo del *bioimaging* ottico, non trascurando il fatto che bisognerebbe testare anche la citotossicità delle nanoparticelle in questione affinché esse possano essere utilizzate in tale campo applicativo. Quest'ultima parte della tesi era prevista, ma a causa dei lavori al Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova (A.Vallisneri), non è stata affrontata.

1.1 Articolazione della Tesi

La presente tesi è strutturata in nove capitoli. Il primo Capitolo è l'introduzione al progetto di tesi ed include gli obiettivi del lavoro. Nei Capitoli 2 e 3 vengono descritte le proprietà strutturali, fisico-chimiche, ottiche e le applicazioni di ossido di zinco e solfuro di zinco, rispettivamente. Nel Capitolo 4 vengono illustrati i possibili approcci sintetici delle nanoparticelle di ossido di zinco e solfuro di zinco, passando poi ad una presentazione più dettagliata riguardo ai metodi di sintesi adottati nel presente lavoro di tesi. Nel Capitolo 5 vengono descritte le caratteristiche del *bioimaging* ottico e le applicazioni ad esso relative. Il Capitolo 6 presenta e discute i risultati sperimentali. Nel Capitolo 7 vengono descritte le tecniche di caratterizzazione impiegate, mentre nel Capitolo 8 vengono descritti i dettagli sperimentali riguardanti le procedure e le condizioni di sintesi. Infine, nell'ultimo Capitolo, vengono tratte delle conclusioni sul lavoro svolto, accennando eventuali prospettive future.

Capitolo 2

2. OSSIDO DI ZINCO

2.1. Proprietà chimico-fisiche e strutturali di ZnO

Si tratta di un composto inorganico con formula ZnO rappresentato da una polvere bianca, insolubile in acqua e inodore[16]. Viene classificato come semiconduttore II-VI, in quanto Zn e O fanno parte dei gruppi 2 e 6 della tavola periodica. Per quanto riguarda le sue proprietà fisiche possiede un'ottima stabilità meccanica e termica, e per questo motivo viene considerato uno dei semiconduttori II-VI più resistenti in commercio: infatti, fonde a 1975°C e sublima a temperature poco superiori ai 1700°C[22]. In natura si trova come minerale di zincite e cristallizza preferenzialmente nella struttura esagonale di tipo wurtzite che è la forma più stabile a temperatura ambiente. Essa è caratterizzata da una geometria di coordinazione tetraedrica tipica del legame covalente sp^3 , in cui ogni anione (O^{2-}) è circondato da quattro cationi (Zn^{2+}) ai vertici di un tetraedro e viceversa. Tuttavia, ZnO può esistere anche in altre due strutture cristalline: la zinco blenda o il *rock salt*[23], caratterizzati da un reticolo cristallino cubico. La struttura zinco blenda è metastabile e può essere stabilizzata solo mediante crescita su substrati cubici. Inoltre, presenta coordinazione tetraedrica come la wurtzite, e questo lo si può notare dal fatto che i 4 atomi più vicini e i 12 atomi successivi più vicini hanno la stessa distanza di legame in entrambe le strutture. La differenza tra wurtzite e zinco blenda è data dal diverso angolo di legame dei secondi atomi più vicini. Invece, la struttura *rock salt* può essere ottenuta a pressioni relativamente elevate, che provocano una riduzione delle dimensioni del reticolo causando la formazione di interazioni di Coulomb interioniche che favoriscono la ionizzazione piuttosto che la natura covalente[23].

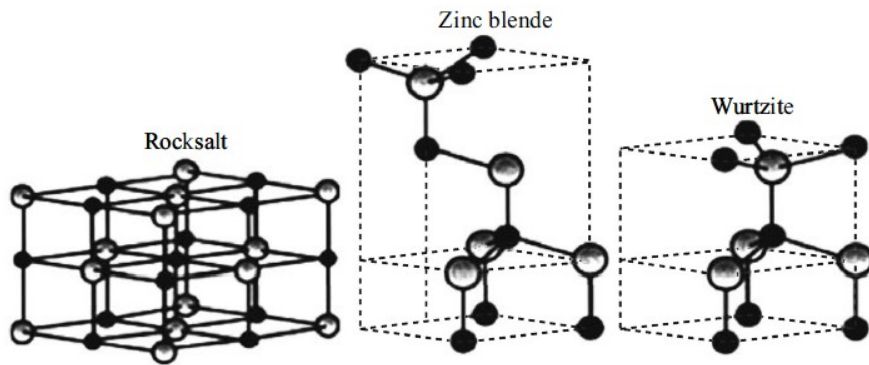


Figura 2.1: Strutture cristalline di ZnO; le sfere grigie rappresentano gli atomi di Zn, mentre le sfere nere gli atomi di O[24]

La struttura esagonale della wurtzite è caratterizzata dai seguenti parametri reticolari; $a = 0,325$ nm e $c = 0,521$ nm e il rapporto c/a è circa 1,6; valore che devia di poco rispetto alla cella esagonale ideale il cui rapporto c/a corrisponde a 1,633. Questo tipo di reticolo appartiene al gruppo spaziale P63mc e può essere rappresentato in maniera schematica da una serie di piani alternati composti da ioni O^{2-} e Zn^{2+} coordinati in modo tetraedrico, impilati in maniera alternata lungo l'asse c [25]. La coordinazione tetraedrica non centro-simmetrica, ne determina le proprietà piezoelettriche e cristallografiche ed è anche un fattore chiave nella crescita dei cristalli e nella generazione dei difetti. Le superfici del cristallo di ZnO sono: i piani polari Zn-(0001) carichi positivamente, O-(0001) carichi negativamente e quelli non polari (2110) e (0110). Una variazione di crescita lungo i diversi piani spesso induce una crescita anisotropa dei cristalli di ZnO. Studi cinetici hanno dimostrato che le molecole, atomi o ioni costituenti il cristallo tendono ad adsorbire in maniera preferenziale sulle proprie superfici in modo 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 [26].

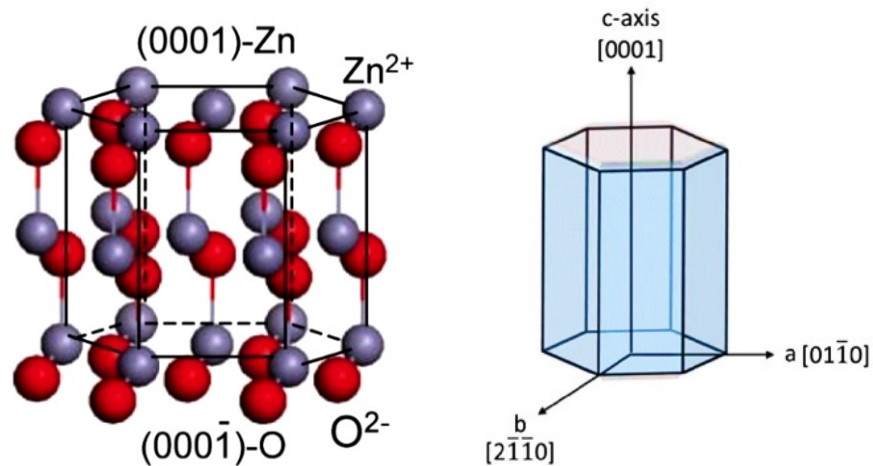


Figura 2.1: Rappresentazione di struttura e superfici del polimorfo wurtzite[26,27]

2.2. Proprietà ottiche di ZnO

Si tratta di un materiale caratterizzato da un ampio band (3,37 eV) nello spettro del vicino UV e un'elevata energia di legame eccitonica (60 meV) a temperatura ambiente[28]. È dotato di un elevato assorbimento ottico nelle regioni UVA (315-400 nm) e UVB (280-315 nm), che gli conferisce importanti caratteristiche antimicrobiche e protettive nei confronti dei raggi UV, a tal punto da essere molto impiegato nella produzione di creme solari[29]. Inoltre, è in grado di emettere luminescenza blu e verde e proprio per questo motivo è considerato un materiale importante, anche nel campo applicativo del *bioimaging* ottico[30,31]. I nanocristalli semiconduttori, in generale, presentano buone proprietà fotoluminescenti, un ampio assorbimento, una banda di emissione stretta e simmetrica, un rilevante spostamento di Stokes e un debole auto-assorbimento. Inoltre, la lunghezza d'onda di emissione è regolabile in base alla dimensione e sono caratterizzati da un'elevata stabilità nei confronti del *photo-bleaching*, a differenza dei coloranti organici fluorescenti[32]. Per questo motivo negli ultimi anni è aumentato l'interesse nei confronti di questi nanomateriali per la possibile loro applicazione nel *bioimaging*; in diversi studi sintetizzano e testano infatti diversi tipi di nanoparticelle in vitro o in vivo[33].

Per quanto riguarda l'ossido di zinco, prendendo in considerazione la forma più stabile a temperatura ambiente, ossia la wurtzite; si osservano normalmente due

bande di emissione fotoluminescenti: una nella regione UV intorno ai 370 nm (blu), derivante dalla tipica transizione del band gap, e una nel visibile (verde) dovuta probabilmente a difetti puntuali[30]. Molti difetti puntuali sono stati proposti come responsabili di questa emissione, tra cui vacanze di ossigeno, vacanze di zinco, atomi di ossigeno interstiziali e atomi di zinco interstiziale, anche se, dopo molti anni di studi, l'origine dell'emissione nel visibile è ancora oggetto di dibattito. Tra le varie tesi proposte, le vacanze di ossigeno sono l'ipotesi più accreditata[34]. Inoltre, altri studi asseriscono che l'emissione verde generata dalle nanoparticelle di ZnO sia originata principalmente da difetti superficiali piuttosto che da difetti interstiziali[35].

I materiali semiconduttori sono caratterizzati dalla presenza di 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, formando una lacuna, che acquirerà carica positiva a causa dell'allontanamento dell'elettrone, che assumerà invece il ruolo della specie carica negativamente (figura 2.2). Questa configurazione viene chiamata eccitone, ossia, una quasiparticella che descrive lo stato eccitato di un sistema della materia condensata. Quando l'elettrone si rilassa nuovamente nella banda di valenza, annulla 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 appena descritto spiega l'emissione di ZnO nella regione UV, essendo il band gap di ZnO pari a 3,37 eV (lunghezza d'onda associata pari a circa 368 nm)[33].

Per quanto riguarda invece l'emissione nel visibile (verde) sono stati suggeriti due meccanismi probabili (situazioni B e C di figura 2.3): la ricombinazione di un elettrone intrappolato superficialmente con una lacuna in una trappola profonda, oppure la ricombinazione di un elettrone in una vacanza di ossigeno profonda con una lacuna fotogenerata nella banda di valenza. Entrambi i meccanismi vengono considerati possibili[36].

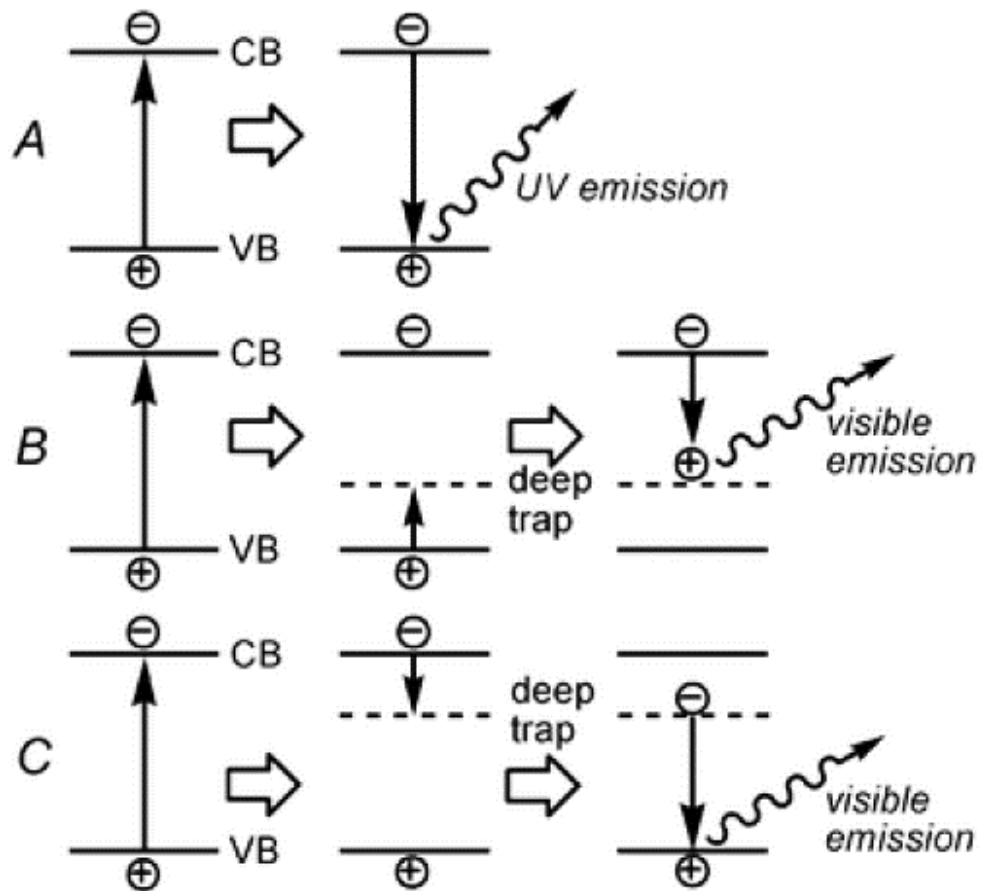


Figura 2.2: Rappresentazione dei principali meccanismi luminescenti di ZnO[30]

In ogni caso nanoparticelle di ZnO presentano diverse problematiche, tra cui il fatto che la luminescenza correlata ai difetti puntiformi delle nanoparticelle viene facilmente smorzata dalle molecole d'acqua e la necessaria eccitazione UV per ottenere la fotoluminescenza. Infatti, la luce UV può danneggiare cellule e tessuti ed indurre auto-fluorescenza interferente dalle biomolecole. Per questo motivo molte ricerche limitano l'utilizzo delle nanoparticelle a studi di imaging in vitro[32]. Tuttavia, il band gap di ZnO si può modulare drogando le nanoparticelle di ZnO con elementi di transizione o ioni lantanidi, modulandone anche le proprietà luminescenti. Inoltre, il drogaggio con ioni lantanidi, permette la minimizzazione della veloce ricombinazione della coppia elettrone-lacuna, caratteristica del ZnO, riducendo la probabilità di ricombinazione e aumentando il tempo di carica[37].

In ogni caso, per poter utilizzare nanoparticelle di ZnO nell'ambito del *bioimaging* ottico, un altro importante aspetto da valutare è la citotossicità. Anche se ZnO è stato approvato per usi cosmetici dalla Food and Drug Administration (FDA), il meccanismo di citotossicità per i nanomateriali di ZnO non è ancora ben chiaro[38]. In alcuni studi è stato riportato che le nanoparticelle di ZnO mostrano effetto citotossico al di sopra di elevate concentrazioni e in funzione del pH, provocato dal rilascio di ioni Zn^{2+} nelle cellule, il quale, potrebbe promuovere una serie di effetti dannosi, tra cui, danni lisosomiali, mitocondriali e la produzione di ROS (Reactive Oxygen Species)[32,39,40]. Tuttavia, basse concentrazioni di Zn^{2+} sono ben tollerate dalle cellule in quanto lo zinco è un elemento essenziale per il metabolismo cellulare[38].

2.3. Applicazioni dello ZnO

Oltre alle sue uniche proprietà ottiche, elettriche e meccaniche, ZnO è un materiale poco costoso, facilmente reperibile in natura, resistente e durevole[41]. Le prime applicazioni associate a ZnO sono riconducibili a film sottili, utilizzati già negli anni '60 per la produzione di sensori, trasduttori e come fotocatalizzatori. Negli ultimi anni, lo studio di questo materiale in forma nanostrutturata ha acquisito notevole importanza nelle nanoscienze e nelle nanotecnologie grazie allo sfruttamento di interessanti proprietà elettriche, meccaniche, chimiche e ottiche conferitegli dagli effetti di confinamento[28].

Le nanoparticelle di ZnO sono uno dei tre nanomateriali più studiati e prodotti insieme alle nanoparticelle di biossido di titanio e alle nanoparticelle di biossido di silicio[42]. Infatti, nanoparticelle di ZnO presentano una vasta gamma di applicazioni in diversi campi in base alle loro dimensioni e alla loro forma. Esso, infatti, viene considerato uno dei semiconduttori con la maggior variabilità di nanostrutture in quanto, può dare origine a strutture mono-dimensionali (fili, anelli, eliche, tubi), bi-dimensionali e tri-dimensionali, come nanostelle e nanosfere[43].

Le principali applicazioni tecnologiche riguardano il settore dell'elettronica e optoelettronica; infatti, nanoparticelle di ZnO vengono ampiamente impiegate in

filtri per onde acustiche di superficie, celle solari, fotorivelatori, emettitori di luce, diodi, fotodiodi, sensori di gas, modulatori ottici, e varistori[28].

Possono fungere anche da supporto per catalizzatori nella catalisi eterogenea o come fotocatalizzatori, applicazione interessante soprattutto in ambito ambientale[16]. Infatti, ZnO si è dimostrato un ottimo fotocatalizzatore per la degradazione di inquinanti organici in acqua e in aria sotto irraggiamento UV[44].

Trova anche applicazione come additivo in svariati prodotti industriali come vernici, gomma, cosmetici e rivestimenti. Per quanto riguarda il settore dei cosmetici, è molto impiegato nella produzione di creme solari grazie alla propria capacità di assorbire le radiazioni UV[45].

Nanoparticelle di ZnO presentano elevata biocompatibilità e basso costo, come precedentemente evidenziato, e proprio per questo motivo, sono molto impiegate anche in ambito biomedico. Infatti, questo nanomateriale viene sfruttato in svariate terapie poiché ha mostrato proprietà antidiabetica, antitumorale, antinfiammatoria e antibatterica[46].

ZnO presenta importanti proprietà antibatteriche nei confronti di diverse specie e la sua efficacia dipende dalle dimensioni del materiale, di fatto quando viene raggiunta la scala dei nanometri è possibile osservare un aumento delle proprietà antibatteriche[24]. Nanoparticelle di ZnO interagiscono con la superficie batterica e/o con il core batterico, penetrando all'interno delle cellule ed esplicando diversi meccanismi battericidi[24].

Le proprietà luminescenti rendono l'ossido di zinco un ottimo candidato nel *bioimaging* ottico[30]. Piccole molecole, come glucosio, fenolo, H₂O₂, colesterolo e urea[38] possono essere rilevati da biosensori basati su ZnO. Inoltre, nanoparticelle di ZnO possono essere utilizzate anche nel sistema di rilascio di farmaci per il trattamento di diverse malattie, tra cui 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[31]. Diversi studi suggeriscono che il rilascio di farmaci da parte dei materiali nanostrutturati di ZnO è pH-dipendente[47,48]. Zhu e Guo et al. hanno messo a punto un sistema di

rilascio di doxorubicina (DOX; farmaco antitumorale che rallenta o blocca la crescita delle cellule) in cellule HeLa. Il sistema è composto da nanoparticelle di silicio con dei mesopori (MSN, Mesoporous Silicon Nanoparticles) contenenti il farmaco e ricoperti da *quantum dots* di ZnO (*ZnO nanolids*), stabili a pH 7, ma che vengono facilmente rilasciati a pH inferiori a 6. In questo modo la fluorescenza delle nanoparticelle di ZnO può essere sfruttata per monitorare il processo di veicolazione della doxorubicina. In figura (Figura 2.3) è possibile notare che i canali delle nanoparticelle di silicio sono parzialmente funzionalizzati internamente con delle ammine e le nanoparticelle di ZnO sono modificate con gruppi amminopropilici. Tuttavia, quando il sistema raggiunge i compartimenti acidi dei lisosomi (pH = 4,5-5,0), lo ZnO viene decomposto e la doxorubicina viene rilasciata dai mesopori, con lo scopo di danneggiare le cellule HeLa.[49]

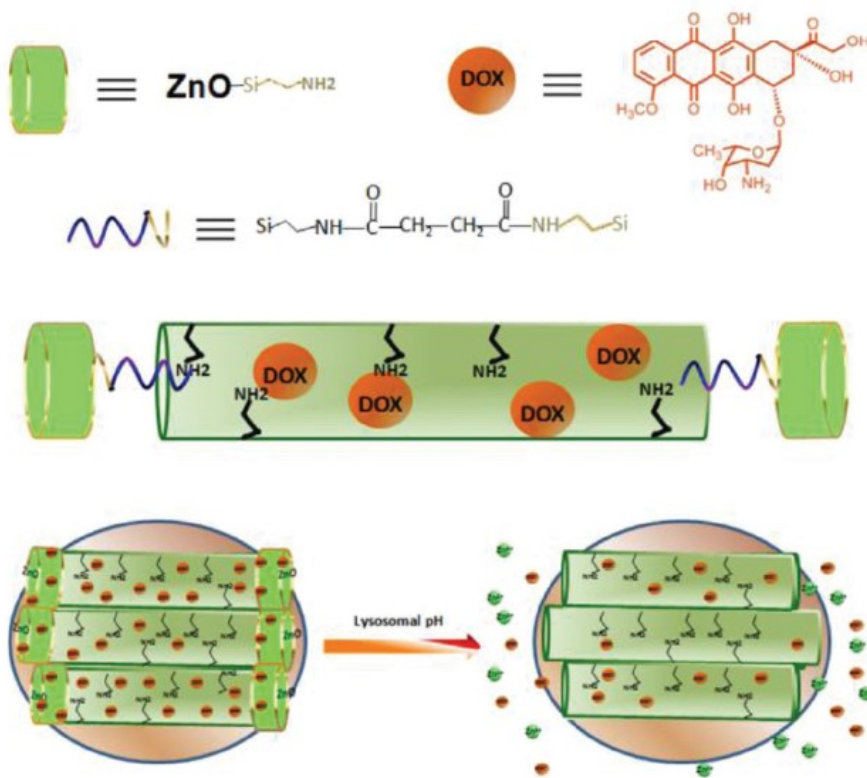


Figura 2.3: Rappresentazione schematica del sistema ZnO-MSN-DOX e del rilascio di DOX in funzione del pH[32]

Le NP di ZnO vengono sfruttate anche in agricoltura, in particolar modo nei fertilizzanti per aumentare la concentrazione di zinco nelle coltivazioni[50]. Il loro utilizzo è consigliato anche nella conservazione degli alimenti, soprattutto negli

imballaggi alimentari contenenti polimeri biodegradabili. È stato dimostrato un miglioramento della qualità del cibo grazie al suo confezionamento, in quanto, in tali imballaggi essi, permettono il rilascio di ioni antimicrobici, che danneggiano le cellule batteriche promuovendo la formazione di ROS per effetto della radiazione luminosa provocando un effetto di tossicità cellulare[31].

Capitolo 3

3. SOLFURO DI ZINCO

3.1. Proprietà chimico-fisiche e strutturali di ZnS

Il solfuro di zinco si presenta come un solido bianco e inodore, ma i suoi minerali in genere sono neri a causa della presenza di diverse impurezze. È un composto inorganico (II) con formula ZnS e presenta proprietà chimico-fisiche paragonabili a quelle dell'ossido di zinco, anche se è meno stabile termicamente di quest'ultimo; infatti, sublima a 1185°C e fonde a 1850°C. Il legame Zn-S è molto più covalente rispetto a quello Zn-O in quanto l'elettronegatività di Pauling dello zolfo (2.5) è significativamente inferiore a quella dell'O (3.5); e questo ha delle importanti ripercussioni sulla struttura e sulle sue proprietà chimiche[51].

È presente in natura sottoforma di due polimorfi: la sfalerite (o zincoblenda), che rappresenta la forma cristallina più diffusa e principale fonte minerale per lo zinco elementare, e la wurtzite, più rara in natura. La sfalerite presenta struttura cubica (gruppo spaziale F43m) ed è la forma cristallina più stabile a temperatura ambiente; invece, la forma cristallina più stabile ad alte temperature, in particolare fino ai 1020°C per il solfuro di zinco massivo, è la wurtzite, caratterizzata da una struttura esagonale (gruppo spaziale P6₃mc)[52].

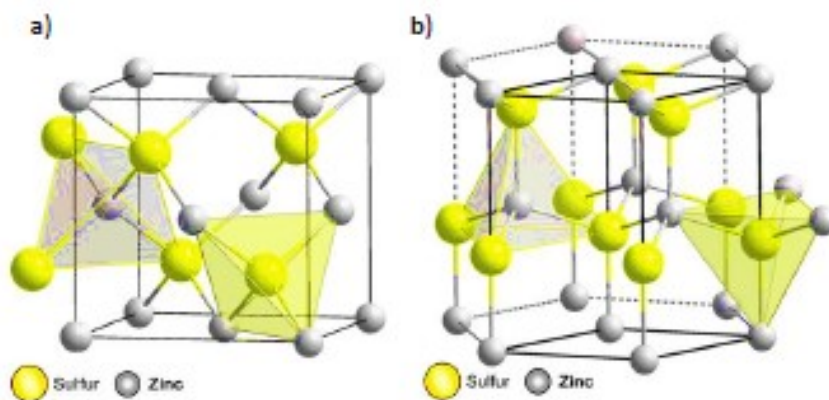


Figura 4.1: Struttura cristallina dei polimorfi di ZnS; sfalerite (a sinistra) e wurtzite (a destra)

Entrambe le strutture cristalline sono costituite da atomi di zinco e di zolfo coordinati con geometria tetraedrica, impacchettati con una sequenza ABCABC nella sfalerite e con una sequenza ABABAB nella wurtzite[53]. I parametri reticolari della sfalerite sono $a=b=c= 0,545 \text{ nm}$, mentre per la wurtzite sono $a=b= 0,382 \text{ nm}$, $c=0,626 \text{ nm}$. Osservando la struttura è possibile notare due superfici polari, ossia $[001]$ e $[\bar{1}11]$, in cui il cristallo è composto da piani alternati di cationi (Zn^{2+}) o anioni (S^{2-}), e una superficie stechiometrica apolare più stabile, la $[110]$, in cui ogni piano è formato da un numero uguale di cationi e anioni, a differenza delle superfici polari che 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, inducendo un abbassamento della stabilità per quelle superfici caratterizzate da un indice più elevato[54].

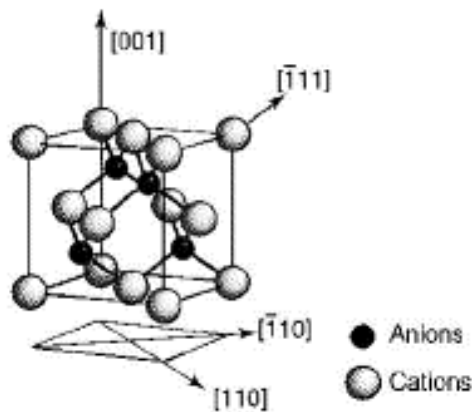


Figura 3.2: Struttura e superfici del polimorfo di ZnS sfalerite

L'energia di formazione della sfalerite in fase massiva è circa 10 kJ mol^{-1} minore rispetto a quella della wurtzite in fase massiva[55] e a causa di tale ridotta differenza di energia tra le due strutture e della ridotta energia degli *stacking faults* (difetti di impilamento che danno luogo a diversi politipi) in ZnS (circa $0,006 \text{ J m}^{-2}$), esistono diversi politipi del solfuro di zinco basati su precisi arrangiamenti di impacchettamenti cubici ed esagonali, che si differenziano di poco a livello energetico[56–58]. In ogni caso, è nota l'esistenza di altri due polimorfi dello ZnS ottenuti mediante l'applicazione di elevate pressioni sui polimorfi comuni, aventi

struttura di tipo salgemma (gruppo spaziale $Fm\bar{3}m$) od una struttura ortorombica (gruppo spaziale $Cmcm$)[59,60]

Le strutture cristalline dei calcogenuri metallici spessi si discostano dall'idealità, a causa della formazione di difetti puntuali, come vacanze di zolfo, vacanze di zinco, atomi di zinco interstiziali e atomi di zolfo interstiziali[61]. La presenza di tali difetti puntuali provoca un riarrangiamento della struttura cristallina, che viene deformata in maniera dipendente dalle dimensioni dell'atomo vacante o interstiziale. Poiché gli ioni S^{2-} (184 pm[62]) sono molto più grandi degli ioni Zn^{2+} (60 pm[62]), in generale i difetti puntuali ad esso correlati inducono un maggiore strain nel reticolo[57].

3.2. Proprietà ottiche di ZnS

Il solfuro di zinco, così come l'ossido di zinco, è un materiale caratterizzato da un ampio band gap e le differenze negli arrangiamenti atomici tra i due polimorfi di ZnS portano a piccole differenze nelle proprietà dei materiali, tra cui la struttura elettronica e il suddetto band gap, che risulta pari a 3,77 eV (329 nm) per la wurtzite e 3,72 eV (333 nm) per la sfalerite, prendendo in considerazione la forma massiva[18].

Per le nanoparticelle di solfuro di zinco è possibile osservare diverse bande di emissione nella regione UV-visibile, in particolar modo nel blu, verde e arancione. Le proprietà di luminescenza del solfuro di zinco sono generalmente attribuite ai difetti puntuali di ZnS[61], oltre che a stati superficiali e difetti come i bordi di grano[57], che provocano la formazione di livelli energetici localizzati all'interno della banda proibita del semiconduttore che permettono la formazione di quattro transizioni ottiche nel range UV[57,61]. Le condizioni di sintesi utilizzate determinano la natura e la concentrazione dei difetti di ZnS, pertanto, si persegue il controllo di tali difetti al fine di ottenere la proprietà di luminescenza desiderate[61].

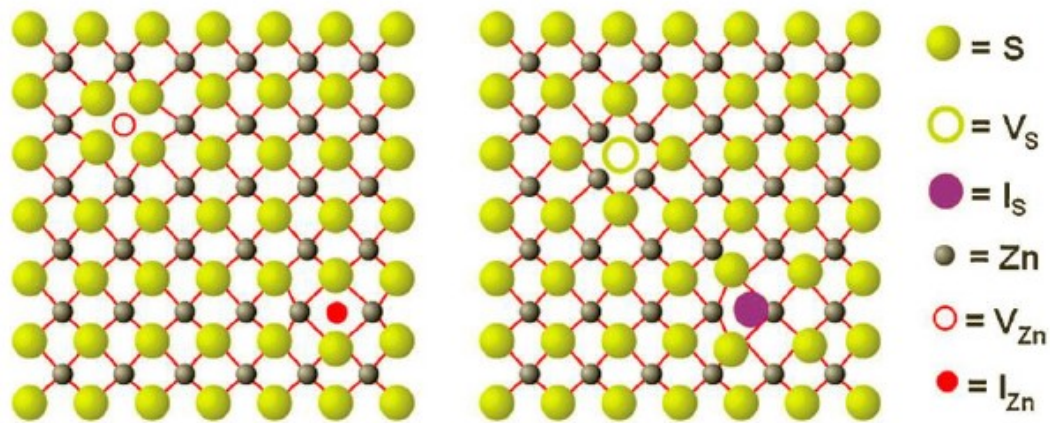


Figura 3.3: Raffigurazione dei probabili difetti puntuali che possono essere presenti nella struttura di ZnS. I_S = zolfo interstiziale, I_{Zn} = zinco interstiziale, V_S = vacanza di zolfo, V_{Zn} = vacanza di zinco[61]

Le proprietà di luminescenza di ZnS, inoltre, possono essere modulate per conseguire emissioni nel campo visibile o nel NIR, mediante il drogaggio delle nanostrutture. Infatti, l'ampio bandgap del solfuro di zinco può essere ingegnerizzato identificando ioni di metalli di transizione e lantanidi droganti che possano modificare la sua struttura elettronica, creando nuovi livelli energetici nella banda proibita, ed agire da centri luminescenti[63].

In letteratura sono presenti un vasto numero di esempi di doping di ZnS con metalli di transizione e lantanidi. Le proprietà di luminescenza del solfuro di zinco drogato nanostrutturato dipendono dalla natura e dalla posizione dello ione drogante all'interno della struttura[63–65]; in tale materiale il drogante può trovarsi in un sito interstiziale o sostituire un atomo di zinco. È stato dimostrato, tramite studi EXAFS che le impurezze di manganese, per esempio, sostituiscono lo zinco all'interno del reticolo cristallino di ZnS; mentre, impurezze di ioni lantanidi generalmente vengono incorporate in siti interstiziali[66,67].

Il doping con metalli di transizione permette l'utilizzo di ZnS in applicazioni che sfruttano l'emissione nel visibile, tra cui display ottici e fotocatalizzatori; mentre il doping con ioni lantanidi consente invece di conseguire fotoemissione nel range del NIR, utilizzata nel campo del *bioimaging* ottico[68]. L'introduzione di impurezze di metalli di transizione e lantanidi, con proprietà magnetiche, in un semiconduttore ad ampio bandgap come ZnS inoltre può indurre proprietà

magnetiche nel materiale e permette quindi la classificazione di essi come *DMS (Diluted Magnetic Semiconductor)*[69].

Tajoli et al. hanno analizzato la citotossicità di questi nanosistemi e i risultati ottenuti hanno dimostrato che le nanoparticelle di ZnS a basse concentrazioni non hanno effetti citotossici su alcuni tipi di cellule umane coltivate in vitro[70]; mentre, secondo altri studi, ZnS puro è risultato lievemente tossico; inoltre, se drogato con metalli, in particolar modo con manganese, può indurre elevata tossicità nei confronti delle cellule[71]. I fattori che influenzano maggiormente la citotossicità delle nanoparticelle di ZnS sono quindi il rilascio di metalli tossici e la composizione del rivestimento[72].

3.3. Applicazioni dello ZnS

Anche per quanto riguarda il solfuro di zinco, sono presenti diversi tipi di nanostrutture mono-, bi- e tri-dimensionali di ZnS, come nanofili, nanocinture, nanotubi, nanocombs, nanofogli, nanosfere ecc. Le principali applicazioni del solfuro di zinco sono legate alle sue caratteristiche ottiche ed elettroniche, ma in particolar modo al suo ampio band gap, che permette un'ottima emissione che può essere ben sfruttata per la produzione di dispositivi che basano il proprio funzionamento sulla luce ultravioletta (UV) come sensori chimici, fotorilevatori e altri dispositivi di elettroluminescenza (schermi, LED, laser ecc.)[18]. Inoltre, il solfuro di zinco è uno dei pochi composti luminescenti approvati dalla FDA (*Food and Drug Administration*) per uso cosmetico, infatti, viene utilizzato come ingrediente in prodotti cosmetici per la pelle, come creme solari, polveri e fondotinta, in quanto crea una barriera sulla pelle promuovendo protezione dai raggi solari dannosi[73].

Presenta diverse applicazioni anche in campo biomedico, nella preparazione di biosensori e biocompositi. Anch'esso, come l'ossido di zinco, viene sfruttato nella rilevazione di specie biologiche, come il glucosio[74]. Inoltre, grazie alla capacità di generare specie reattive dell'ossigeno, 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 di conseguenza agente antitumorale,

mostrando un'efficiente tossicità contro diverse specie tumorali, tra cui le cellule del cancro al seno (MCF-7)[75,76]. Se le nanoparticelle vengono drogate/funzionalizzate con materiale organico biocompatibile possono essere sfruttate in molte altre applicazioni mediche, come il rilascio di farmaci, il rilevamento e la marcatura di malattie in cellule biologiche[53]. Ad esempio, sono stati progettati dei quantum dots di ZnS rivestiti di carbossimetilcellulosa per individuare cellule del cancro al cervello[77].

Il solfuro di zinco è un materiale promettente anche in catalisi e fotocatalisi, in particolar modo viene spesso impiegato nel trattamento delle acque reflue dove agisce come fotocatalizzatore nella degradazione di diversi inquinanti organici quali coloranti, p-nitrofenolo e derivati alogenati del benzene[78]. Inoltre, la polvere fine di ZnS può fungere da fotocatalizzatore per produrre idrogeno gassoso dall'acqua dopo adeguata illuminazione[79]. Usato molto anche come additivo in diversi prodotti industriali, come pigmento per vernici, plastica, carta e gomma, e insieme ai pigmenti di biossido di titanio e ossido di zinco, fa parte dei pigmenti bianchi inorganici più importanti. In genere viene maggiormente venduto sottoforma di litopone, una miscela costituita da solfuro di zinco e solfato di bario[80].

In campo agricolo, alcuni ricercatori hanno evidenziato la capacità di biofertilizzazione da parte delle nanoparticelle di ZnS. Sono stati condotti diversi studi, in particolare Suganyaet et al. hanno 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[31].

Capitolo 4

4. APPROCCI DI SINTESI

Diverse tecniche possono essere utilizzate per la sintesi dell'ossido e del solfuro di zinco, suddivisibili in tre tipologie, ossia metodi fisici, chimici e biologici.

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[81]. Lo scopo ultimo di queste tecniche è quello di produrre nanoparticelle mediante frammentazione e/o riduzione delle dimensioni del materiale di partenza, detto approccio "top-down".

L'approccio "bottom-up", metodo in cui le particelle si formano per nucleazione e accrescimento a partire da precursori atomici o molecolari, viene sfruttato principalmente con metodi chimici e biologici per la produzione di nanoparticelle. Di solito processi di "bottom-up" avvengono tramite reazioni chimiche in fase liquida o vapore.

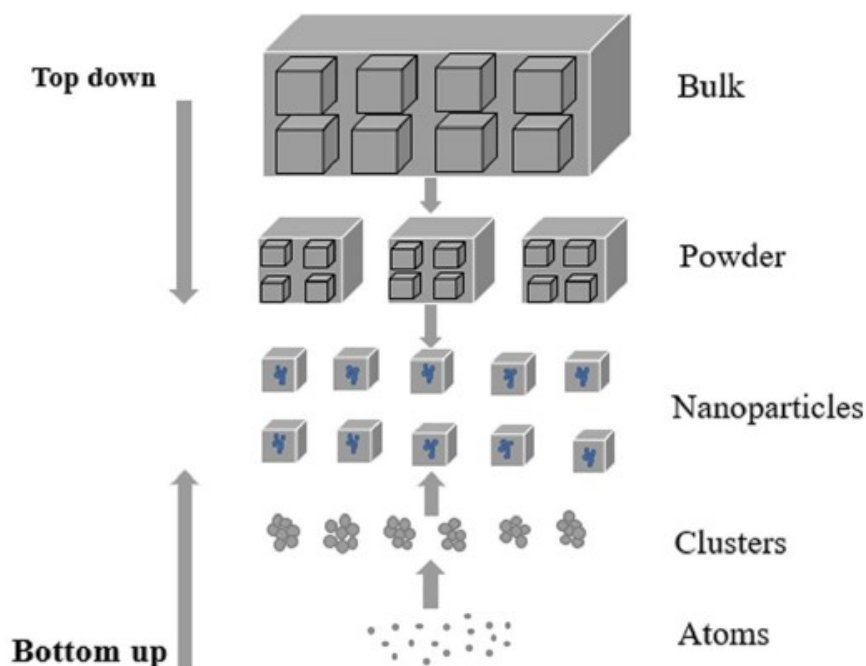


Figura 5.1: Rappresentazione approcci "top-down" e "bottom-up" per la produzione delle nanoparticelle[82]

Le sintesi in fase liquida comprendono il metodo di precipitazione o co-precipitazione, i metodi colloidali, il trattamento sol-gel, il metodo delle mini- e microemulsioni acqua-olio, la sintesi solvotermale, che prende in considerazione anche la sintesi idrotermale e il metodo dei polioli[31].

Negli ultimi anni però, in questo contesto, stanno suscitando rilevante interesse i metodi di sintesi *wet chemistry*, ovvero basati su soluzioni/sospensioni che presentano determinate caratteristiche ben precise, ossia, sono processi svolti in soluzione o sospensione, con temperature e pressioni relativamente basse, economici, versatili, semplici e facilmente scalabili[81,83,84].

Nella produzione delle nanoparticelle è fondamentale il controllo dimensionale. A tal proposito, la maggior parte dei processi fisici spesso non garantiscono un controllo dimensionale adeguato e, inoltre, sono piuttosto costosi poiché richiedono una strumentazione complessa e non sono adatti alla produzione su larga scala[85].

La sintesi chimica invece è la più diffusa perché permette la produzione di nanoparticelle con pochi difetti e con composizione chimica omogenea[86]. Tra tutti i processi sopracitati, gli approcci di *wet chemistry* permettono la produzione di nanomateriali con un controllo preciso delle loro proprietà morfologiche, strutturali e chimiche in modo da poter controllare le varie proprietà funzionali associate (ottiche, elettriche, catalitiche, magnetiche)[83].

Recentemente, diversi studi vertono sulla produzione di processi più sostenibili, economici e che producano sottoprodotti meno tossici. A tal proposito, sono stati sviluppati metodi biogenici, che vertono sulla produzione di nanoparticelle prevedendo l'utilizzo di organismi viventi (come microrganismi e piante) o i loro estratti, nel processo di produzione[87].

Nel presente lavoro di tesi sono state sfruttate due tipologie di sintesi chimica in fase liquida: la sintesi idrotermale e la sintesi a riflusso biogenica, in cui la produzione di nanoparticelle è supportata da estratti di microalghe, in modo da rendere la sintesi più ecosostenibile.

4.1 Sintesi Idrotermale

Si tratta di una sintesi solvotermale in cui il solvente è l'acqua e avviene in temperature solitamente superiori ai 100°C e pressioni maggiori di 1 atm[88]. Comporta il riscaldamento della soluzione in un recipiente sigillato, un'autoclave o una bomba idrotermale, che permette la formazione di una pressione autogena, superiore alla pressione atmosferica poiché la temperatura supera il punto di ebollizione del solvente, ma non può operare a causa delle condizioni chiuse.

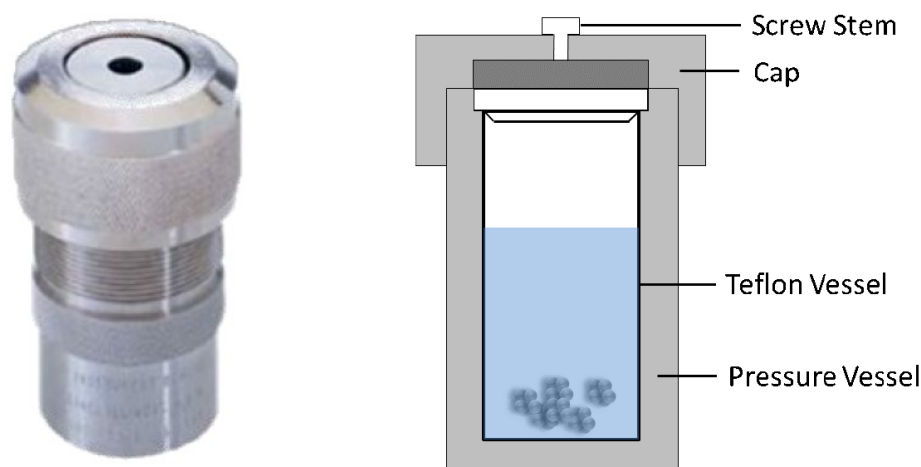


Figura 4.2: Schema di una bomba idrotermale[89]

L'aumento contestuale di temperatura e pressione provoca una variazione di alcune proprietà del solvente, ossia, densità, prodotto ionico, viscosità e costante dielettrica (vedi Figura 4.3). Al punto critico (374°C, 218 atm) scompare la differenza tra liquido e gas poiché le densità di entrambe le fasi risultano molto vicine. Un fluido che si trova in condizioni di pressione e temperatura superiori al punto critico viene chiamato fluido supercritico. In queste condizioni il prodotto ionico cresce, la costante dielettrica dell'acqua diminuisce drasticamente e, in condizioni supercritiche, si avvicina a quella dei solventi non polari, causando un aumento della solubilità dei precursori non polari. La viscosità diminuisce favorendo un incremento della mobilità di molecole e ioni. 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. Generalmente, nelle reazioni di sintesi idrotermale, 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 (come quelle adottate in questa tesi), dove si sfruttano la maggiore reattività e la maggiore solubilità dei precursori senza portare l'acqua allo stato supercritico.

Le variazioni delle proprietà dell'acqua portano 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[90–92].

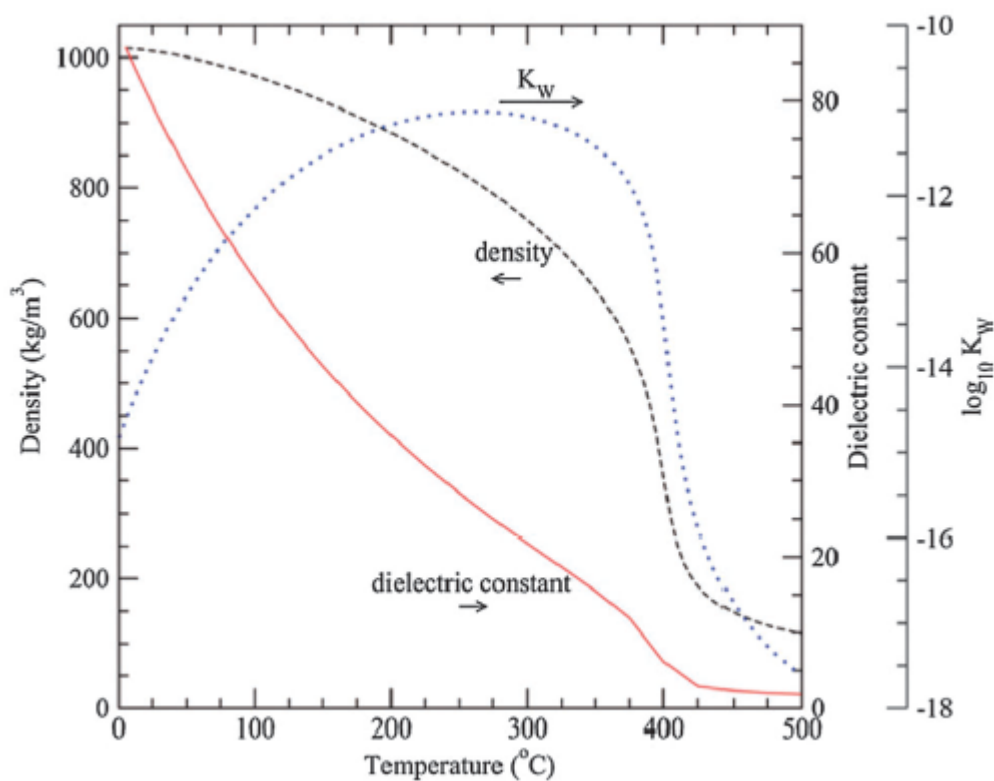


Figura 4.3: Variazione di densità, prodotto ionico (K_w) e costante dielettrica dell'acqua a 30 Mpa, in funzione della temperatura[92]

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[92–94].

Questo approccio è uno dei più importanti per ottenere strutture cristalline senza il raggiungimento di condizioni estreme: utilizzando temperature nell'intervallo 400-600°C si promuove la formazione di cristalli. A tal proposito, la produzione di quest'ultimi, con l'approccio idrotermale, può essere osservata a temperature molto più basse e questo è uno dei vantaggi principali di questa metodologia di sintesi. In più, questa modalità di sintesi permette di regolare le dimensioni delle particelle prodotte modulando la temperatura del trattamento e il rapporto tra i reagenti[29,95,96]. Tra i vantaggi principali di questa metodologia di sintesi troviamo anche le alte rese ottenute e il fatto che il processo potrebbe essere facilmente ottimizzato per un eventuale scale-up, in quanto grandi quantitativi di prodotto possono essere facilmente preparati con un'elevata economia degli atomi. Ovviamente, l'approccio in questione presenta degli svantaggi da tenere in considerazione tra cui il fatto che non c'è la possibilità di controllare direttamente la crescita dei materiali, e di separare dal solvente il prodotto di reazione[97].

4.2 Sintesi Biogenica

Negli ultimi anni gli studi si stanno focalizzando sullo sviluppo di metodi di sintesi di nanoparticelle che soddisfino i criteri della *Green Chemistry*[20], in modo da evitare o ridurre l'utilizzo di sostanze tossiche utilizzando preferibilmente risorse naturali e rinnovabili. Questi nuovi approcci, inoltre, puntano in particolar modo 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, in quest'ottica, è un'ottima soluzione essendo sicura, semplice, sostenibile, economicamente vantaggiosa ed ecologica[87].

La sintesi biogenica prevede l'utilizzo di enzimi, microrganismi o estratti di piante per ridurre e stabilizzare le nanoparticelle; inoltre, fungono da “*green scaffold*” facilitando la formazione di nanoparticelle inorganiche con morfologie diverse. La biosintesi di nanomateriali inorganici può avvenire per due diverse vie: per via intracellulare e per via extracellulare[21,78].

La via intracellulare si basa su meccanismi metabolici probabilmente responsabili della sintesi, come la fotosintesi, la respirazione e la fissazione dell'azoto. Nella via intracellulare, si ipotizza che i substrati arrivino all'interno delle cellule. Gli agenti riducenti ipotizzabili sono il NADPH o la reduttasi NADPH-dipendente nelle fasi di generazione dell'energia della fotosintesi attraverso il sistema di trasporto degli elettroni, o il sistema di trasporto degli elettroni respiratori nelle membrane dei tilacoidi o nella parete cellulare[98].

Diversamente, la via extracellulare è supportata dagli essudati del metabolismo cellulare, che comprendono metaboliti, ioni, pigmenti, diverse proteine (enzimi), prodotti microbici (ormoni, antiossidanti) e lipidi[98].

Come detto precedentemente la sintesi biogenica sfrutta l'utilizzo di microrganismi, enzimi e estratti di piante per la produzione di nanomateriali e diversi studi concordano con il fatto che le alghe sembrano essere tra i migliori candidati nella produzione di nanomateriali[99,100]. Le alghe sono un gruppo di organismi fotosintetici, unicellulari o multicellulari, e possono essere distinte due classi: le microalghe e macroalghe, in base alle loro dimensioni.

Esse sono economiche, facili da coltivare, abbondanti in natura e, a differenza di batteri e funghi (ad eccezione di alcuni ceppi), non producono tossine. Inoltre, si è osservato che le nanoparticelle prodotte dalle alghe sono più stabili e la sintesi è più veloce rispetto ad altri microrganismi[101]. Le sintesi solitamente avvengono mediante l'utilizzo di estratti di alghe contenenti 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[98].

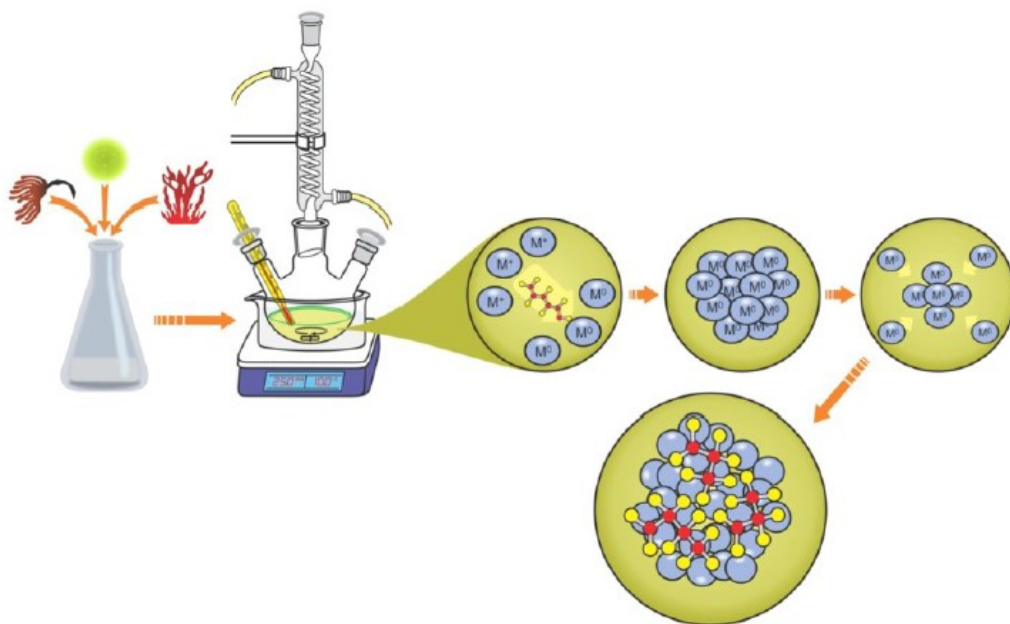


Figura 4.4: Processo di formazione di nanoparticelle mediante estratto algale[98]

La sintesi biogenica consente di condurre la sintesi a bassi valori di pressione e a basse temperature, in ambiente acquoso e permette l'utilizzo di agenti riducenti e stabilizzanti di origine naturale, differenti dai reagenti utilizzati nelle procedure chimiche che spesso vengono considerati tossici o dannosi per l'ambiente[102].

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[87]. Inoltre, spesso è difficile individuare l'agente riducente e stabilizzante specifico, e questo rende il processo poco riproducibile, limitandone lo scale-up.

Facendo riferimento alla letteratura, diversi studi trattano della produzione di nanoparticelle metalliche (Au, Ag, Pt, Pd) mediante sintesi biogenica e spiegano in maniera esaustiva il meccanismo di sintesi, procede mediante una riduzione chimica dei sali metallici mediata da sostanze riducenti presenti nell'agente biogenico. Invece, per quanto riguarda il meccanismo di sintesi degli ossidi metallici e dei calcogenuri (ad esempio, ZnO , Cu_xO , Cu_xS ($x = 1, 2$), Fe_xO_y) non è ancora stato chiarito, ma è stata appurata l'azione di template ("scaffolding") da

parte dell'agente biogeno. Un possibile meccanismo è stato teorizzato da Karnan et al. in cui hanno sintetizzato nanoparticelle di ZnO utilizzando un estratto di buccia di rambutan. Gli autori hanno confermato che i componenti fenolici dell'estratto agiscono come agenti leganti a pH 5-7. I gruppi idrossilici aromatici presenti nell'acido ellagico polifenolico coordinano gli ioni Zn^{2+} , formando un sistema complesso Zn-ellagato stabile. Questo sistema subisce poi una decomposizione diretta a 450 °C che porta alla formazione di nanoparticelle di ZnO[103](Figura 2.1).

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 a partire da mediante l'utilizzo dell'estratto acquoso di *Sargassum muticum*, una macroalga marina bruna[104]. Riguardo alla biosintesi del solfuro di zinco sono stati testati diversi estratti di piante, tra cui l'estratto della pianta *Ficus Johannis*[105].

4.2.1 Nannochloropsis gaditana

In questo lavoro di tesi, come agente biogenico è stata scelta la microalga *Nannochloropsis gaditana*, microalga unicellulare eucariotica[106] le cui dimensioni cellulari vanno da 2-3 μm . La maggior parte del suo volume è occupata dal cloroplasto[107]. Appartiene alla classe delle *Eustigmatophyceae*, del gruppo *Heterokonta*, un gruppo che include le diatomee e le alghe marroni[98]. Questi organismi presentano un cloroplasto ricoperto da quattro membrane, originato da un evento secondario endosimbiotico in cui una cellula ospite ha fagocitato un antenato unicellulare di alga rossa, fornendo loro una storia evolutiva distinta da quella delle piante e delle alghe verdi (figura 4.6).

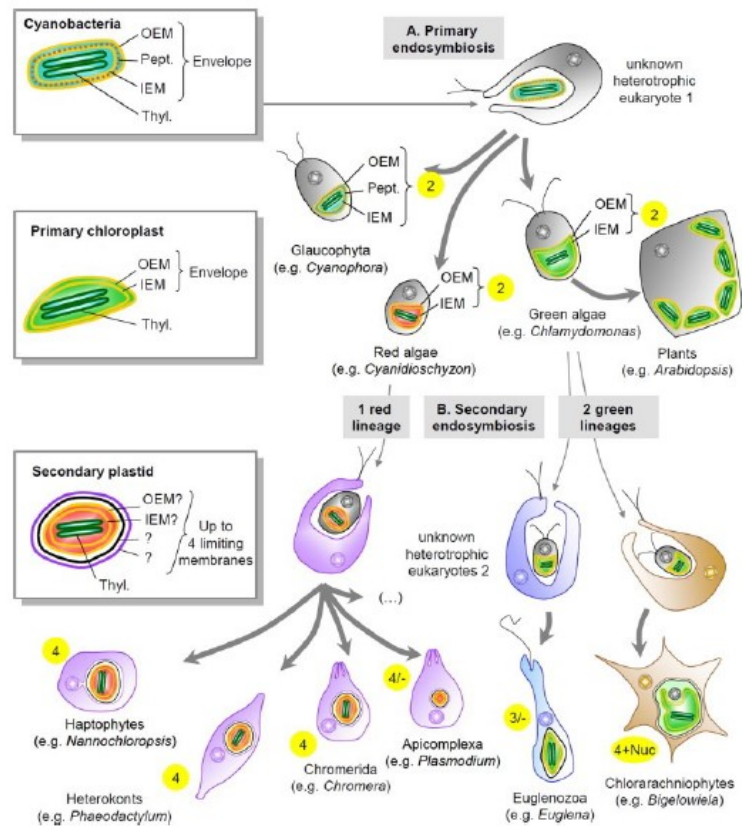


Figura 4.6: Rappresentazione dell'evoluzione del cloroplasto

Il genere *Nannochloropsis* comprende sei specie, una delle quali cresce in acqua dolce, mentre le altre, si trovano tutte in ambiente marino[107]. Le specie di *Nannochloropsis* hanno un apparato fotosintetico peculiare, caratterizzato dalla presenza di clorofilla a, completamente privo di altre clorofille accessorie come la b o la c. Sono stati rilevati carotenoidi come la violaxantina e la vaucherixantina, e chetocarotenoidi come l'astaxantina e la cantaxantina. È inoltre, utilizzata in acquacoltura per il suo alto valore nutrizionale e il suo contenuto proteico[108], ed è anche riconosciuta come una buona fonte potenziale di acido eicosapentaenoico EPA (20:5 ω 3), uno dei principali acidi grassi omega-3 che hanno effetti positivi sulla salute umana[109].

Negli ultimi anni, la *Nannochloropsis* ha ricevuto crescente interesse per la sua potenziale applicazione nella produzione di biocarburanti, grazie alla facilità con cui accumula lipidi sotto forma di triacilgliceridi (TAG), che sono il miglior substrato per la produzione di biodiesel e al suo rapido tasso di crescita[110].

Capitolo 5

5. BIOIMAGING OTTICO

Weissleder ha definito l'*imaging* molecolare come “la caratterizzazione e misura *in vivo* di processi biologici a livello cellulare e molecolare”. A differenza dell'*imaging* diagnostico “classico”, l'*imaging* molecolare investiga le alterazioni molecolari patologiche alla base delle malattie, anziché fornire un'immagine degli effetti finali di tali alterazioni[111]. Per raggiungere quest'obiettivo sono necessarie elevate sensibilità e specificità nella rivelazione di molecole bersaglio; le modalità più pratiche di *imaging* molecolare che rispettano tali requisiti sono l'*imaging* ottico e l'*imaging* mediante l'utilizzo di radionuclidi[68], caratterizzate dalla diversa tipologia di sonde introdotte nel corpo e dal differente tipo di segnale rilevato. Nell'*imaging* ottico si utilizzano sonde fluorescenti che, interagendo con una specifica molecola bersaglio, emettono radiazione nel vicino infrarosso; nell'*imaging* mediante l'utilizzo di radionuclidi invece, si introducono nel corpo radioisotopi che vanno in contro al processo di decadimento producendo delle radiazioni γ , generate in maniera continua, che vengono rilevate[112]. Le tecniche di *imaging* che utilizzano radionuclidi sono molto sensibili e permettono di indagare il corpo interamente, anche se sono contraddistinte da una bassa risoluzione spaziale e temporale. Inoltre, queste tecniche fanno uso di composti radioattivi presentanti bassa emivita, a cui il tecnico e il paziente sono esposti. Quindi sono soggette a normative di sicurezza stringenti, a differenza dell'*imaging* ottico, in cui non sono richieste. Le tecniche più importanti che sfruttano l'utilizzo di radionuclidi includono la scintigrafia e la tomografia a emissione di positroni (PET)[68].

La tecnica più versatile per l'*imaging* ottico è invece la microscopia di fluorescenza: le sonde fluorescenti, una volta legate alle molecole di interesse, assorbono l'energia fornita da una sorgente esterna di radiazione e la riemettono ad energia minore. Per l'esplorazione di campioni biologici, sia la lunghezza d'onda eccitatrice che la lunghezza d'onda di emissione devono cadere in prossimità del NIR, tra 650 e 900 nm: intervallo di energia, nel quale sono minimi

l'assorbimento e l'auto-fluorescenza dei tessuti, mentre viene massimizzata la penetrazione della radiazione nei tessuti[68]. Bisognerebbe evitare un'eccitazione nella regione UV, in quanto causa ionizzazione, danneggiamento ai tessuti[113] ed è caratterizzata da una bassa profondità di penetrazione negli stessi. Invece, una lunghezza d'onda eccitatrice nel campo del visibile (ed in particolare intorno a 600 nm) viene assorbita da fluorofori endogeni quali l'emoglobina e molecole correlate, che causano inoltre un'eccessiva auto-fluorescenza[68]. L'eccitazione nell'infrarosso invece è caratterizzata da un'elevata profondità di penetrazione nei tessuti, ma porta a riscaldamento di questi ultimi[68].

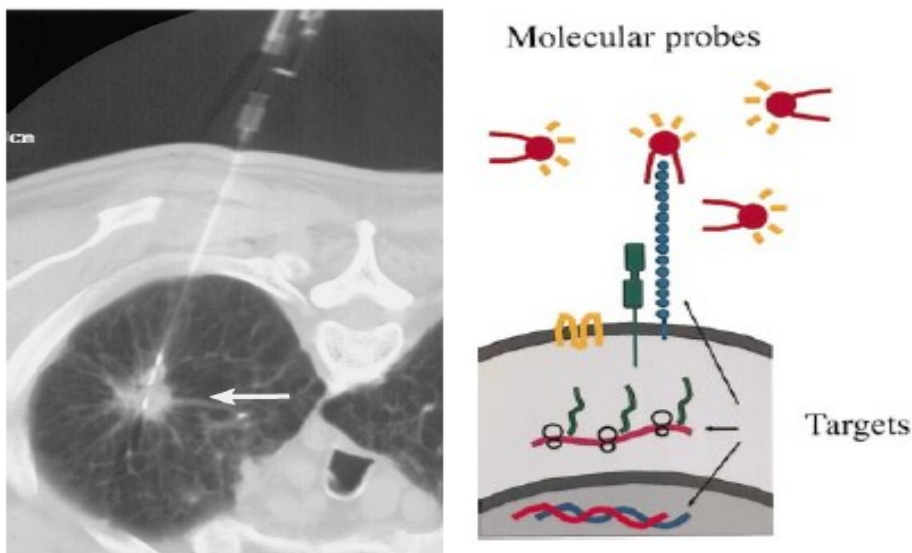


Figura 5.1: Immagine raffigurante la fluorescenza procurata da una sonda che ha come target un vettore adenovirale che codifica per un soppressore di p53 (a sinistra) e rappresentazione dei potenziali bersagli delle sonde molecolari: DNA, RNA e proteine.

Durante gli anni diverse sonde fluorescenti sono state sviluppate per il *bioimaging* ottico, ma spesso, esse necessitano di una lunghezza d'onda eccitatrice relativamente bassa, che non rientra nella regione della “finestra biologica” e che può dunque creare danni collaterali ai tessuti.

Per questo viene spesso utilizzata la microscopia di fluorescenza per l'eccitazione a due (o tre) fotoni, che si basa sull'assorbimento multi-fotone (MPA – *MultiPhoton Absorption*)[114,115]; tecnica in cui vengono impiegati dei microscopi laser ad alta potenza come sorgente eccitatrice affinché l'assorbimento multi-fotone possa avvenire con una maggiore probabilità[114]. Poiché il

fluoroforo viene eccitato per assorbimento simultaneo di due o tre fotoni, la lunghezza d'onda eccitatrice è circa doppia o tripla rispetto a quella di assorbimento, rispettivamente, e quindi meno energetica e meno dannosa per i tessuti (figura 5.2).

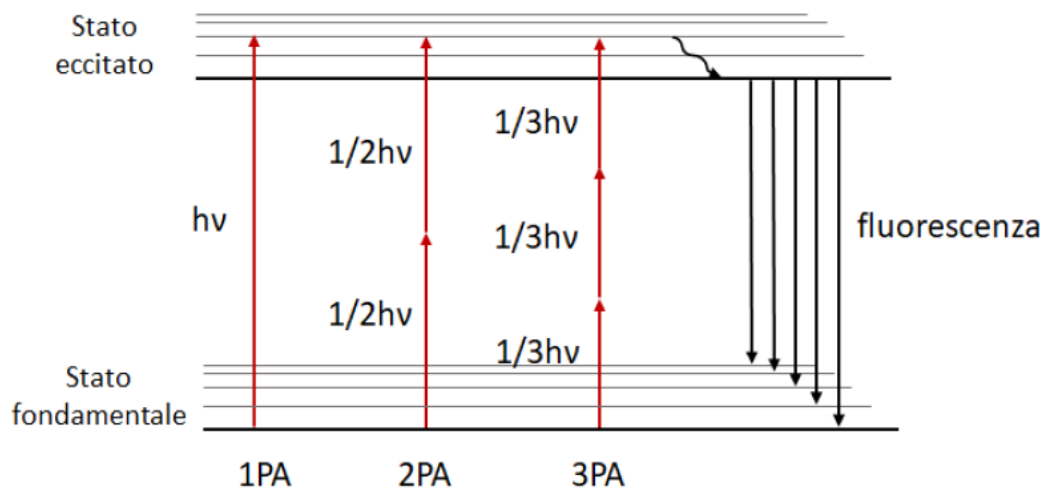


Figura 5.2: Diagramma di Jablonski della fluorescenza provocata dall'eccitazione di uno (1PA), due (2PA) e tre (3PA) fotoni.

Grazie a questa tecnica, prendendo in considerazione una sonda fluorescente che necessita di un'eccitazione nell'UV (i.e., 350 nm), è possibile utilizzare una radiazione eccitatrice rispettivamente nel NIR (i.e., 700 nm) e nell'IR (i.e., 1050 nm).

Una buona sonda fluorescente non deve soltanto emettere nel NIR, ma deve soddisfare anche altri parametri, tra cui avere elevata resa quantica, stabilità fotochimica, essere biocompatibile[116], non tossica[117] ed invisibile al sistema immunitario (proprietà *stealth*), infatti, non deve essere degradata o rigettata prima di raggiungere la molecola *target*.

Esistono tre categorie principali di marcatori fluorescenti che vengono utilizzati nel *bioimaging* ottico: i) piccoli fluorofori sintetici, di natura organica, ii) proteine geneticamente modificate e iii) nanocristalli inorganici (come i *quantum dots*)[68].

Per quanto riguarda i fluorofori organici solo due fluorofori sono approvati dalla U.S Food and Drug Administration (FDA) per uso medico: la indocianina verde (ICG) e la fluoresceina. Oggi questi due fluorofori sono principalmente utilizzati in oftalmologia, per ottenere angiogrammi retinale che richiedono alte dosi dell'agente fluorescente (500 e 40 mg, per soggetto, di fluoresceina e ICG rispettivamente). L'utilizzo di questi fluorofori comporta diversi effetti collaterali, tra cui reazioni di ipersensibilità[118,119]. Tuttavia, per l'imaging molecolare la dose del fluoroforo è minore della dose utilizzata attualmente in oftalmologia, e quindi ci si aspetta una minore tossicità.

Rispetto ai fluorofori organici, i nanocristalli inorganici sono caratterizzati da maggiore stabilità fotochimica e da ottime proprietà di fluorescenza[13] infatti, lo spettro di emissione dei *quantum dots* è costituito da bande simmetriche e strette, mentre le bande di emissione dei fluorofori organici sono generalmente più larghe ed asimmetriche[120]. Un ulteriore rilevante vantaggio dei QD (*quantum dots*) è dato dalla possibilità di modulare la lunghezza d'onda della loro emissione in base alla dimensione degli stessi[9,121]; inoltre, è possibile combinare in un'unica nanoparticella più centri emissivi, per esempio, drogando le nanoparticelle con ioni lantanidi e questo conferisce ai *quantum dots* la capacità di effettuare *imaging* multicolore[121,122].

Tipicamente però, è richiesta una funzionalizzazione dei nanocristalli inorganici con molecole idrofiliche, in modo da renderli disperdibili in tamponi fisiologici, biocompatibili e di conseguenza diminuire la tossicità nei confronti dei tessuti organici. La funzionalizzazione può, inoltre conferire specifiche proprietà di *targeting*, in modo da facilitare l'interazione con il bersaglio in questione[13,117].

Capitolo 6

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo Capitolo viene trattata inizialmente la caratterizzazione dei campioni di ZnO e ZnS, sia puri che drogati con europio, sintetizzati per via idrotermale (Sezione 6.1) e successivamente di quelli prodotti per via biogenica (Sezione 6.2). Sono stati ottenuti dati che hanno permesso la determinazione di struttura cristallina, morfologia, dimensioni e composizione massiva. Inoltre, sono stati riportati anche dati relativi alla luminescenza e in generale alle proprietà ottiche dei campioni, in modo da poterne verificare il loro potenziale utilizzo nel campo del *bio-imaging* ottico. Nella sezione 6.3 vengono infine comparati i due approcci di sintesi.

6.1 Sintesi idrotermale

L'approccio idrotermale è stato utilizzato per la produzione di polveri di ossido di zinco e solfuro di zinco mediante l'utilizzo di reattori in Teflon posti in forno a 135 °C per 24 h. Non si verificano quindi le condizioni tali affinché il solvente, in questo caso l'acqua, raggiunga il punto critico e di conseguenza si opera in condizioni subcritiche. All'interno dei contenitori in Teflon si genera tuttavia, una pressione autogena, che promuove cambi significativi alle proprietà del solvente (sezione 4.1). Infatti, l'acqua in queste condizioni subcritiche, ma di alterate temperatura e pressione, presenta maggiore acidità, minore densità e minore polarità rispetto alle condizioni normali e questo favorisce i processi di solubilizzazione e cristallizzazione[97]. Questo approccio è uno dei più importanti per ottenere strutture cristalline senza il raggiungimento di condizioni di temperatura e pressione elevate. A tal proposito, la produzione di materiali cristallini, con l'approccio idrotermale, può essere osservata a temperature più basse e questo è uno dei vantaggi principali di questa metodologia di sintesi[94,95,123–130]. Inoltre, questo approccio di sintesi permette di regolare le dimensioni delle particelle prodotte modulando la temperatura del trattamento e il rapporto tra i reagenti[94,95,129].

Dalle tabelle sottostanti (Tabella 6.1 e 6.2), in cui sono elencati tutti i campioni sintetizzati mediante questo metodo, a 135°C per 24 h. È possibile notare l'ottenimento di rese molto alte, anche se è possibile notare la presenza di qualche eccezione, tra cui i campioni di ossido di zinco sintetizzati mediante rapporto molare tra i reagenti di 1/1. Quindi, il processo potrebbe essere ottimizzato per un eventuale scale-up, in quanto grandi quantitativi di prodotto possono essere facilmente preparati con un'elevata economia degli atomi.

Nome del campione	Zn ²⁺ / agente precipitante (mol/mol)	Resa
ZnO puro	1/1 (ZnAc/NaOH)	19%
ZnO:Eu 1%	1/1 (ZnAc/NaOH)	12%
ZnO:Eu 2%	1/1 (ZnAc/NaOH)	24%
ZnO:Eu 3%	1/1 (ZnAc/NaOH)	23%
ZnO puro	1/4 (ZnAc/NaOH)	84%
ZnO:Eu 1%	1/4 (ZnAc/NaOH)	87%
ZnO:Eu 2%	1/4 (ZnAc/NaOH)	89%
ZnO:Eu 3%	1/4 (ZnAc/NaOH)	89%
ZnO puro	1/1 (ZnAcac/C ₂ H ₂ O ₄)	94%
ZnO:Eu 1%	1/1 (ZnAcac/C ₂ H ₂ O ₄)	92%
ZnO:Eu 2%	1/1 (ZnAcac/C ₂ H ₂ O ₄)	91%
ZnO:Eu 3%	1/1 (ZnAcac/C ₂ H ₂ O ₄)	100%

Nome del campione	Zn/S (mol/mol)	Resa
ZnS puro	1/1 (ZnAc/Na ₂ S)	85%
ZnS:Eu 1%	1/1 (ZnAc/Na ₂ S)	82%
ZnS:Eu 2%	1/1 (ZnAc/Na ₂ S)	46%
ZnS:Eu 3%	1/1 (ZnAc/Na ₂ S)	76%
ZnS puro	1/1,6 (ZnAc/Na ₂ S)	78%
ZnS:Eu 1%	1/1,6 (ZnAc/Na ₂ S)	77%
ZnS:Eu 2%	1/1,6 (ZnAc/Na ₂ S)	92%
ZnS:Eu 3%	1/1,6 (ZnAc/Na ₂ S)	82%
ZnS puro	1/2 (ZnAc/Na ₂ S)	75%
ZnS:Eu 1%	1/2 (ZnAc/Na ₂ S)	82%
ZnS:Eu 2%	1/2 (ZnAc/Na ₂ S)	57%
ZnS:Eu 3%	1/2 (ZnAc/Na ₂ S)	61%

Tabella 6.1 e 6.2: Elenco dei campioni di solfuro di zinco (destra) e ossido di zinco (sinistra) ottenuti mediante approccio idrotermale con rispettive rese

6.1.1 Solfuro di zinco

Come già riportato, il solfuro di zinco è un materiale interessante grazie alle sue proprietà che gli permettono di essere applicato in diversi ambiti applicativi. In questo lavoro di tesi sono state sintetizzate nanoparticelle di solfuro di zinco tramite approccio idrotermale mediante l'utilizzo di solfuro di sodio (Na₂S) e zinco acetato diidrato ((CH₃COO)₂Zn · 2 H₂O) a diversi rapporti molari. Inoltre le nanoparticelle di solfuro di zinco possono essere drogate con centri otticamente attivi, come gli ioni lantanidi, che permettono loro l'acquisizione di nuove proprietà ottiche[131] che le rendono utilizzabili in vari campi applicativi. In

questo caso le nanoparticelle di solfuro di zinco sono state drogate con ioni Eu^{3+} , mediante l'utilizzo di europio nitrato pentaidrato ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), al 1%, 2% e 3% at. rispetto alle moli del precursore di zinco usato nella reazione.

Solfuro di zinco puro

Le prime caratterizzazioni effettuate sui campioni di ZnS non drogato riguardano la struttura cristallina, la morfologia e le dimensioni delle nanoparticelle ottenute. La struttura cristallina dei campioni di solfuro di zinco è stata analizzata mediante analisi *PXRD* (*Powder X-Ray Diffraction*); il diffrattogramma del campione di solfuro di zinco puro con rapporto molare tra precursore di Zn e Na_2S di 1/2 è stato riportato in figura 6.1 con la relativa indicizzazione dei riflessi mediante l'attribuzione dei corrispondenti indici di Miller. L'analisi *PXRD* è stata svolta per tutti i campioni ed è risultato che tutti presentano diffrattogrammi in cui è possibile osservare i riflessi caratteristici della sfalerite (cod:1100043, gruppo spaziale $F-43m$ (216)), ovvero il polimorfo più stabile dello ZnS. Quest'osservazione è indice della riproducibilità del metodo di sintesi impiegato. Ad ogni modo, i prodotti non si presentano come totalmente cristallini; infatti, come è possibile osservare anche dalla figura sottostante, è presente una leggera curvatura nella parte inferiore del diffrattogramma, indice della presenza di una percentuale di fase amorfa all'interno del campione in questione. Inoltre, tramite una procedura di *Search and Match* sono stati analizzati i riflessi estranei alla fase cristallina sfalerite ed è stato evidenziato che tutti i campioni di solfuro di zinco non drogati presentano un riflesso caratteristico della struttura cristallina wurtzite (wurtzite cod:9000085, gruppo spaziale $P 6_3mc$ (186)) intorno ai $43^\circ 2\theta$ (Figura 7.1), tranne che per il campione sintetizzato con rapporto molare $\text{Zn}^{2+}/\text{Na}_2\text{S}$ pari a 1/1,6.

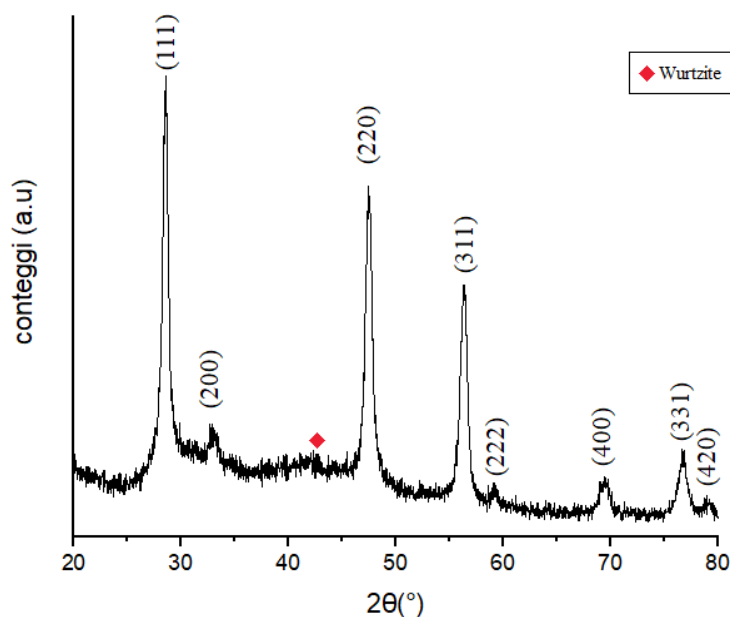


Figura 6.1: Diffratogramma di ZnS puro con rapporto molare tra i reagenti di 1/2

Le dimensioni medie dei cristalliti sono state calcolate mediante la formula di Scherrer prendendo in considerazione i parametri relativi al riflesso (111) e si è verificato che variano in base ai diversi rapporti molari tra i reagenti utilizzati (Tabella 6.3). L'informazione sulla dimensione dei cristalliti nel pattern di diffrazione è correlata alla larghezza del riflesso, che è il risultato principale dell'insieme di due contributi indipendenti l'uno dall'altro: l'allargamento strumentale e l'allargamento intrinseco dovuto al campione[131]. Gli effetti strumentali dipendono dalle componenti ottiche dello strumento in questione, dalle fenditure in uso e dal rivelatore. Invece per quanto riguarda gli effetti dovuti al campione, essi dipendono in modo inversamente proporzionale dalle dimensioni medie e in modo direttamente proporzionale dal *microstrain* (variazione dei parametri reticolari nel campione, a causa di una distorsione locale dei piani reticolari) dei cristalliti, dato da difetti del reticolo cristallino[131,132].

Osservando i risultati ottenuti, riportati nella tabella sottostante (Tabella 6.3), è possibile affermare che i cristalliti presentano dimensione variabile nell'intervallo 7-19 nm e che è presente una correlazione tra dimensione dei cristalliti e Na_2S utilizzato nelle varie sintesi. Infatti, risulta che la dimensione dei cristalliti aumenta con l'aumento del rapporto molare $\text{Na}_2\text{S}/\text{Zn}$.

Campione	Precursore Zn²⁺/Na₂S (mol/mol)	Dimensione dei cristalliti (nm)
ZnS puro	1/1	7
ZnS puro	1/1,6	15
ZnS puro	1/2	19

Tabella 6.3: Dimensione dei cristalliti, calcolata mediante equazione di Scherrer, dei vari campioni ottenuti mediante diversi rapporti molari dei reagenti

Dimensione e morfologia delle particelle sono state valutate mediante analisi TEM e SEM. Le dimensioni sono state ottenute dalle immagini acquisite dalle analisi TEM misurando il diametro di Feret (d_F), tramite il software ImageJ, per ogni particella raffigurata all'interno delle immagini acquisite. Dopodiché è stata effettuata la media dei valori dei diametri di Feret ottenuti, in modo da ottenere una stima della dimensione delle particelle in questione. Inoltre, per ogni campione è stato calcolato l'indice di polidispersione (PDI) ossia una misura dell'uniformità di distribuzione delle nanoparticelle, calcolato come rapporto tra la deviazione standard e il diametro di Feret medio delle nanoparticelle in questione. Dalla tabella 6.4 si può notare come le dimensioni delle nanoparticelle siano direttamente proporzionali al rapporto molare Na₂S/Zn impiegato nella sintesi, in accordo con la tendenza relativa alle dimensioni dei cristalliti (Tabella 6.3).

Campione	Precursore Zn²⁺ /Na₂S (mol/mol)	Media diametri di Feret (nm)	Deviazione standard (nm)	PDI
ZnS puro	1/1	10	2,9	0,3
ZnS puro	1/1,6	19	4,5	0,2
ZnS puro	1/2	33	7,0	0,2

Tabella 6.4: Dati ricavati da analisi TEM dei campioni di ZnS puri

Quindi è possibile affermare che un maggior quantitativo di Na₂S utilizzato nella sintesi provochi un aumento delle dimensioni dei cristalliti e di conseguenza delle dimensioni delle nanoparticelle. Per quanto riguarda i campioni di ZnS puri con rapporti molari 1/1 e 1/1,6 si può notare che le dimensioni medie delle nanoparticelle mostrano un andamento analogo a quelle dei cristalliti, stimate mediante analisi PXRD. Da questo è possibile dedurre che le nanoparticelle in questione sono formate da un singolo dominio di *scattering* coerente[62,133]. Inoltre, è interessante evidenziare che le ridotte dimensioni delle nanoparticelle vengono ottenute senza l'ausilio di tensioattivi e/o leganti, solitamente utilizzati per limitare la crescita delle nanoparticelle. Questo risultato, considerando anche l'alta riproducibilità, l'utilizzo dell'acqua come solvente e la buona resa, rappresenta un ulteriore vantaggio dell'approccio idrotermale nel campo della sintesi di materiali inorganici nanostrutturati. Infine, il basso indice di polidispersione (i.e. 0,2-0,3) conferma le potenzialità dell'approccio idrotermale nella sintesi di nanoparticelle inorganiche monodisperse. Dall'immagine sottostante (Fig 6.2, 6.3 e 6.4) si evidenziano come le nanoparticelle di tutti i campioni presentino una forma prevalentemente sferica e siano morfologicamente indipendenti tra loro.

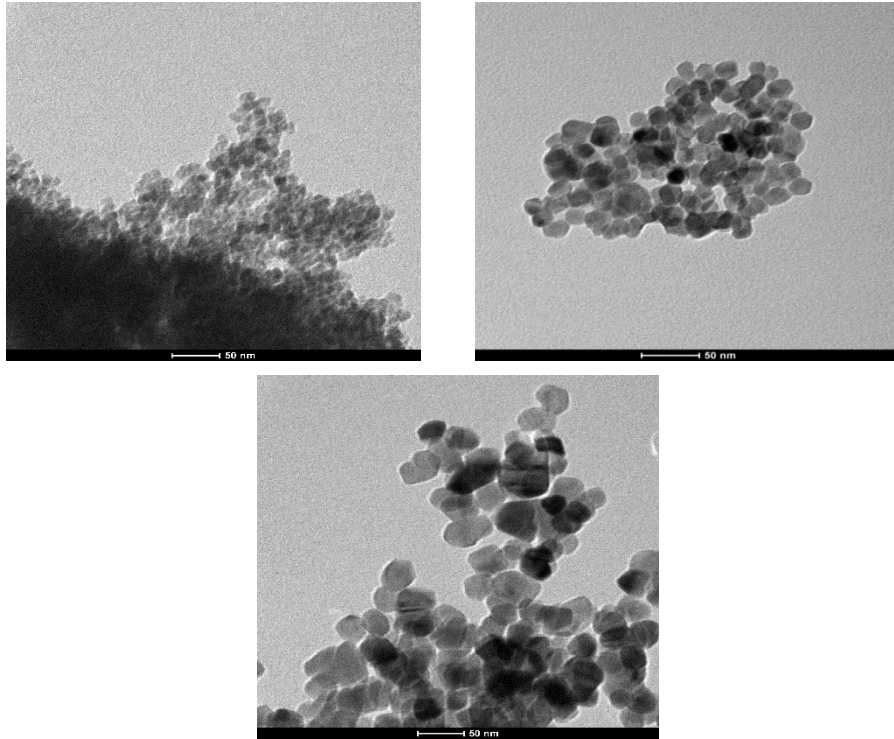


Figura 6.2, 6.3 e 6.4: Immagini TEM dei campioni ZnS puro 1/1 (in alto a sx), ZnS puro 1/1,6 (in alto a dx) e di ZnS puro 1/2 (in basso).

Solfuro di zinco drogato con europio

I campioni di ZnS drogati al 1%, 2% e 3% at. rispetto alle moli del precursore di zinco, sono stati sottoposti ad analisi PXRD in modo da verificare eventuali cambiamenti della struttura cristallina della sfalerite e/o delle dimensioni dei cristalliti e per identificare la possibile presenza di eventuali specie cristalline diverse da ZnS, possibilmente spurie. Confrontando i diffrattogrammi dei campioni puri con quelli dei campioni drogati (Fig 6.5) possiamo confermare che non ci sono rilevanti variazioni nel profilo e nella posizione dei riflessi.

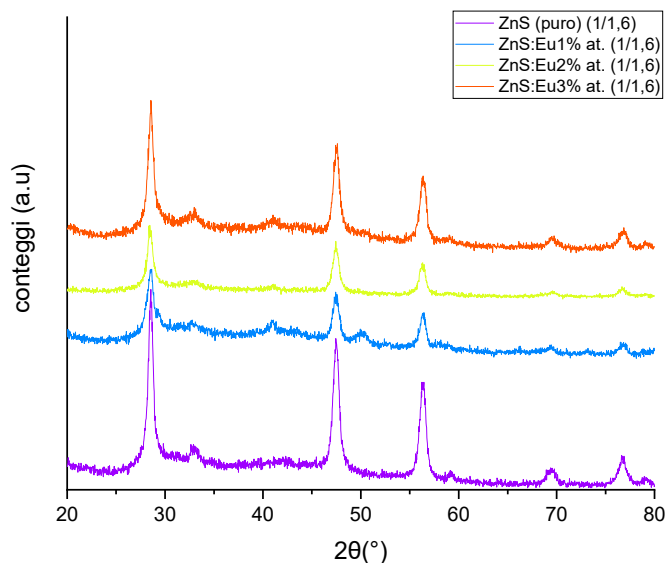


Figura 6.5: Confronto tra i diffrattogrammi della serie di campioni di solfuro di zinco sintetizzati con rapporto molare dei reagenti di 1/1,6

L'introduzione di uno ione drogante all'interno di una matrice cristallina, come drogante sostituzionale (i.e. lo ione drogante sostituisce uno ione Zn^{2+} all'interno della matrice cristallina) o interstiziale (i.e. il drogante si pone tra gli atomi costituenti il reticolo cristallino), può portare ad una variazione dei parametri di cella della matrice, in quanto va ad alterare la struttura cristallina stessa, provocando una distorsione del reticolo cristallino.[131,133]

La distorsione del reticolo dipende dal raggio ionico dello ione drogante e se consideriamo la sostituzione dello ione Zn^{2+} , con raggio ionico pari a 60 pm[62] con uno ione più grande, come Eu^{3+} presentante raggio atomico pari a 94,7 pm[62], oppure l'introduzione di uno ione in posizione interstiziale, si dovrebbe osservare un allargamento della cella cristallina, risultante in uno spostamento dei riflessi del diffrattogramma verso angoli minori, secondo la legge di Bragg.

La variazione dei parametri di cella, secondo la legge di Bragg, dovrebbe risultare in uno spostamento della posizione dei riflessi nel diffrattogramma. L'entità dello spostamento varia in base alla distorsione del reticolo; ossia tanto maggiore sarà la distorsione del reticolo tanto più rilevante sarà lo spostamento della posizione dei riflessi nel diffrattogramma[62]. Nel caso preso in considerazione, tuttavia, non per tutte le serie di campioni è stato possibile rilevare uno spostamento dei riflessi

verso angoli inferiori da parte dei campioni drogati nei confronti dei puri. La motivazione di questa problematica è data dal fatto che la diffrazione di piccoli cristalliti produce riflessi abbastanza ampi, che rendono difficoltoso il riconoscimento di uno spostamento della posizione angolare degli stessi. Soltanto per i campioni drogati con rapporto molare tra i precursori di 1/1 è stato possibile notare uno spostamento minimo dei riflessi verso angoli minori del diffrattogramma del campione puro, come è possibile notare in figura 6.6.

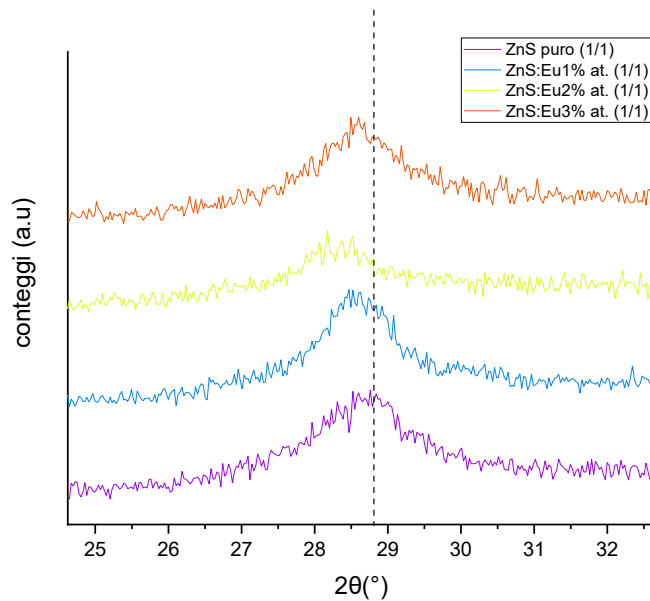


Figura 6.6: Confronto tra diffrattogrammi della serie di campioni di solfuro di zinco drogati con europio sintetizzati con rapporto molare tra i precursori di 1/1

Analogamente ai campioni di solfuro di zinco puro, le dimensioni dei cristalliti dei campioni sono state calcolate mediante l'equazione di Scherrer prendendo in considerazione il riflesso (111) dei diffrattogrammi dei campioni sintetizzati. Le dimensioni variano in base ai diversi rapporti molari dei reagenti coinvolti nella sintesi, come è possibile vedere dalla tabella sottostante (tabella 6.5). In ogni caso non è possibile osservare nessuna correlazione tra dimensioni dei cristalliti e percentuale di drogante per nessuna serie di campioni. In accordo con quanto affermato precedentemente, anche nel caso dei campioni drogati con europio, le dimensioni dei cristalliti sono direttamente proporzionali al quantitativo di solfuro di sodio utilizzato nei vari processi sintetici.

Campione	Precursore Zn²⁺/Na₂S (mol/mol)	Dimensioni dei cristalliti (nm)
ZnS:Eu 1% at.	(1/1)	8
ZnS:Eu 2% at.	(1/1)	8
ZnS:Eu 3% at.	(1/1)	8
ZnS:Eu 1% at.	(1/1,6)	11
ZnS:Eu 2% at.	(1/1,6)	14
ZnS:Eu 3% at.	(1/1,6)	14
ZnS:Eu 1% at.	(1/2)	15
ZnS:Eu 2% at.	(1/2)	14
ZnS:Eu 3% at.	(1/2)	18

Tabella 6.5: Dimensioni del cristallite dei campioni di solfuro di zinco drogati con europio.

Drogando il campione con europio è molto probabile la formazione di fasi secondarie solitamente costituite da ossido (Eu₂O₃) e idrossido di europio (Eu(OH)₃), in quanto l'europio presenta maggiore affinità nei confronti dell'ossigeno rispetto che con lo zolfo[134,135]. Anche in questo caso sono stati analizzati i diffrattogrammi dei campioni drogati con europio mediante una procedura di *Search and Match* e sono stati visualizzati riflessi estranei alla fase cristallina sfalerite in diversi campioni, attribuibili a Eu₂O₃ (COD:1011287 gruppo spaziale *Ia-3* (199)). Non sono stati invece riscontrati riflessi cristallini attribuibili a idrossido di europio. In figura 6.6, viene riportato il pattern di diffrazione di ZnS:Eu 2% at. con rapporto molare tra i precursori di 1/1, in cui è possibile visualizzare la presenza di riflessi attribuibili alla fase corrispondente a Eu₂O₃.

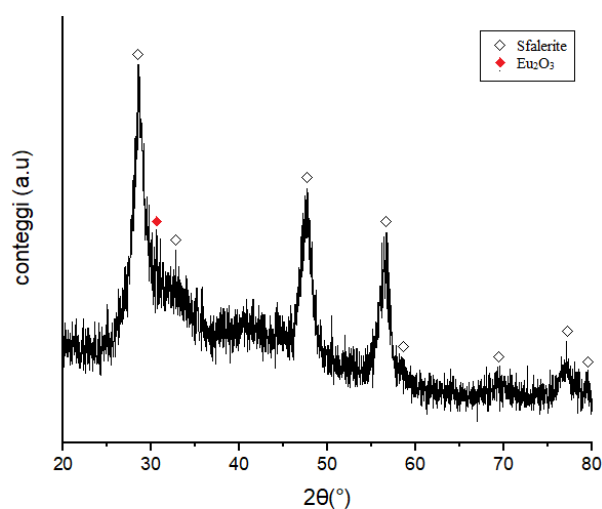


Figura 6.7: Diffratogramma del campione ZnS:Eu 2% at. con rapporto molare dei reagenti di 1/1, presentante riflessi caratteristici di Eu_2O_3

La formazione di queste specie è dovuta sia alle condizioni basiche dell'ambiente di reazione (pH circa 12) che alle dimensioni e carica maggiori dell' Eu^{3+} . Infatti, il raggio ionico di Eu^{3+} è molto maggiore rispetto al raggio ionico di Zn^{2+} . Questo rende difficoltoso l'inserimento del drogante all'interno della matrice di ZnS, essa infatti dovrebbe deformarsi in maniera energeticamente sfavorevole per poter accogliere gli ioni di Eu^{3+} [133]. Infatti l'introduzione di uno ione carico 3+ in un sito 2+ genera uno scompenso di carica che deve essere bilanciato in qualche punto del reticolo cristallino con la creazione di difetti[133].

Infine le differenze nelle proprietà chimiche tra Zn^{2+} e Eu^{3+} , non favoriscono la sostituzione dello ione Zn(II) con Eu(III): infatti gli ioni lantanidi preferiscono incorporarsi in siti con alti numeri di coordinazione ($\text{NC} = 6$ o maggiore), mentre nella struttura dell'ossido di zinco e del solfuro di zinco il sito reticolare del catione è caratterizzato da un numero di coordinazione pari a 4, inusuale per i lantanidi[133]. Quindi è nota in letteratura la difficoltà nell'incorporazione di ioni lantanidi in matrici come ZnO e ZnS.

Il calcolo della media del diametro di Feret delle particelle da immagini acquisite al TEM (Figure 6.8, 6.9 e 6.10) ci permette di affermare che la dimensione delle particelle rimane simile nonostante l'incorporazione degli ioni droganti e che le dimensioni non differiscono molto da quelle predette mediante analisi PXRD. Inoltre, anche la morfologia delle particelle dei campioni drogati è confrontabile con quella dei campioni puri. Anche per le nanoparticelle dei campioni drogati è stato calcolato il PDI, che risulta essere simile a quello calcolato per i campioni puri. Dimensioni e PDI variano leggermente tra i campioni al variare dei diversi rapporti molari tra i precursori impiegati. Anche i dati ottenuti dal TEM ci permettono di affermare la presenza di una correlazione tra rapporto molare di solfuro di sodio usato nella sintesi e dimensioni delle particelle. Infatti, si verifica un aumento delle dimensioni delle particelle all'aumentare della quantità di solfuro nella reazione. Quindi è possibile affermare che il quantitativo di solfuro di sodio influenza non soltanto le dimensioni dei cristalliti ma anche le dimensioni della particella e che, di conseguenza, può contribuire al controllo delle dimensioni delle particelle.

Campione	Precursore Zn²⁺/Na₂S (mol/mol)	Media diametri di Feret (nm)	Deviazione standard (nm)	PDI
ZnS:Eu 3% at.	1/1	11	2,9	0,3
ZnS:Eu 3% at.	1/1,6	18	6,5	0,4
ZnS:Eu 3% at.	1/2	21	5,1	0,2

Tabella 6.6: Parametri dimensionali ottenuti dall'analisi delle immagini TEM dei campioni ZnS:Eu 3% (1/1), ZnS:Eu 3% (1.1,6) e ZnS:Eu 3% (1:2)

Osservando le immagini acquisite al TEM, inoltre, possiamo evidenziare la presenza di impurità a forma di bastoncino di lunghezza variabile tra i 30 e i 90 nm, soltanto per i campioni ZnS:Eu 3% at. (1/1,6) e ZnS:Eu 3% at. (1/2). Di tali particelle asimmetriche è stato calcolato anche l'*aspect ratio*, parametro che indica il rapporto tra lunghezza e larghezza di una figura bidimensionale,

indicante la proporzione tra i due lati, che risulta essere compreso tra 4,6 e 11,8 (con media di 7,6) per il campione con rapporto molare tra Zn^{2+}/Na_2S di 1/1,6 , e compreso tra 5,1 e 19,2 (con media di 10,7) per il campione con rapporto molare tra Zn^{2+}/Na_2S di 1/2.

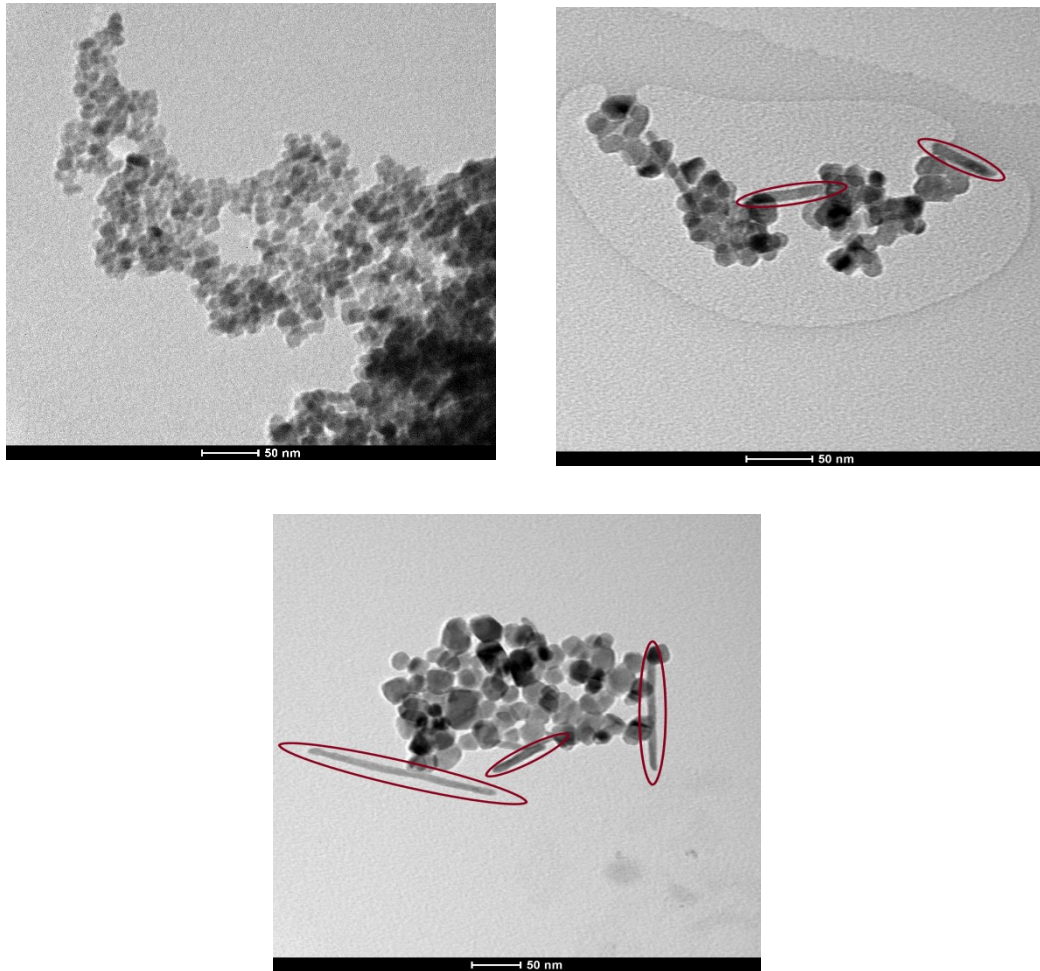


Figura 6.8, 6.9 e 6.10: Immagini TEM dei campioni ZnS:Eu 3% 1/1 (in alto a sx), ZnS:Eu 3% 1:1,6 (in alto a dx) e ZnS:Eu 3% 1/2 (in basso), ottenuti mediante approccio idrotermale. In rosso vengono evidenziate le strutture a bastoncino

I campioni drogati con europio al 3% at. rispetto alle moli di zinco sono stati sottoposti ad analisi EDX (*Energy Dispersive X-ray spectroscopy*), per verificare sia la presenza dello ione drogante nel campione che la percentuale atomica di ogni elemento presente all'interno di esso. Dallo spettro ottenuto mediante analisi EDX è possibile osservare la fluorescenza X generata da orbitali L e M dell'europio ($L\alpha$, $L\beta$ e LY tra 6-8 keV e $M\alpha$ tra 0,5 e 1,5 keV) e da orbitali L ($L\alpha$ intorno a 1 keV) e K ($K\alpha$ e $K\beta$ tra 8-10 keV) dello Zn[135]. Invece, la percentuale atomica di europio all'interno dei vari campioni analizzati è stata ottenuta

effettuando il rapporto tra la percentuale atomica di Eu e la percentuale atomica di Zn all'interno dell'intero campione, considerando il fatto che, per tutti i campioni sintetizzati, il drogaggio con europio è stato effettuato al 3% at. rispetto alle moli totali di zinco. Dai dati ottenuti è stato quindi possibile calcolare la percentuale di europio all'interno dei campioni che per i campioni ZnS:Eu 3% at. 1/1,6 e 1/2 risulta essere circa del 3,7% atomico, in buon accordo con i valori nominali; mentre notiamo una bassa percentuale di ione drogante all'interno del campione ottenuto mediante rapporto Zn^{2+}/Na_2S pari a 1/1. È possibile che, in questo caso, l'europio è andato perso durante la fase di purificazione (i.e. consecutivi lavaggi con acqua e centrifugazioni) dei campioni in questione.

Campione	Precursore Zn^{2+}/Na_2S (mol/mol)	%Zn at.	%Eu at.	%Eu/%Zn at.
ZnS:Eu 3% at.	(1/1)	13,2	0,03	0,23%
ZnS:Eu 3% at.	(1/1,6)	45,10	1,66	3,68%
ZnS:Eu 3% at.	(1/2)	44,46	1,65	3,71%

Tabella 6.7: Dati ottenuti da analisi EDX dei campioni ZnS:Eu 3% (1/1,6) e ZnS:Eu 3% (1/2)

Inoltre, tramite una funzione di *mapping* disponibile nel software collegato allo strumento, è possibile verificare la distribuzione degli atomi di europio all'interno del campione. In questo caso, come si può osservare dalle figure sottostanti (Figura 6.11 e 6.12), la distribuzione degli atomi di europio è omogenea, nelle sezioni prese in considerazione.

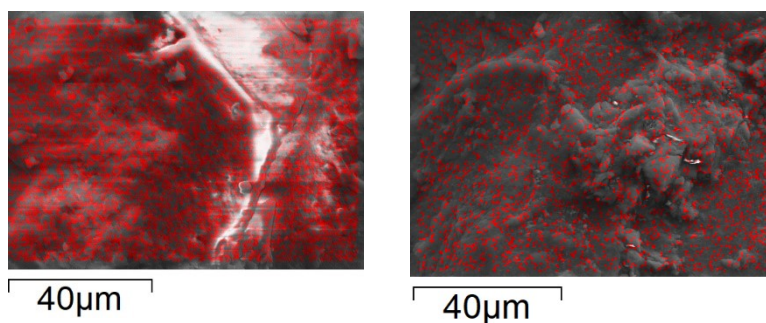


Figura 6.11 e 6.12: mappa dell'europio dei campioni ZnS:Eu 3% 1/1,6 (a sinistra) e ZnS:Eu 3% 1/2 (a destra)

La composizione elementale massiva del campione ZnS:Eu 3% at. con rapporto Zn^{2+}/Na_2S di 1/1,6 è stata verificata con maggiore accuratezza anche mediante analisi ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), la quale permette di analizzare le concentrazioni in ppb degli atomi di Zn e di Eu. I risultati ottenuti confermano la presenza dello ione drogante e la percentuale sperimentale di drogante è molto simile alla percentuale teorica.

Campione	Precursore Zn^{2+}/Na_2S (mol/mol)	% at Ln. (come $\frac{[Ln]*100}{[Zn]+[Ln]}$)		Incorporazione
		Teorica	Sperimentale	
ZnS:Eu3% at.	1/1,6	3%	3,2%	107%

Tabella 6.8: Percentuale di incorporazione di Eu all'interno del campione ZnS:Eu 3% calcolata mediante dati ottenuti da analisi ICP-MS.

6.1.2 Ossido di zinco

Come già discusso precedentemente (sezione 2.1), l'ossido di zinco è un materiale che ha acquisito notevole rilevanza tecnologica in questi ultimi anni grazie alle sue proprietà che gli permettono di essere applicato in diversi ambiti; elettronica, ottica, biomedicina e può essere utilizzato anche come materiale antimicrobico[46]. In questo lavoro di tesi vengono prodotte nanoparticelle di ossido di zinco mediante approccio idrotermale tramite l'utilizzo di zinco acetato, come precursore di ioni di Zn^{2+} e NaOH, come agente precipitante a diversi rapporti molari. In questo lavoro di tesi, inoltre verranno presi come riferimento dei campioni di ossido di zinco sintetizzati seguendo un protocollo diverso rispetto a quello appena citato e che prevede l'utilizzo di reagenti diversi, oltre a NaOH. Si tratta di acido ossalico ($C_2H_2O_4$), tetraetilammonio idrossido ($(C_2H_5)_4NOH$) e zinco acetilacetato ($C_{10}H_{14}O_4Zn$)[90]. Il tetrabuttilammonio idrossido funge da agente peptizzante e viene aggiunto alle soluzioni per favorire la dispersione delle particelle solide in essa contenute[136]; mentre lo zinco acetilacetato ($C_{10}H_{14}O_4Zn$) viene impiegato come precursore di ioni Zn^{2+} . I

campioni ottenuti tramite questo protocollo di sintesi verranno confrontati con i campioni ottenuti mediante il primo protocollo di sintesi preso in considerazione in questa sezione. Il confronto riguarderà principalmente la resa dei prodotti, incorporazione di ioni Eu^{3+} all'interno della matrice cristallina, purezza del prodotto, morfologia e dimensioni.

Ossido di zinco puro

Le analisi PXRD sono state effettuate per permettere di determinare la struttura cristallina dei campioni di ossido di zinco puri. Nei diffrattogrammi dei campioni ottenuti (figura 6.13 e 6.14), è possibile osservare i riflessi caratteristici della wurtzite (cod:9000085, gruppo spaziale $P 6_3mc(186)$). Mediante una procedura di *Search and Match* è stata verificata l'eventuale presenza di fasi secondarie. L'assenza di riflessi attribuibili alle altre due forme cristalline caratteristiche dell'ossido di zinco, ossia zinco blenda e *rock salt*[23], è indice della purezza del prodotto. Dai diffrattogrammi riportati in figura, inoltre, è possibile osservare la presenza di una piccola percentuale di fase amorfa nei campioni sintetizzati con rapporto molare tra i precursori di 1/4. Questo risultato ci permette di affermare che l'utilizzo di un quantitativo superiore di NaOH provoca la formazione di una maggiore percentuale di fase amorfa.

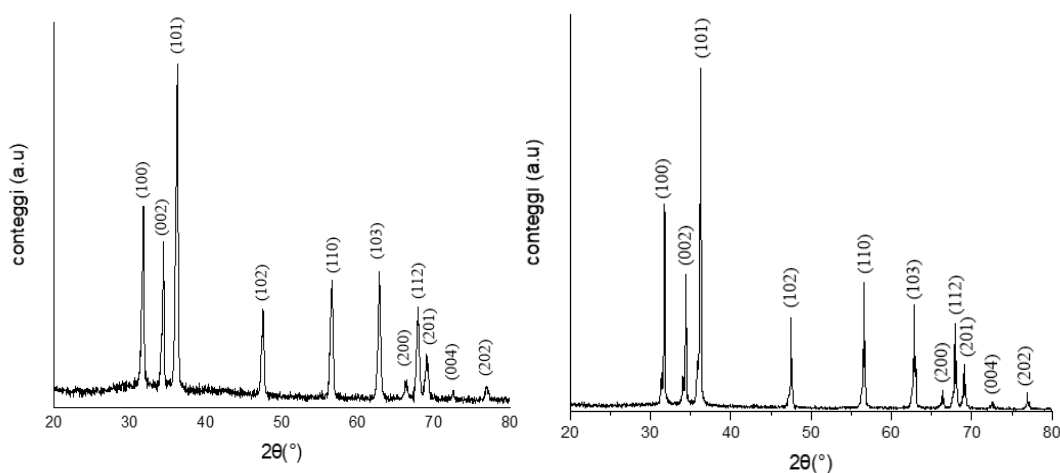


Figura 6.13 e 6.14: Diffrattogramma di ZnO puro con rapporto molare tra i reagenti di 1/4 (sinistra) e 1/1 (destra).

Anche in questo caso è stata usata la formula di Scherrer per valutare la dimensione media dei cristalliti dei campioni di ossido di zinco, prendendo come riferimento il riflesso principale della struttura cristallina wurtzite (101),

caratteristica di tutti i campioni. Sono stati ottenuti valori diversi sulla base dei diversi rapporti molari tra i reagenti utilizzati nelle varie sintesi e, analizzando i dati in tabella 6.9 è possibile affermare che maggiori quantità di NaOH provochino una diminuzione nelle dimensioni dei cristalliti.

Campione	Precursore Zn²⁺/NaOH (mol/mol)	Dimensione dei cristalliti (nm)
ZnO puro	1/1	65
ZnO puro	1/4	27

Tabella 6.9: Dimensione media dei cristalliti, calcolata mediante l'equazione di Scherrer dei campioni di ZnO puri con vari rapporti molari tra i reagenti

Le analisi TEM sono state utilizzate per la valutazione di dimensione e morfologia delle nanoparticelle. Le dimensioni sono state ottenute dalle immagini acquisite dalle analisi TEM misurando il diametro di Feret (d_F), tramite il software ImageJ, per ogni particella raffigurata all'interno delle immagini acquisite. Dopodiché è stata effettuata la media dei valori dei diametri di Feret ottenuti, in modo da ricavare una stima della dimensione delle particelle in questione. Inoltre, per ogni campione è stato calcolato l'indice di polidispersione.

Campione	Precursore Zn²⁺/NaOH (mol/mol)	Media diametri di Feret (nm)	Deviazione standard (nm)	PDI
ZnO puro	1/4	119	30	0,3

Tabella 6.10: Analisi TEM condotte sul campione di ZnO puro sintetizzato mediante rapporto Zn²⁺/NaOH di 1/4

Dalla figura sottostante (Figura 6.15) si evidenzia come le nanoparticelle di tutti i campioni presentino morfologia irregolare con dimensioni tra 64 e 187 nm.

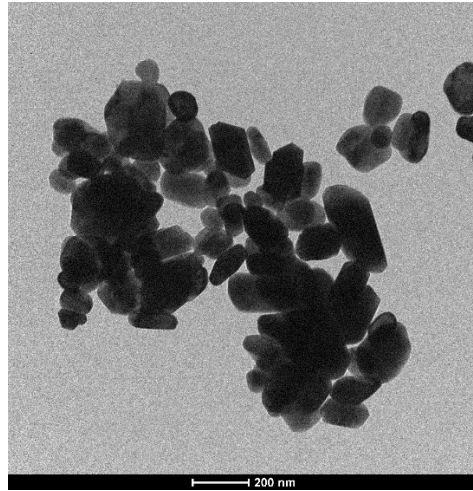


Figura 6.15: Immagine TEM del campione puro sintetizzato con rapporto molare $Zn^{2+}/NaOH$ pari a 1/4

Ossido di zinco drogato con europio

Anche i campioni di ossido di zinco drogati con Eu all'1%, 2% e 3% at. sono stati sottoposti ad analisi PXRD, in modo da valutare la possibile variazione nella dimensione dei cristalliti, causata dall'introduzione dello ione drogante e per identificare la presenza di possibili fasi cristalline diverse da ZnO. Anche in questo caso, facciamo riferimento a ossido (Eu_2O_3) e idrossido di europio ($Eu(OH)_3$). Dal confronto tra i diffrattogrammi, mostrato in figura 6.16 possiamo constatare come non si osservino variazioni nel profilo e nella posizione dei riflessi tra i diffrattogrammi di ossido di zinco puro ed i diffrattogrammi relativi ai campioni di ossido di zinco drogati con europio.

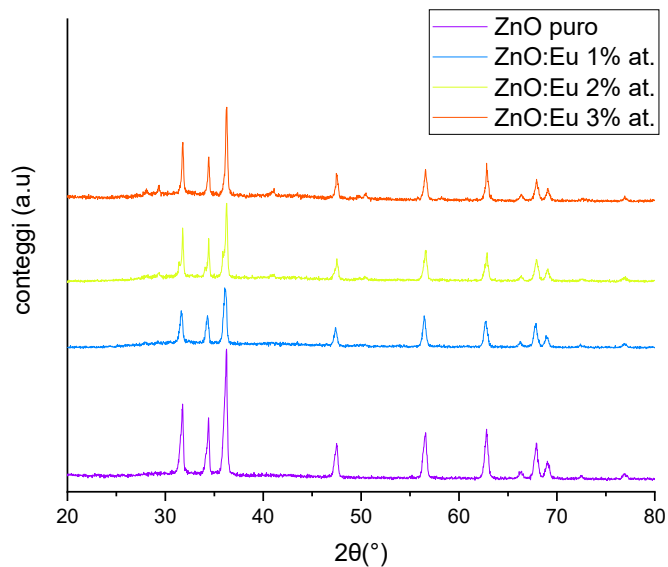


Figura 6.16: Diffratogrammi della serie di campioni sintetizzati mediante rapporto molare tra i reagenti di 1/4

Anche per i campioni di ossido di zinco non si evidenzia è presente una corrispondenza lineare tra percentuale di drogante e dimensioni dei cristalliti, e non è stato possibile rilevare uno spostamento dei riflessi verso angoli inferiori da parte dei campioni drogati. Le dimensioni dei cristalliti sono state calcolate mediante l'equazione di Scherrer sul riflesso (101) dei diffratogrammi dei campioni drogati, ed esse variano in base ai diversi rapporti molari dei reagenti coinvolti nella sintesi. In linea con i dati relativi alle dimensioni dei cristalliti dei campioni puri, anche per i campioni drogati è presente la relazione di proporzionalità inversa tra NaOH e grandezza dei cristalliti.

Campione	Precursore Zn²⁺/NaOH (mol/mol)	Dimensioni dei cristalliti (nm)
ZnO puro	1/1	65
ZnO puro	1/4	27
ZnO:Eu 1% at.	(1/1)	63
ZnO:Eu 2% at.	(1/1)	57
ZnO:Eu 3% at.	(1/1)	61
ZnO:Eu 1% at.	(1/4)	23
ZnO:Eu 2% at.	(1/4)	37
ZnO:Eu 3% at.	(1/4)	40

Tabella 6.11: Dimensioni dei cristalliti, calcolate mediante equazione di Scherrer, dei campioni di ossido di zinco puri e drogati con europio

Anche per i campioni di ossido di zinco è stata osservata la formazione di ossido e idrossido di europio, che caratterizzano le eventuali fasi secondarie. Come precedentemente affermato la formazione di queste specie è data dalla difficoltà degli ioni di Eu^{3+} , nell'inserirsi all'interno della matrice di ZnO, che dovrebbe deformarsi in maniera energeticamente sfavorevole affinché si incorporino gli ioni del drogante in questione. Per verificare la presenza di fasi secondarie è stata applicata una procedura di *Search and Match* sui diffrattogrammi di tutti i campioni drogati. Grazie a questa metodica è stato possibile affermare che i diffrattogrammi dei campioni drogati con rapporto molare dei reagenti di 1/4 sono caratterizzati dalla presenza di riflessi caratteristici dell'idrossido di europio ($\text{Eu}(\text{OH})_3$) con intensità crescente in relazione alla percentuale di ione drogante presente all'interno del campione. Invece per quanto riguarda i campioni con rapporto molare tra i reagenti di 1/1 non presentano riflessi caratteristici di ossidi o idrossidi dello ione europio. In figura 6.17 viene riportato il pattern di diffrazione dei campioni con rapporto molare tra i reagenti di 1/4, in cui è

possibile notare la presenza dei riflessi caratteristici di $\text{Eu}(\text{OH})_3$ (COD:4031476 forma spaziale $P6_3/m$ (176)).

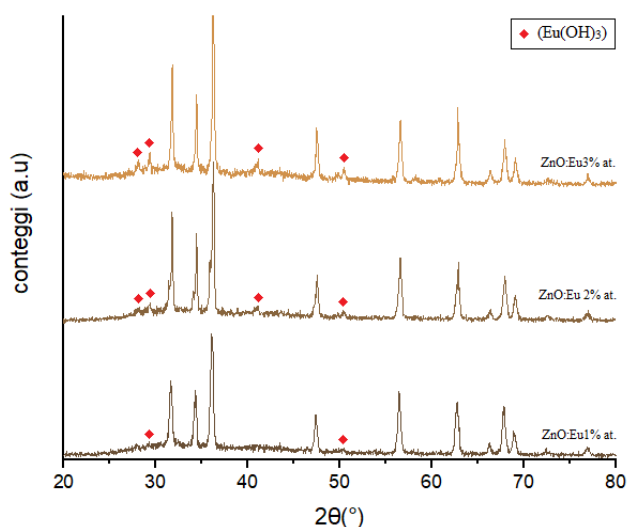


Figura 6.17: Confronto dei diffrattogrammi dei campioni con rapporto molare tra i reagenti di 1/4 drogati con europio

Il calcolo della media del diametro di Feret delle particelle da immagini acquisite al TEM ci permette di affermare che la dimensione delle particelle è molto minore rispetto alle nanoparticelle del campione puro, nonostante l'incorporazione degli ioni droganti (tabella 6.12). Inoltre, la morfologia delle particelle dei campioni drogati è confrontabile con quella dei campioni puri. Anche per le nanoparticelle dei campioni drogati è stato calcolato il PDI, che risulta essere simile a quello calcolato per i campioni puri.

Campione	Precursore $\text{Zn}^{2+}/\text{NaOH}$ (mol/mol)	Media diametri di Feret (nm)	Deviazione standard (nm)	PDI
ZnO puro	1/4	119	30	0,3
ZnO:Eu 3% at.	1/4	89	28	0,3

Tabella 6.12: Analisi TEM condotte sui campioni ottenuti con rapporto molare $\text{Zn}^{2+}/\text{NaOH}$ pari a 1/4

Dalla figura sottostante (Figura 6.18) si evidenzia come le nanoparticelle di tutti i campioni presentino una morfologia irregolare con dimensioni da 32 a 166 nm.

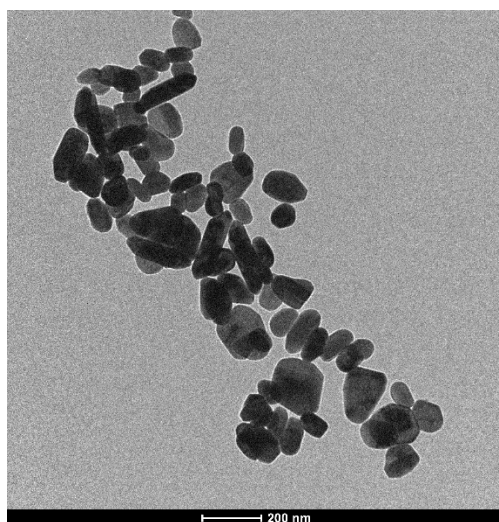


Figura 6.18: Immagine TEM del campione drogato con europio al 3% at. ottenuto mediante rapporto molare $Zn^{2+}/NaOH$ pari a 1/4

La composizione del massivo, anche per i campioni di ossido di zinco, è stata verificata mediante analisi EDX. La percentuale sperimentale dell'europio all'interno del campione viene calcolata effettuando il rapporto tra la percentuale di europio e la percentuale di zinco all'interno del campione, visto che, il drogaggio con europio è stato effettuato in percentuale atomica rispetto alle moli di zinco. In questo modo possiamo effettuare una stima dell'incorporazione dello ione Eu^{3+} all'interno del reticolo cristallino.

Campione	Precursore $Zn^{2+}/NaOH$ (mol/mol)	%Zn at.	%Eu at.	%Eu/%Zn at.
ZnO:Eu 2% at.	(1/1)	30,43	0,06	0,2%
ZnO:Eu 3% at.	(1/1)	34,09	0,04	0,1%
ZnO:Eu3% at.	(1/4)	31,02	0,54	2,2%

Tabella 6.12: Dati ottenuti da analisi EDX, per i campioni ZnO:Eu 2% at. e ZnO:Eu 3% at. ottenuti mediante rapporto molare tra i reagenti di 1/1 e ZnO:Eu 3% at. ottenuto mediante rapporto molare tra i reagenti di 1/4

Dai dati riportati in tabella 6.12 è possibile notare come lo ione europio sia presente all'interno di tutti i campioni analizzati, ma solamente per il campione con rapporto molare tra i reagenti di 1/4 la percentuale sperimentale di ione drogante è confrontabile con la percentuale teorica. Notiamo infatti percentuali sperimentali molto basse di ione drogante per i campioni con rapporto molare tra i reagenti pari a 1/1. Molto probabilmente l'eurobio è andato perso durante gli step di sintesi dei campioni in questione. Inoltre, è stata sfruttata la funzione di *mapping* disponibile nel software dello strumento, che permette l'acquisizione di immagini in cui è possibile osservare la distribuzione dell'elemento selezionato (in questo caso l'eurobio) all'interno del campione in questione. I puntini rossi raffigurati nelle figure 6.19 e 6.20 indicano gli atomi di europio all'interno dei campioni, in quelle sezioni prese in considerazione; è possibile notare che il quantitativo di atomi di europio all'interno del campione ottenuto mediante rapporto molare 1/4 è superiore rispetto al campione ottenuto mediante rapporto molare tra i reagenti di 1/1, in accordo con i dati riguardanti la percentuale sperimentale dei vari campioni.

Infine, è possibile concludere che dai dati ottenuti da analisi EDX di questi campioni, un maggior quantitativo di NaOH favorisce l'incorporazione dell' Eu^{3+} all'interno del reticolo cristallino.

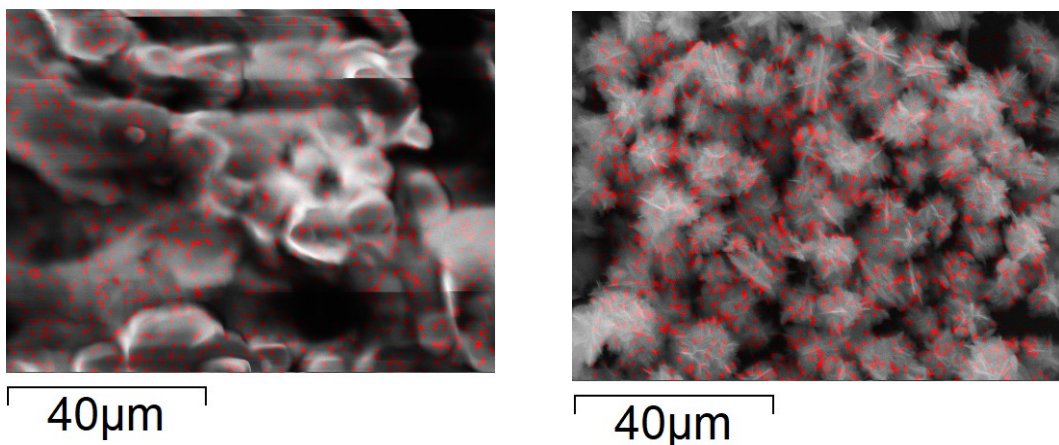


Figura 6.19 e 6.20: Mappatura degli atomi di europio dei campioni $\text{ZnO}:\text{Eu}$ 3% at. ottenuto mediante rapporto molare tra i reagenti di 1/1 e $\text{ZnO}:\text{Eu}$ 3% at. ottenuto mediante rapporto molare tra i reagenti di 1/4

Confronto tra approcci sintetici di ZnO

Come accennato in precedenza (paragrafo 6.1.2) questa sezione è dedicata al confronto tra nanoparticelle di ZnO ottenute mediante due approcci sintetici differenti: da una parte viene preso in considerazione il protocollo che prevede l'utilizzo, di zinco acetato e idrossido di sodio; dall'altra parte prendiamo in considerazione il protocollo ottimizzato da Diodati et al.[90] per la produzione di nanoparticelle di ZnO. Queste nanoparticelle sono state caratterizzate con le stesse tecniche utilizzate per la caratterizzazione delle nanoparticelle di ZnO sintetizzate mediante l'approccio sintetico sopra discusso.

Anche per questi campioni la struttura cristallina è stata determinata mediante analisi PXRD. Nel diffrattogramma del campione puro, riportato in figura 6.19 si osservano i riflessi caratteristici della wurtzite (cod:9000085, gruppo spaziale P63mc (186)) e l'assenza di riflessi attribuibili ad altre forme cristalline tipiche dell'ossido di zinco, è indice della purezza del prodotto. Confrontando il diffrattogramma raffigurato nella figura sottostante e quello dei campioni puri ottenuti con il primo approccio discusso, è possibile notare una minore percentuale di fase amorfa presente nei campioni sintetizzati mediante questa metodica di sintesi.

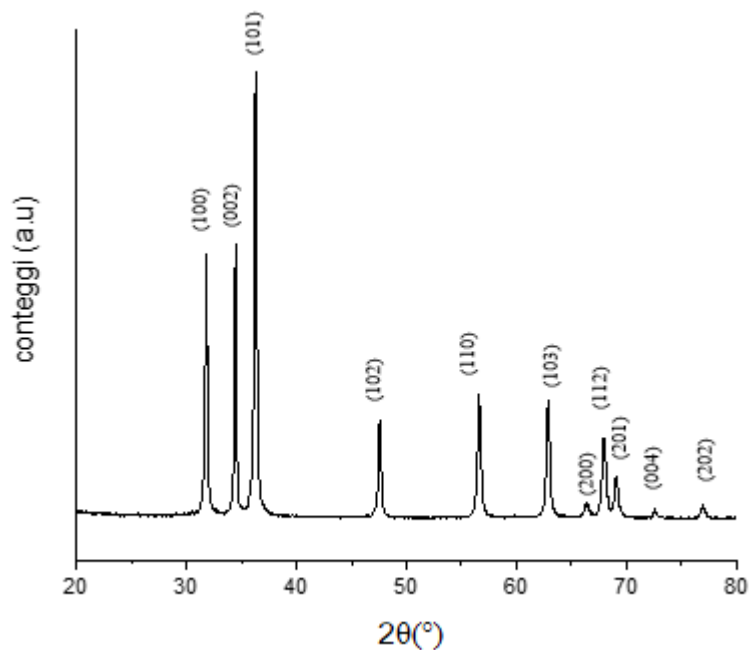


Figura 6.21: Diffrattogramma del campione di ZnO ottenuto mediante protocollo Diodati

Anche in questo caso i campioni di ossido di zinco sono stati drogati con europio al 1% ,2% e 3% at. rispetto alle moli di zinco presenti all'interno della miscela di reazione. Dai diffrattogrammi ottenuti da questi campioni è possibile notare la presenza di fasi secondarie attribuibili a idrossidi di europio ($\text{Eu}(\text{OH})_3$) e questo risultato è stato ottenuto tramite una procedura di *Search and Match*, prendendo in considerazione i riflessi tipici di tali strutture. Dalla figura sottostante (figura 6.20), raffigurante il confronto tra i diffrattogrammi dei campioni drogati con europio, è possibile notare come la percentuale di fase secondaria sia direttamente proporzionale alla percentuale di europio con cui è stato drogato il campione. Un simile risultato è stato osservato anche per i campioni drogati ottenuti mediante rapporto $\text{Zn}^{2+}/\text{NaOH}$ di 1/4 (figura 6.16).

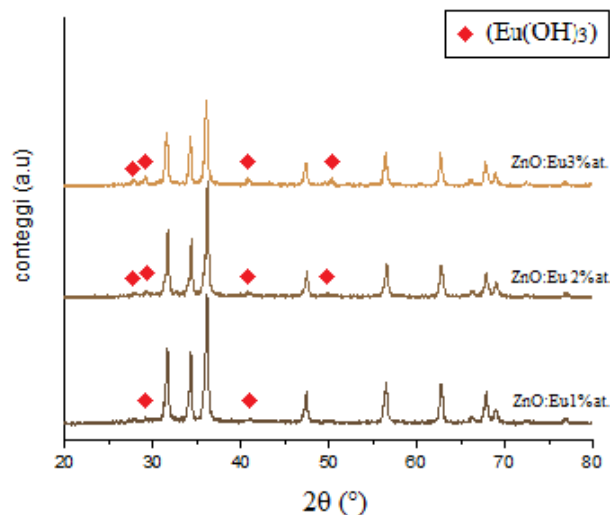


Figura 6.22: Confronto tra diffrattogrammi dei campioni drogati ottenuti mediante protocollo Diodati

Dal confronto tra i diffrattogrammi, mostrato in figura 6.22 è inoltre possibile constatare come non si osservino variazioni nel profilo e nella posizione dei riflessi tra i diffrattogrammi di ossido di zinco puro ed i diffrattogrammi relativi ai campioni di ossido di zinco drogati con europio. Questo è indice della riproducibilità dell'approccio di sintesi.

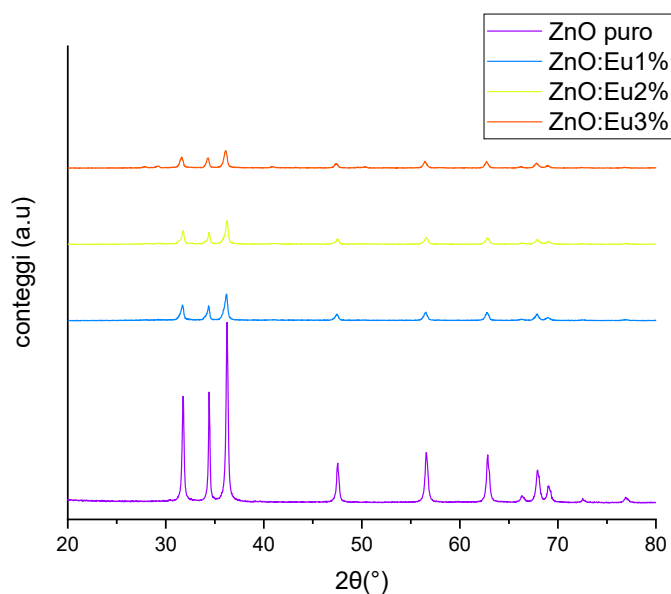


Figura 6.23: Confronto tra i diffrattogrammi dei campioni ottenuti mediante protocollo Diodati

Mediante la formula di Scherrer sono state calcolate le dimensioni dei cristalliti di tutti i campioni sintetizzati mediante questo protocollo e dalla tabella sottostante (tabella 6.13) è possibile notare la mancanza di una corrispondenza lineare tra percentuale di drogante e dimensioni dei cristalliti, considerando il fatto che, come precedentemente affermato, la dimensione dei suddetti dovrebbe aumentare in maniera direttamente proporzionale alla percentuale di drogante utilizzata per la sintesi dei vari campioni. È possibile osservare questo risultato, riportato in tabella 6.11, anche per i campioni ottenuti mediante l'approccio di sintesi discusso in precedenza. Le dimensioni dei cristalliti sono state calcolate prendendo in considerazione il riflesso (101) della forma cristallina wurtzite. Inoltre, è possibile notare che si ottengono delle dimensioni dei cristalliti comparabili con quelle ottenute per i campioni sintetizzati con rapporto molare $Zn^{2+}/NaOH$ pari a 1/4.

Campione	Precursore Zn ²⁺ / acido ossalico (mol/mol)	Dimensione del cristallite (nm)
ZnO puro	1/1	37
ZnO:Eu 1% at.	1/1	24
ZnO:Eu 2% at.	1/1	26
ZnO:Eu 3% at.	1/1	22

Tabella 6.13: Dimensioni dei cristalliti dei campioni ottenuti mediante protocollo Diodati, calcolate mediante la formula di Scherrer

Mediante analisi TEM e SEM condotte su questi campioni è stato possibile determinare la morfologia delle nanoparticelle ottenute mediante questo approccio sintetico e sia da immagini TEM che da immagini SEM è stato possibile notare classici grani di ZnO con forma a bastoncino allungata, caratteristica di questo protocollo di sintesi[90], dati dalla formazione di particelle primarie che aggregano a dare particelle secondarie di dimensioni pari a 1,5 μm .

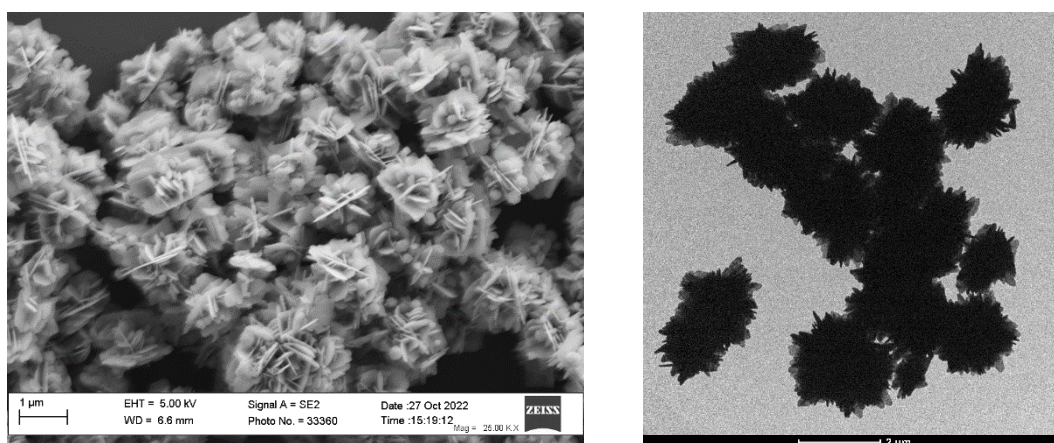


Figura 6.24 e 6.25: Immagine SEM (a sinistra) e TEM (a destra) del campione ottenuto mediante protocollo Diodati.

La composizione del massivo è stata studiata, anche per i campioni di ossido di zinco sintetizzati mediante questo approccio, mediante analisi EDX. La

percentuale sperimentale dell'eurobio all'interno del campione viene calcolata effettuando il rapporto tra la percentuale di eurobio e la percentuale di zinco all'interno del campione, dato che il drogaggio con eurobio è stato effettuato in percentuale atomica rispetto alle moli di zinco. In questo modo possiamo effettuare una stima dell'incorporazione dello ione Eu^{3+} all'interno del reticolo cristallino e verificare che il drogante non sia andato perduto durante i vari step di sintesi. Dalla tabella sottostante (tabella 6.13), è possibile affermare che la percentuale di eurobio all'interno del campione drogato al 3% at. rispetto alle moli del precursore di zinco è confrontabile con la percentuale sperimentale misurata. Per poter ottenere questo dato sono stati acquisiti spettri EDX in diversi punti del campione e poi è stata effettuata la media tra i valori relativi alle percentuali di atomi di zinco ed eurobio.

Campione	Precursore Zn^{2+}/acido ossalico (mol/mol)	%Zn at.	%Eu at.	%Eu/%Zn at.
ZnO:Eu 3% at.	(1/1)	31,76	0,69	2,2%

Tabella 6.14: Dati derivanti da analisi EDX svolta sul campione sintetizzato mediante protocollo Diodati, drogato al 3% at. con eurobio.

Inoltre, è stata sfruttata la funzione di *mapping* disponibile nel software dello strumento, che permette l'acquisizione di immagini in cui è possibile osservare la distribuzione dell'elemento selezionato (in questo caso l'eurobio) all'interno del campione in questione. I puntini rossi raffigurati nelle figure 6.26 indicano gli atomi di eurobio all'interno del campione, in quella determinata sezione presa in esame; ed è possibile notare immediatamente che gli atomi di eurobio all'interno del campione ottenuto mediante questo protocollo di sintesi sono distribuiti in maniera omogenea. Anche in questo caso i risultati estratti dall'analisi EDX per i campioni ottenuti mediante protocollo Diodati, sono simili a quelli ottenuti per quei campioni sintetizzati con rapporto molare $\text{Zn}^{2+}/\text{NaOH}$ pari a 1/4.

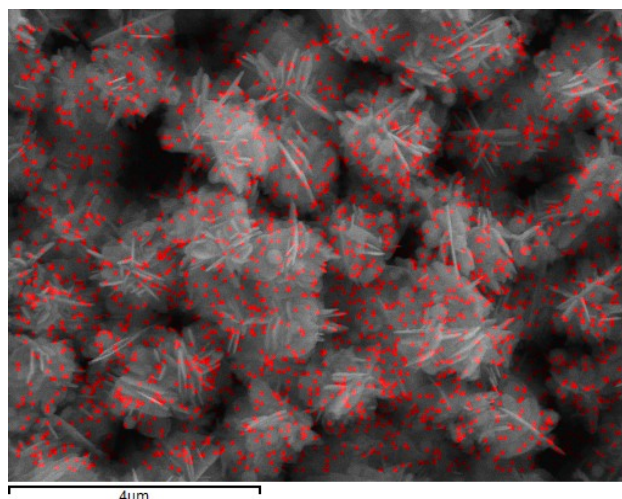


Figura 6.26: Mappa dell'europio ottenuta sul campione sintetizzato mediante protocollo Diodati drogato al 3% at.

Analisi ICP-MS sono state condotte a sostegno delle analisi EDX, per caratterizzare maggiormente la composizione elementare massiva dei campioni ZnO:Eu 1% e ZnO:Eu 3% at. sintetizzati mediante questo approccio sintetico. Grazie a questa tipologia di analisi sono state analizzate le concentrazioni in ppb degli atomi di Zn e di Eu e i risultati ottenuti confermano la presenza dello ione drogante; inoltre, come è possibile osservare dai risultati presenti in tabella (tabella 6.15) la percentuale sperimentale di drogante è molto simile alla percentuale teorica per entrambi i campioni, indice dell'efficacia dell'approccio sintetico.

Campione	Precursore Zn ²⁺ /acido ossalico (mol/mol)	% at Ln. (come $\frac{[Ln]*100}{[Zn]+[Ln]}$)		Incorporazione
		Teorica	Sperimentale	
ZnO:Eu 1% at.	1/1	1%	1,1%	110%
ZnO:Eu 3% at.	1/1	3%	3,2%	107%

Tabella 6.15: Dati ottenuti da analisi ICP-MS dei campioni ZnO:Eu 1% at. e ZnO:Eu 3% at. sintetizzati mediante protocollo di sintesi Diodati.

Prendendo in considerazione il fatto che in questo lavoro di tesi lo scopo ultimo è quello di sintetizzare nanoparticelle di ZnO, in questo caso, con caratteristiche tali da poter essere utilizzate nel *bioimaging* ottico, è possibile affermare che particelle di ZnO, con proprietà simili, possono essere sintetizzate mediante un approccio sintetico più economico a livello di reagenti utilizzati nel protocollo di sintesi, quindi senza l'utilizzo di un agente peptizzante e di acido ossalico, in questo caso, ma soltanto utilizzando i precursori degli ioni Zn^{2+} e O^{2-} (NaOH). Infatti, le nanoparticelle sintetizzate mediante entrambi i due approcci di sintesi presentano rese, proprietà strutturali, dimensioni dei cristalliti e percentuale atomica di europio acquisita dal campione, confrontabili.

6.2 Sintesi Biogenica

Negli ultimi anni, l'utilizzo di estratti di organismi biologici per la sintesi di nanoparticelle si sta rivelando una buona strada da percorrere per l'ottenimento di prodotti meno tossici e più sostenibile[98]. In questo lavoro di tesi vengono sintetizzate polveri di nanoparticelle di ossido di zinco e di solfuro di zinco mediante l'utilizzo di estratti di alga, in particolare di *Nannochloropsis gauditana*. La sintesi biogenica dell'ossido di zinco e del solfuro di zinco prevede il mescolamento dell'estratto algale liquido con la soluzione acquosa del precursore metallico. Per sintetizzare l'ossido di zinco, la miscela viene mantenuta a riflusso a 100 °C per 3 h, senza utilizzare alcun agente precipitante (e.g. NaOH, utilizzato nella sintesi idrotermale di ZnO), mentre la sintesi del solfuro di zinco prevede l'aggiunta di solfuro di sodio (Na₂S) alla miscela acquosa di estratto algale e precursore di Zn²⁺ e la reazione viene condotta a 100 °C per 3 h. Inoltre, sono stati sintetizzati anche i campioni drogati con europio al 1%, 2% e 3% at. in relazione alle moli del precursore di Zn²⁺. La componente bioattiva dell'estratto ricopre il ruolo di template delle nanoparticelle.

Tuttavia, questo approccio di sintesi presenta diversi aspetti svantaggiosi, da ottimizzare, tra cui i) la bassa resa, ii) la scarsa purezza, iii) la bassa riproducibilità dovuta alla variabilità della composizione dell'estratto e iv) lo scale-up limitato a causa delle basse rese dei prodotti cristallini ottenuti.

Nome del campione	Concentrazione precursore Zn ²⁺ (ZnAc)	Resa	Nome del campione	Precursore Zn ²⁺ /Na ₂ S	Resa
ZnO puro	0,2 M	4%	ZnS puro	1/2	99%
ZnO:Eu 1% at.	0,2 M	5%	ZnS:Eu 1% at.	1/2	77%
ZnO:Eu 2% at.	0,2 M	4%	ZnS:Eu 2% at.	1/2	62%
ZnO:Eu 3% at.	0,2 M	23%	ZnS:Eu 3% at.	1/2	100%

Tabella 6.16 e 6.17: Elenco dei campioni di ossido di zinco (a destra) e solfuro di zinco (a sinistra) ottenuti mediante approccio biogenico

6.2.1 Solfuro di zinco

In questo lavoro di tesi, la sintesi biogenica di nanoparticelle di solfuro di zinco prevede l'utilizzo di estratto algale di *Nannochloropsis gauditana* concentrata 74 g/L, zinco acetato diidrato $((\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ come precursore dello ione Zn^{2+} e solfuro di sodio (Na_2S) come precursore degli ioni S^{2-} . Analogamente alla sintesi idrotermale di ZnS presentata nel paragrafo 6.1.1, i campioni vengono drogati con europio pentaidrato $(\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$, precursore degli ioni Eu^{3+} , all'1%,2% e 3% at.

Solfuro di zinco puro

Le prime caratterizzazioni effettuate riguardano la struttura cristallina, la morfologia e le dimensioni delle nanoparticelle ottenute. È stata effettuata analisi PXRD per determinare la struttura cristallina e l'eventuale presenza di fasi secondarie, del campione di solfuro di zinco sintetizzato mediante approccio biogenico. Il diffrattogramma ottenuto da questo tipo di analisi è stato riportato in figura 6.27, con la relativa indicizzazione dei riflessi mediante l'attribuzione dei corrispondenti indici di Miller. La procedura di *Search and Match* ha evidenziato la presenza dei riflessi caratteristici della sfalerite e l'assenza di riflessi caratteristici di eventuali fasi secondarie, come la wurtzite. Ad ogni modo, analogamente ai campioni di ZnS sintetizzati per via idrotermale, è stata osservata la presenza di una componente amorfa all'interno del campione.

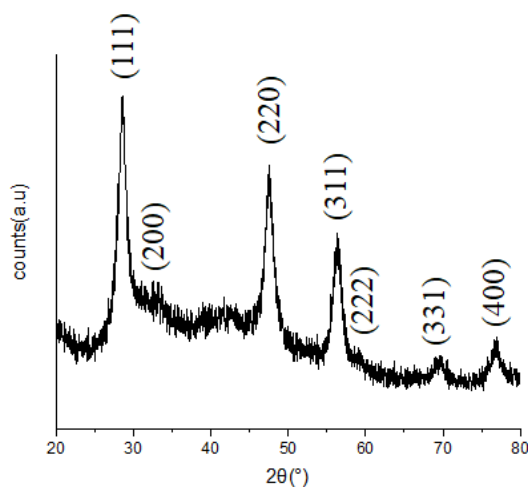


Figura 6.27: Diffrattogramma del campione di solfuro di zinco ottenuto mediante approccio biogenico

L'equazione di Scherrer è stata utilizzata per il calcolo della grandezza media dei cristalliti, prendendo in considerazione il riflesso (111) della forma cristallina sfalerite, ossia il riflesso principale, come riferimento per l'applicazione della formula. La dimensione del cristallite per il campione puro ottenuto mediante approccio biogenico risulta essere di 7 nm.

Analisi TEM sono state effettuate per determinare le dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute mediante questo approccio di sintesi. Le dimensioni sono state calcolate prendendo in considerazione la media del diametro di Feret (d_F) delle nanoparticelle presenti all'interno dell'immagine TEM ed il calcolo è stato eseguito con l'ausilio del software ImageJ. Anche per le nanoparticelle pure di solfuro di zinco, ottenute mediante approccio biogenico, è stato calcolato il PDI (Tabella 6.18), che è risultato relativamente basso (0,3).

Campione	Precursore Zn²⁺ /Na₂S (mol/mol)	Media diametri di Feret (nm)	Deviazione standard (nm)	PDI
ZnS puro	1/2	13	3,5	0,3

Tabella 6.18: Dati ricavati da analisi TEM del campione di ZnS puro ottenuto mediante approccio biogenico

Dall'immagine TEM sottostante è possibile notare come le nanoparticelle del campione in questione presentino forma prevalentemente sferica

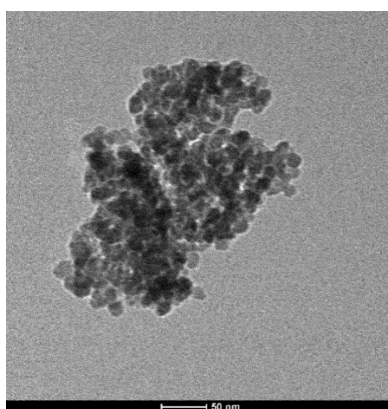


Figura 6.28: Immagine TEM del campione di solfuro di zinco ottenuto mediante approccio biogenico

Solfuro di zinco drogato con europio

La struttura cristallina dei campioni di solfuro di zinco drogati con europio è stata caratterizzata mediante analisi PXRD, utilizzando una procedura di *Search and Match* per individuare la presenza di eventuali fasi secondarie diverse dal solfuro di zinco. Dal confronto tra i diffrattogrammi dei campioni puri con quelli dei campioni drogati con europio mostrato in figura 6.28, non si osservano variazioni nel profilo e nella posizione dei riflessi.

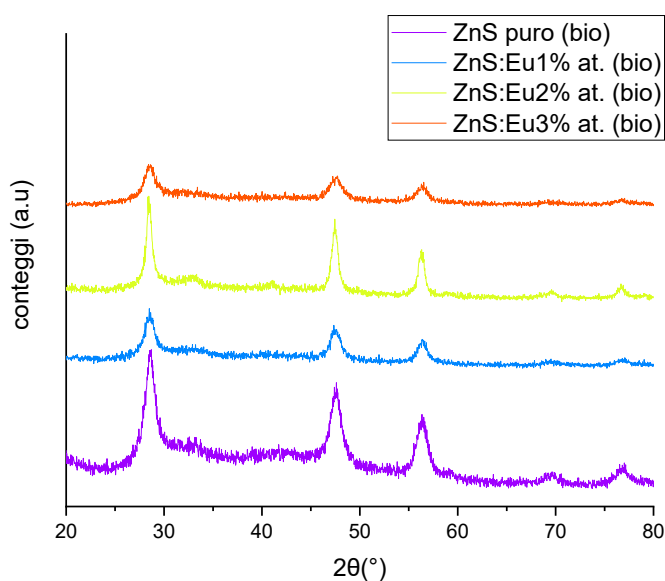


Figura 6.29: Diffrattogrammi della serie di campioni sintetizzati mediante approccio biogenico

Come precedentemente accennato, dovrebbe essere osservato uno spostamento dei riflessi della sfalerite verso angoli minori, rispetto ai riflessi del campione puro. La figura 6.29 riporta il confronto tra i diffrattogrammi del campione puro con i diffrattogrammi dei campioni drogati, ed è possibile notare la presenza di tale spostamento, da parte dei riflessi caratteristici dei campioni drogati nei confronti dei riflessi caratteristici del campione puro, verso angoli minori. Tale osservazione potrebbe indicare l'avvenuta incorporazione dell'europio all'interno della matrice cristallina del solfuro di zinco.

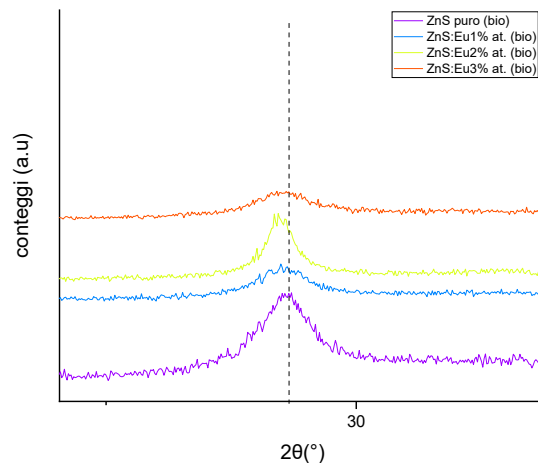


Figura 6.30: Confronto tra i diffrattogrammi della serie di campioni sintetizzati mediante approccio biogenico

Le dimensioni dei cristalliti sono state calcolate mediante equazione di Scherrer sul riflesso (111) della forma cristallina sfalerite. In questo caso, come è possibile constatare dalla tabella sottostante (Tabella 6.19), si ha un aumento della dimensione dei cristalliti soltanto per quanto riguarda i campioni drogati al 2% at. rispetto al campione puro.

Campione	Precursore Zn^{2+}/Na_2S (mol/mol)	Dimensione del cristallite (nm)
ZnS puro	1/2	7
ZnS:Eu 1% at. (bio)	1/2	8
ZnS:Eu 2% at. (bio)	1/2	13
ZnS:Eu 3% at. (bio)	1/2	6

Tabella 6.19: Tabella relativa alle dimensioni dei cristalliti dei vari campioni sintetizzati mediante approccio biogenico puri e drogati con europio.

Ad ogni modo, come accennato nella sezione 6.1, l'inserimento degli ioni di europio, e in generale di tutti gli ioni lantanidi, all'interno della matrice cristallina

di solfuro di zinco risulta energeticamente sfavorevole, in quanto la struttura della sfalerite dovrebbe deformarsi per poter accogliere gli ioni Eu^{3+} [133]. Proprio per questo, la formazione di fasi secondarie, riconducibili solitamente a ossido di europio (Eu_2O_3) e idrossido di europio ($\text{Eu}(\text{OH})_3$), è comunemente osservata. Tramite la procedura di *Search and Match*, è stato possibile individuare la presenza di una piccola componente di ossido di europio nei campioni ZnS:Eu 2% at. (bio) e ZnS:Eu 3% at. (bio).

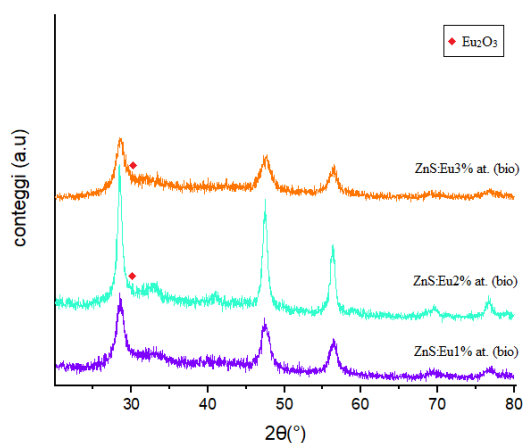


Figura 6.31: Confronto diffrattogrammi dei campioni drogati con europio sintetizzati mediante approccio biogenico

L'effetto del drogante sulla dimensione e morfologia dei campioni è stato osservato tramite analisi TEM, prendendo come esempio il campione drogato con europio al 3% at. La media del diametro di Feret (d_F) delle nanoparticelle, stimato dalle immagini TEM, indica che la dimensione delle nanoparticelle rimane invariata nonostante l'incorporazione degli ioni droganti. Inoltre, le dimensioni medie delle particelle non differiscono in modo significativo dalle dimensioni medie dei cristalliti determinati mediante analisi PXRD (tabella 6.19): anche in questo caso è molto probabile che le nanoparticelle in questione siano formate da un singolo dominio di *scattering* coerente. Infine, si può notare che le ridotte dimensioni delle nanoparticelle ottenute mediante approccio di sintesi biogenico vengono ottenute senza l'ausilio di tensioattivi e/o leganti, che, solitamente vengono usati per limitare la crescita delle nanoparticelle.

Campione	Precursore Zn ²⁺ /Na ₂ S (mol/mol)	Media diametri di Feret (nm)	Deviazione standard (nm)	PDI
ZnS puro	1/2	13	3,5	0,3
ZnS:Eu 3% at.	1/2	11	3,0	0,3

Tabella 6.20: Dati ricavati da analisi TEM dei campioni puro e ZnS:Eu 3% at. ottenuti mediante approccio biogenico.

Considerando i risultati ottenuti nella tabella appena descritta (tabella 6.20) è possibile constatare che la dimensioni delle nanoparticelle non viene variata dall'aggiunta del drogante, rispetto alle dimensioni delle nanoparticelle del campione puro ottenuto mediante lo stesso approccio di sintesi. Inoltre, le nanoparticelle sono state caratterizzate da un basso PDI. L'immagine sottostante evidenzia il fatto che anche le nanoparticelle del campione drogato presentano una forma prevalentemente sferica.

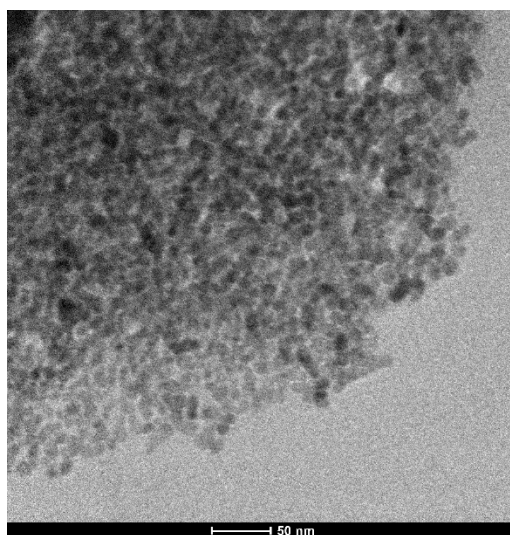


Figura 6.32: Immagine TEM del campione ZnS:Eu 3% at. ottenuto mediante approccio biogenico

I campioni di solfuro di zinco ottenuti mediante approccio biogenico sono stati analizzati mediante EDX, per stimare la composizione del massivo. La percentuale atomica di europio all'interno del campione analizzato è stata ottenuta

come valore medio del rapporto tra la percentuale atomica di europio e zinco determinati in diversi punti del campione.

Campione	Precursore Zn ²⁺ /Na ₂ S (mol/mol)	%Zn at.	%Eu at.	%Eu/%Zn at.
ZnO:Eu 3% at. (bio)	(1/2)	47,62	0,86	1,8%

Tabella 6.21: Dati ottenuti da analisi EDX del campione ZnS:Eu 3% at. (bio)

In questo caso, la percentuale di ione drogante all'interno del campione analizzato risulta essere circa del 1,8%; risultato confrontabile con la percentuale teorica di drogante, ma inferiore rispetto alla percentuale di europio incorporato dal campione drogato con europio al 3% at. con rapporto molare tra Zn²⁺/Na₂S di 1/1,6 (3,7%), sintetizzato mediante approccio idrotermale, come discusso nella sezione 6.1.1.

6.2.2 Ossido di zinco

Da studi precedentemente effettuati è stato appurato che utilizzando l'estratto algale di *Nannochloropsis gauditana* possono essere sintetizzate nanoparticelle di ossido di zinco senza l'utilizzo di NaOH[137], utilizzando soltanto il precursore di Zn, in questo caso lo zinco acetato diidrato ((CH₃COO)₂Zn · 2H₂O). In questo lavoro di tesi i campioni di ossido di zinco sintetizzati mediante approccio biogenico sono stati ottenuti questo protocollo di sintesi. Anche in questo caso viene utilizzato europio nitrato pentaidrato come precursore degli ioni Eu³⁺ e i campioni vengono drogati all'1%,2% e 3% at. rispetto alle moli del precursore di zinco utilizzato per la sintesi.

Ossido di zinco puro

Come per gli altri campioni sono state effettuate analisi PXRD che hanno permesso di valutare la struttura cristallina dei campioni di ossido di zinco sintetizzati mediante approccio biogenico. È stata eseguita una procedura di *Search and Match* per valutare la presenza di riflessi appartenenti alle altre due forme cristalline caratteristiche dell'ossido di zinco, ossia la zincoblenda e il *rock salt*. Il diffrattogramma del campione di ossido di zinco puro sintetizzato mediante

approccio biogenico presenta solamente riflessi caratteristici della forma cristallina wurtzite. Questo è indice della purezza del prodotto. Dalla figura 6.34 è però possibile rilevare una minima percentuale di componente amorfa all'interno del campione.

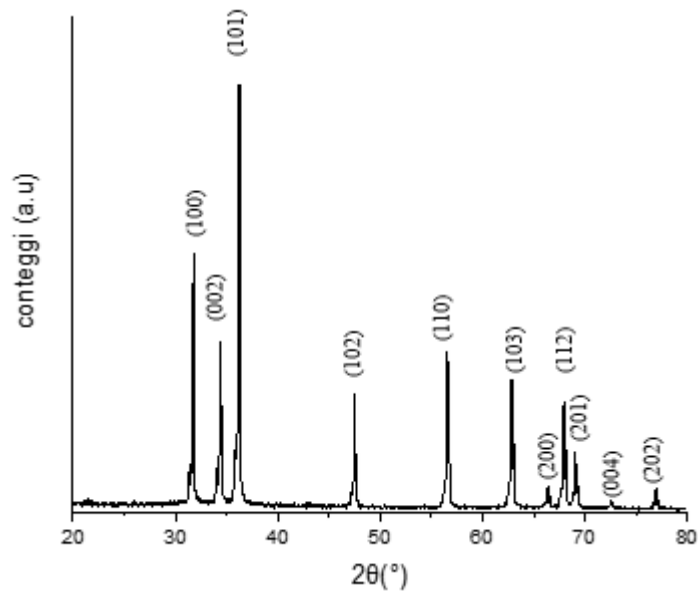


Figura 6.34: Diffratogramma del campione di ossido di zinco puro sintetizzato mediante approccio biogenico

Applicando l'equazione di Scherrer sul riflesso principale (101), le dimensioni medie dei cristalliti sono state stimate pari a 42 nm.

Le dimensioni medie (diametro di Feret, d_F) e morfologia delle particelle sono state valutate mediante analisi TEM: particelle di ossido di zinco ottenute mediante protocollo biogenico sono caratterizzate da forma esagonale con diametro di Feret medio di circa 2 μm (figura 6.35 e 6.36).

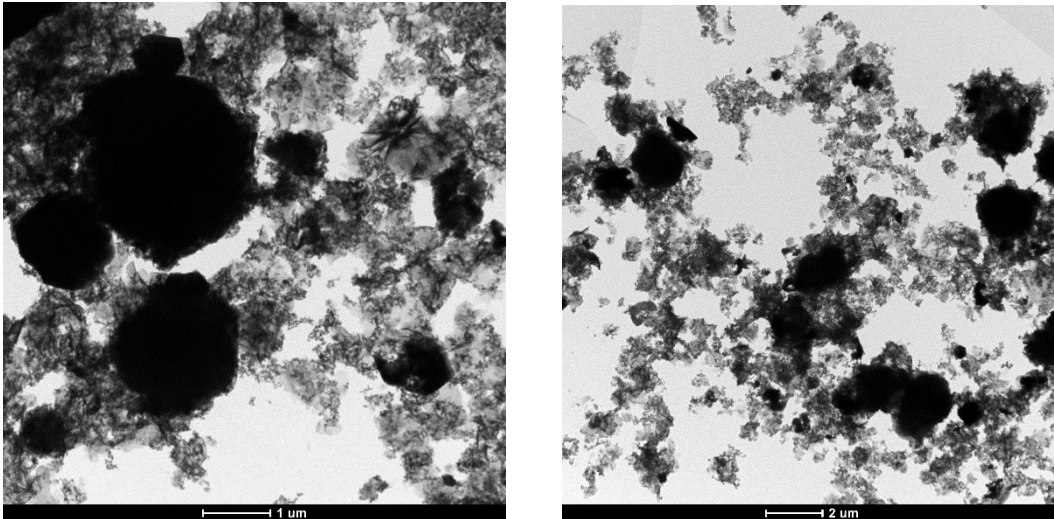


Figura 6.35 e 6.36: Immagini TEM di ossido di zinco sintetizzato mediante approccio biogenico

Ossido di zinco drogato con europio

L'analisi PXRD dei campioni di ossido di zinco drogati con europio al 1% e 2% at., ha evidenziato la formazione di un prodotto amorfo. I campioni in questione, sono stati sintetizzati diverse volte, ma i diffrattogrammi dei replicati non mostravano un diverso risultato. Invece, il diffrattogramma del campione drogato al 3% at. mostra quasi tutti i riflessi caratteristici della wurtzite, pur presentando una bassa percentuale di componente amorfa (figura 6.37).

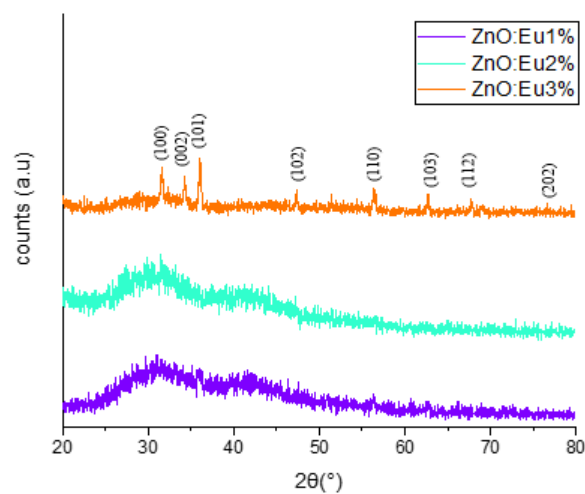


Figura 6.37: Confronto tra i diffrattogrammi dei campioni drogati con europio ottenuti mediante approccio biogenico

Le dimensioni dei cristalliti del campione drogato al 3% at. sono state stimate mediante l'equazione di Scherrer prendendo in considerazione il riflesso principale (101) della wurtzite e risultano essere pari a 31 nm.

I riflessi estranei alla fase cristallina wurtzite osservati nel diffrattogramma del campione drogato al 3% at. (figura 6.38) sono stati identificati tramite una procedura di *Search and Match* e sono stati attribuiti a ossido di europio (Eu_2O_3).

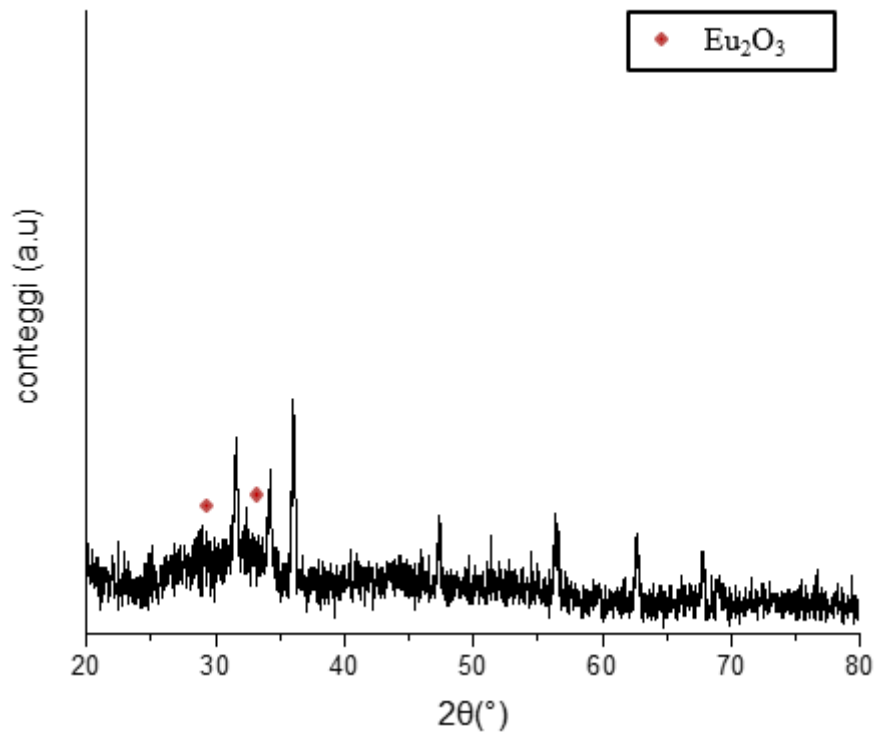


Figura 6.38: Diffrattogramma del campione ZnO:Eu3\% at. presentate riflessi caratteristici di Eu_2O_3 (indicati in rosso)

La morfologia e le dimensioni medie (diametro di Feret, d_F) delle particelle del campione ZnO:Eu3\% at. sono state valutate mediante TEM (figura 6.39), che ha evidenziato l'ottenimento di strutture con forma esagonale con dimensioni simili alle dimensioni ottenute per il campione puro, ossia intorno ai 2 μm .

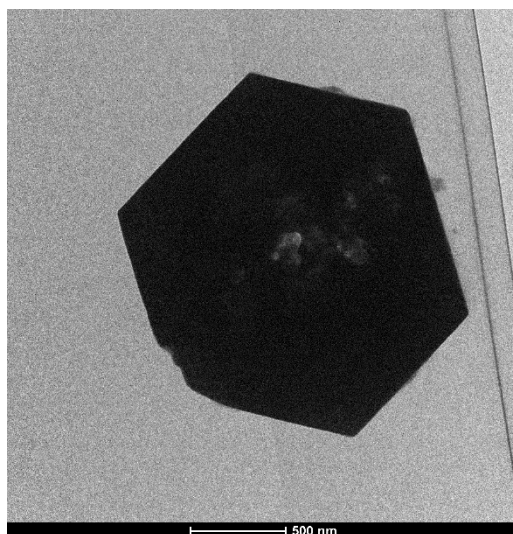


Figura 6.39: Immagine TEM di ZnO:Eu3% at. sintetizzato mediante approccio biogenico

La composizione del massivo del campione drogato al 3% at. è stata analizzata mediante analisi EDX ed è stata osservata una alta percentuale di carbonio, derivato dalla componente organica fornita dall'estratto algale. In ogni caso è stata ottenuta una mappa raffigurante la distribuzione degli atomi di europio all'interno del campione, mediante una funzione di *mapping* disponibile nel software collegato allo strumento. Nella sezione presa in considerazione nella mappa (figura 6.40) è possibile notare come gli atomi di europio siano distribuiti in maniera omogenea all'interno del campione.

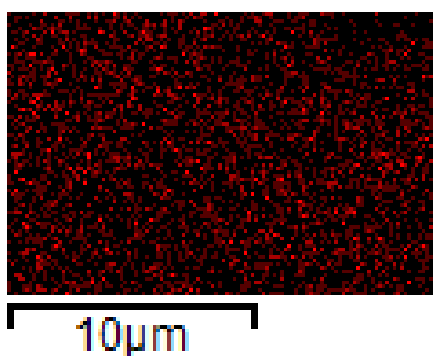


Figura 6.40: mapping dell'eurobio del campione ZnO:Eu3% at.

6.3 Proprietà luminescenti dei campioni sintetizzati

Affinché le nanoparticelle sintetizzate possano essere impiegate nel campo del bioimaging ottico come sonde fluorescenti, devono essere valutate le loro proprietà luminescenti. Prima di procedere con le misure di luminescenza è stata valutato il band gap dei materiali preparati attraverso misure di riflettanza diffusa e utilizzando la funzione di Kubelka-Munk (sezione 7.4).

6.3.1 Campioni sintetizzati mediante sintesi idrotermale

Solfuro di zinco

Gli spettri in riflettanza diffusa sono stati acquisiti in un range di lunghezze d'onda che va da 250 a 800 nm, per tutti i campioni di solfuro di zinco puri e drogati al 3% at. Il band gap è stato calcolato utilizzando la funzione di Kubelka-Munk, come affermato precedentemente.

Nome del campione	Precursore Zn²⁺/Na₂S (mol/mol)	Band gap (eV)	Lunghezza d'onda associata (nm)
ZnS puro	1/1	2,7 eV	455
ZnS:Eu3% at.	1/1	2,6 eV	479
ZnS puro	1/1,6	3,4 eV	363
ZnS:Eu3% at.	1/1,6	3,4 eV	363
ZnS puro	1/2	3,5 eV	351
ZnS:Eu3% at.	1/2	3,1 eV	400

Tabella 6.15: Calcolo del band-gap e della lunghezza d'onda associata dei campioni di solfuro di zinco puri e drogati con europio al 3% at. sintetizzati mediante approccio idrotermale

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che soltanto i campioni sintetizzati con rapporto molare Zn²⁺/Na₂S pari a 1/1,6 e 1/2 presentano valori di band gap confrontabili con quelli riportati in letteratura per il solfuro di zinco *bulk*, che risulta avere E_g intorno ai 3,6 eV[138]. Si può affermare inoltre che le attuali dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate mediante questo approccio sintetico sono molto più elevate rispetto al raggio dell'eccitone di Bohr del solfuro di zinco, che risulta essere pari a 2,5 nm[139]. Di conseguenza, non si verifica l'effetto di

confinamento quantico, in linea con i valori di band gap ottenuti; considerando che tale effetto dovrebbe portare ad un aumento dell'energia del band gap (E_g)[140]

Inoltre, è possibile affermare che i valori di E_g relativi ai campioni drogati con europio, sono inferiori rispetto ai valori relativi ai campioni puri. In letteratura, sono presenti dati discordanti relativi alla variazione di E_g in relazione al drogaggio con europio. Probabilmente il doping con europio può sia aumentare che diminuire il band-gap dei nanomateriali a seconda della concentrazione di drogante e delle proprietà del materiale in questione[141–143].

Gli spettri di emissione sono stati raccolti solamente sui campioni di solfuro di zinco puro e drogato con 3% at. di europio, ottenuti con metodo idrotermale e aventi rapporto Zn^{2+}/Na_2S pari a 1/1,6. Questi campioni non presentavano altre fasi cristalline oltre a quella desiderata del ZnS. Gli spettri sono stati ottenuti eccitando a 350 nm (figura 6.27), lunghezza d'onda leggermente inferiori a quelle associate all'energia di band-gap calcolata in precedenza (3,4 eV – 363 nm).

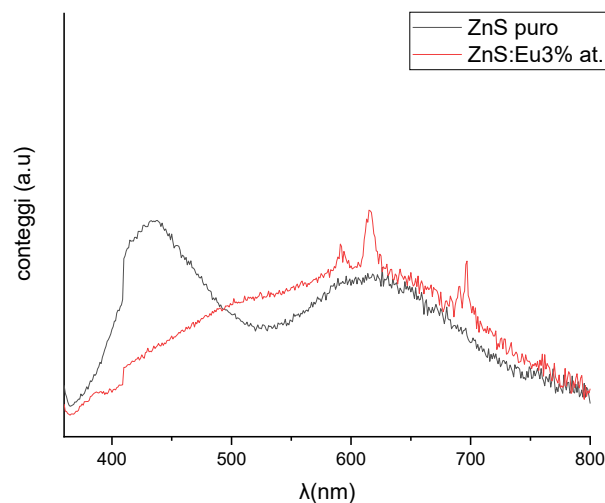


Figura 6.27: Confronto tra gli spettri di emissione dei campioni di solfuro di zinco puro e drogato con europio al 3% at. mediante approccio idrotermale

In figura 6.27 sono riportati gli spettri di emissione del ZnS puro e di quello drogato con europio al 3% at. Il campione puro presenta due bande di emissione caratteristiche di ZnS: una nella regione dell'UV-visibile, nel blu (intorno ai 430 nm) e l'altra nell'arancione (intorno ai 620 nm), come riportato in letteratura[61].

Invece, per quanto riguarda il campione drogato con europio al 3% at. è possibile notare la presenza di transizioni caratteristiche dell'europio. In particolar modo è possibile osservare tre delle bande di emissione caratteristiche dell'europio a 590, 614 e 697 nm, attribuibili alle transizioni caratteristiche di Eu^{3+} dal livello eccitato $^5\text{D}_0$ ai livelli $^7\text{F}_1$, $^7\text{F}_2$ e $^7\text{F}_4$, rispettivamente[144]. Inoltre, è possibile notare la mancanza della banda di emissione di ZnS nella regione dell'UV-visibile nello spettro di emissione relativo al campione drogato con europio al 3% at. Questo è dovuto molto probabilmente a transizioni elettroniche all'interno della banda proibita causate dall'aggiunta dello ione Eu^{3+} , che agisce da centro luminescente[120] e causa uno shift della banda in questione, verso lunghezze d'onda maggiori. Transizioni elettroniche del genere sono attribuite alla forte correlazione, in questo caso, tra gli elettroni s-p delle nanoparticelle di ZnS e gli elettroni d-f dell'europio[145]. È possibile quindi affermare che le proprietà di fotoluminescenza del campione drogato, in questo caso, risultano interessanti per un'eventuale applicazione nel campo del bioimaging ottico; in particolare per la transizione $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$ (697 nm) che cade in prossimità della regione del NIR (750-2500 nm) e quindi potrebbero essere utilizzate nella diagnostica medica, come discusso nel capitolo 5.

Ossido di zinco

Analogamente al ZnS anche in questo caso sono stati raccolti gli spettri in riflettanza diffusa per i campioni di ZnO puri e drogati al 3% at. con europio nell'intervallo di lunghezza d'onda che va dai 250 agli 800 nm ed è stato determinato il band gap.

Nome del campione	Rapporto tra i reagenti (mol/mol)	Band gap (eV)	Lunghezza d'onda associata (nm)
ZnO puro	1/4 (ZnAc/NaOH)	2,5 eV	499
ZnO:Eu 3% at.	1/4 (ZnAc/NaOH)	2,8 eV	439
ZnO puro	1/1 (ZnAcac/C ₂ H ₂ O ₄)	2,9 eV	424
ZnO:Eu 3% at.	1/1 (ZnAcac/C ₂ H ₂ O ₄)	4,2 eV	293

Tabella 6.16: Calcolo del band gap e della lunghezza d'onda associata dei campioni di ossido di zinco puri e drogati al 3% at. sintetizzati mediante approccio idrotermale

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che soltanto i campioni sintetizzati con rapporto molare $Zn^{2+}/NaOH$ pari a 1/4 e il campione puro sintetizzato mediante protocollo Diodati[90], presentano valori di band gap più simili a quelli riportati in letteratura per l'ossido di zinco *bulk*, che risulta avere E_g intorno ai 3,37 eV[146]. Si può affermare inoltre che le dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate mediante questo protocollo di sintesi (paragrafo 6.1.2) sono molto più elevate rispetto al raggio dell'eccitone di Bohr dell'ossido di zinco, che risulta essere pari a 2,4 nm[147] e quindi non si verifica l'effetto di confinamento quantico, che porterebbe ad un aumento dell'energia di band-gap. Fa eccezione il campione drogato con europio al 3% at. sintetizzato seguendo il protocollo Diodati, in quanto nonostante presenti dimensioni superiori al raggio di Bohr dell'eccitone, possiede un band gap maggiore (4,2 eV – 293 nm). Questo risultato può essere attribuito alla presenza di una certa percentuale maggiore di fase secondaria, che in questo caso è attribuita a idrossidi dell'europio ($Eu(OH)_3$), come è possibile osservare dalla figura 6.22.

Successivamente, sono stati acquisiti solo gli spettri di emissione dei campioni di ossido di zinco che, in base all'analisi PXRD, non presentavano riflessi attribuibili a fasi secondarie. Per quanto riguarda il campione drogato al 3% at con europio, è stato scelto quello che presentava la minore quantità di $\text{Eu}(\text{OH})_3$, ovvero il campione con rapporto molare $\text{Zn}^{2+}/\text{NaOH}$ pari a 1/4. Le analisi sono state condotte eccitando a 400 nm, lunghezza d'onda leggermente inferiore rispetto a quella associata al band gap dei due campioni (2,5 e 2,9 eV – rispettivamente 499 e 424 nm) e acquisendo lo spettro in un range compreso tra 490 e 800 nm.

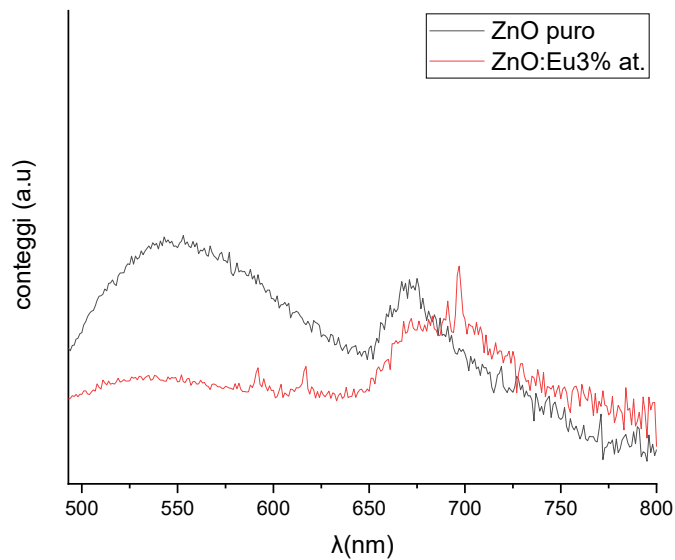


Figura 6.28: Confronto tra gli spettri di emissione dei campioni di ossido di zinco puro e drogato con europio al 3% at. mediante approccio idrotermale

È possibile notare che il campione puro presenta due bande di emissione, la prima intorno ai 540 nm (nel verde), caratteristica di ZnO [30], un'altra banda intorno ai 680 nm. Per quanto riguarda il campione drogato con europio al 3% at. è possibile notare la presenza di tre bande di emissione caratteristiche dell'europio, in particolare quella a 590, 614, e 697 nm. Queste bande sono attribuite alle transizioni caratteristiche di Eu^{3+} dal livello eccitato $^5\text{D}_0$ ai livelli $^7\text{F}_1$, $^7\text{F}_2$ e $^7\text{F}_4$. Anche in questo caso è possibile notare la mancanza della banda di emissione di ZnO nel verde nel campione drogato al 3% at. Come accennato nel paragrafo precedente, molto probabilmente questo shift è dovuto a transizioni elettroniche

all'interno della banda proibita causate dall'aggiunta dello ione Eu^{3+} . Anche il campione drogato in questione presenta la transizione ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_4$ (697 nm), che cade in prossimità della regione del NIR.

6.3.2 Campioni sintetizzati mediante sintesi biogenica

Solfuro di zinco

Gli spettri in riflettanza diffusa sono stati acquisiti in un range di lunghezze d'onda che va dai 250 ai 600 nm, per tutti i campioni di solfuro di zinco puri e drogati al 3% at. con europio ed è stato determinato il valore di band gap utilizzando la funzione di Kubelka-Munk.

Nome del campione	Precursore $\text{Zn}^{2+}/\text{Na}_2\text{S}$ (mol/mol)	Band gap (eV)	Lunghezza d'onda associata (nm)
ZnS puro	1/2	3,1 eV	396
ZnS:Eu 3% at.	1/2	2,8 eV	441

Tabella 6.17: Calcolo del band-gap e della lunghezza d'onda associata dei campioni di solfuro di zinco puri e drogati con europio al 3% at. sintetizzati mediante approccio biogenico

Nella tabella 6.17 sono riportati i valori di band gap ottenuti per alcuni dei campioni preparati. Il campione puro presenta un band gap confrontabile con quelli riportati in letteratura per il solfuro di zinco *bulk* (3,6 eV). Anche in questo caso le attuali dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate mediante approccio biogenico sono più elevate rispetto al raggio dell'eccitone di Bohr del solfuro di zinco (2,5 nm), di conseguenza non si verifica l'effetto di confinamento quantico, che dovrebbe risultare in un aumento dell'energia del band-gap (E_g). I valori di band gap del campione drogato con europio sono inferiori rispetto ai valori ottenuti per il campione puro.

Dopodiché sono stati acquisiti gli spettri di emissione dei campioni di solfuro di zinco, sintetizzati mediante approccio biogenico. Mentre il campione puro è stato possibile selezionare un campione privo di fasi cristalline secondarie, non è stato possibile nel caso del campione drogato. Poiché tutti i campioni drogati con europio presentano dei riflessi attribuibili alla presenza di Eu_2O_3 , si è scelto di selezionare quello con una percentuale di fase secondaria minore. Le analisi sono

state effettuate eccitando a lunghezze d'onda leggermente inferiori rispetto ai valori di band gap calcolati in precedenza (3,1 eV e 2,8 eV – rispettivamente 396 e 441 nm), eccitando a 380 nm ed acquisendo lo spettro in un intervallo che va dai 400 agli 800 nm.

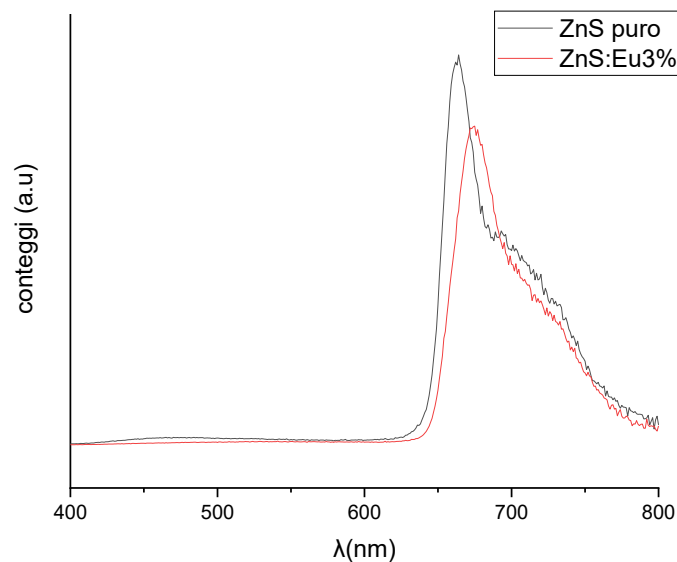


Figura 6.29: Confronto tra gli spettri di emissione dei campioni di solfuro di zinco puro e drogato con europio al 3% at. sintetizzati mediante approccio biogenico

Dalla figura 6.29 è possibile osservare una banda di emissione intensa intorno ai 660 e ai 680 nm rispettivamente per il campione puro e per il campione drogato con europio al 3% at. La banda di emissione in questione molto probabilmente è attribuibile alla banda di emissione della clorofilla, fluoroforo organico, presente all'interno dell'estratto algale, presentante due bande di emissione caratteristiche: una intorno ai 685-690 nm, con maggiore intensità, l'altra intorno ai 730-740 nm, con minore intensità (entrambe le bande cadono nella regione del rosso)[148]. Quindi nonostante siano stati effettuati i lavaggi con acetone in cui la clorofilla è solubile, durante il protocollo di sintesi, la clorofilla è ancora presente all'interno del campione. Da questi spettri di emissione non è possibile osservare la presenza delle transizioni caratteristiche dell'eurobio, né le bande di emissione caratteristiche del solfuro di zinco.

Ossido di zinco

Anche in questo caso gli spettri in riflettanza diffusa sono stati acquisiti in un intervallo di lunghezze d'onda che va da 250 a 800 nm, sia per il campione puro, che per il campione drogato con europio al 3% at.

Nome del campione	Concentrazione precursore Zn²⁺	Band gap (eV)	Lunghezza d'onda associata (nm)
ZnO puro	0,2 M	2,7 eV	454
ZnO:Eu 3% at.	0,2 M	2,7 eV	452

Tabella 6.18: Calcolo del band-gap e della lunghezza d'onda ad esso associata dei campioni di ossido di zinco puro e drogato al 3% at. sintetizzati mediante approccio biogenico

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che entrambi i campioni in questione presentano valori di band gap inferiori con quelli riportati in letteratura per l'ossido di zinco *bulk* che presenta E_g intorno a 3,37 eV, come precedentemente discusso. Anche qui è possibile affermare che le nanoparticelle sintetizzate presentano dimensioni molto più elevate rispetto al raggio di Bohr dell'eccitone dell'ossido di zinco. Quindi non si verifica l'effetto di confinamento che dovrebbe portare ad un aumento dei valori di band gap.

In seguito, sono stati acquisiti solamente gli spettri di emissione dei campioni di ossido di zinco, sintetizzati mediante approccio biogenico, che non presentano fasi secondarie. Sebbene i campioni di ossido di zinco drogati con europio presentino tutti delle fasi secondarie, è stato ugualmente acquisito lo spettro di emissione di uno dei campioni ZnO:Eu 3% at.

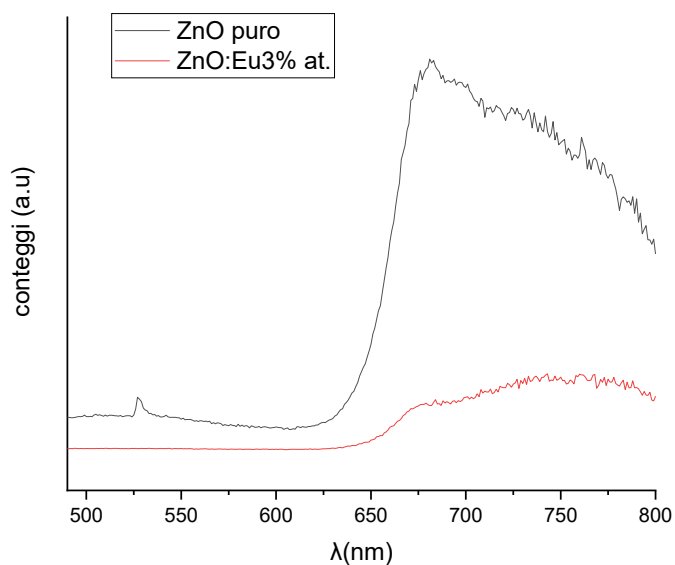


Figura 6.30: Confronto tra gli spettri di emissione dei campioni di ossido di zinco puro e drogato con europio al 3% at. sintetizzati mediante approccio biogenico

Dalla figura 6.30 è possibile osservare che in entrambi i campioni, puro e drogato con europio, si osserva una banda di emissione intensa intorno ai 680 nm. Questa banda è attribuibile alla banda di emissione della clorofilla, o comunque ad altri fluorofori organici che potrebbero essere presenti all'interno dell'estratto algale. Nonostante i lavaggi effettuati con acetone, è ancora presente clorofilla. Inoltre, anche in questo caso da questi spettri di emissione non è possibile osservare la presenza delle transizioni caratteristiche dell'europio, né le bande di emissione caratteristiche dell'ossido di zinco.

6.4 Confronto dei dati ottenuti mediante i due approcci sintetici

In questa sezione vengono presi in considerazione i risultati ottenuti mediante entrambi gli approcci sintetici, in modo da avere un quadro complessivo sui vantaggi e sugli svantaggi delle due metodiche, tenendo sempre conto del fatto che lo scopo ultimo di questo elaborato di tesi è l'eventuale applicazione delle nanoparticelle in questione nel campo del *bioimaging* ottico. Quindi il parametro principale che viene preso in considerazione sono le dimensioni delle nanoparticelle, in quanto, quando si parla di *bioimaging* ottico, l'obiettivo principale è sempre quello di simulare il più possibile la grandezza delle molecole biologiche, in modo da favorire il loro ingresso all'interno delle cellule e di conseguenza dei tessuti biologici, limitando il rischio di danni o interferenze. Si cerca infatti, di ottenere delle particelle con diametro compreso tra 1 e 100 nm, in modo che siano sufficientemente piccole da attraversare le membrane cellulari ma abbastanza grandi da essere rilevate mediante microscopia ottica ⁶⁸.

A tal proposito, prendendo in considerazione entrambi gli approcci sintetici, dimensioni inferiori sono state ottenute principalmente dai campioni di solfuro di zinco rispetto ai campioni di ossido di zinco. Infatti, sia mediante approccio idrotermale che mediante approccio biogenico, sono state ottenute delle particelle di dimensioni di circa 10 nm, come è possibile osservare dalle tabelle sottostanti (tabella 6.19 e 6.20) in cui sono raffigurati i dati riguardanti le dimensioni delle nanoparticelle dei campioni di solfuro di zinco presentanti dimensioni minori delle particelle. I dati in questione sono stati ottenuti tramite analisi TEM. A sinistra sono presenti i dati relativi ai campioni sintetizzati mediante approccio idrotermale con rapporto Zn^{2+}/Na_2S pari a 1/1, mentre a destra quelli relativi ai campioni sintetizzati mediante approccio biogenico con rapporto Zn^{2+}/Na_2S pari a 1/2.

Nome del campione	Zn ²⁺ /Na ₂ S (mol/mol)	Dimensione delle particelle (nm)	Nome del campione	Zn ²⁺ /Na ₂ S (mol/mol)	Dimensione delle particelle (nm)
ZnS puro	1/1	10	ZnS puro	1/2	13
ZnS:Eu 3% at.	1/1	13	ZnS:Eu 3% at.	1/2	10

Tabella 6.19 e 6.20: Dimensioni ottenute da analisi TEM, dei campioni di solfuro di zinco ottenuti mediante approccio idrotermale con rapporto Zn²⁺/Na₂S pari a 1/1 e mediante approccio biogenico con rapporto Zn²⁺/Na₂S pari a 1/2

Il campione di solfuro di zinco drogato con europio al 3% at. sintetizzato mediante approccio biogenico con rapporto Zn²⁺/Na₂S pari a 1/2 presenta una buona percentuale atomica di drogante all'interno del campione (1,8%), calcolato mediante analisi EDX. A differenza del campione di solfuro di zinco drogato al 3% at. ottenuto mediante approccio idrotermale con rapporto molare Zn²⁺/Na₂S pari a 1/1, in cui dalle analisi EDX risulta avere percentuale atomica di europio molto bassa (0,2%), non confrontabile con la percentuale teorica. Da questi dati è possibile dedurre che, in questo caso, la sintesi biogenica, a parità di dimensioni delle nanoparticelle, favorisce l'incorporazione dell'europio, rispetto alla sintesi idrotermale. È però doveroso affermare che il campione in questione, e in generale la maggior parte dei campioni sintetizzati mediante approccio biogenico, presentano fasi secondarie attribuibili a ossidi di europio (principalmente in ZnS) e idrossidi di europio (principalmente in ZnO). Inoltre, i campioni ottenuti con approccio biogenico presentano una percentuale maggiore di fase amorfa rispetto alle nanoparticelle sintetizzate mediante approccio idrotermale, in particolar modo, percentuali molto alte di fasi amorphe sono riscontrate nei campioni di ZnO.

È possibile affermare che, per i campioni di ZnO e ZnS sintetizzati mediante approccio idrotermale, è stato possibile modulare le dimensioni delle nanoparticelle in relazione ai diversi rapporti molari dei precursori implicati nelle sintesi. Infatti, come precedentemente discusso nelle sezioni 6.1.2 e 6.1.3, un maggior quantitativo di Na₂S nella sintesi idrotermale provoca un aumento sia delle dimensioni dei cristalliti che delle dimensioni delle nanoparticelle di ZnS,

mentre un maggior quantitativo di NaOH provoca una riduzione delle dimensioni dei cristalliti e delle nanoparticelle di ZnO. La possibilità di modulare la dimensione dei cristalliti e di conseguenza delle nanoparticelle in funzione dei parametri di sintesi è un ottimo vantaggio per quanto riguarda la sintesi idrotermale, in linea con la letteratura^{29,95,96}.

Inoltre, entrambi gli approcci sintetici presentano rese confrontabili per la sintesi di nanoparticelle di ZnS (vedi tabelle 6.2 e 6.17). Invece, rese molto basse (dal 4% al 23%) caratterizzano la sintesi biogenica di nanoparticelle di ZnO, rispetto al corrispettivo idrotermale (vedi tabella 6.1 e 6.16). Le dimensioni delle nanoparticelle di ZnO ottenute mediante questo approccio sintetico sono dell'ordine dei micron (2 μm , sia per il campione puro che per quello drogato con europio), quindi a causa delle dimensioni elevate non risultano adatte al *bioimaging* ottico. Al contrario, le dimensioni delle particelle di ZnO sintetizzate mediante approccio idrotermale sono inferiori rispetto a quelle sintetizzate in maniera biogenica (120 nm per il campione puro e 89 nm per il campione drogato), come accennato nella sezione 6.1.2. Inoltre, i campioni di ZnO con rapporto molare $\text{Zn}^{2+}/\text{NaOH}$ pari a 1/4 presentano al loro interno una buona percentuale atomica di europio per il campione drogato al 3% at. (ca. 2,2%), analizzata mediante spettroscopia EDX. I campioni che però, più facilmente incorporano l'eurobio all'interno della propria matrice cristallina, senza la formazione di fasi secondarie, sono quelli di ZnS con rapporto $\text{Zn}^{2+}/\text{Na}_2\text{S}$ pari a 1/1,6. Infatti, mediante analisi EDX è stato visto che presentano un'alta percentuale di atomi di europio all'interno dei campioni (pari a 3,7%) come riportato nella tabella 6.7.

Inoltre, dall'analisi relativa alle proprietà luminescenti del campione puro e del campione drogato al 3% at, con europio, è stato possibile osservare le transizioni caratteristiche del drogante e le transizioni elettroniche all'interno della banda proibita, dovute all'aggiunta di ione Eu^{3+} , come discusso nella sezione 6.3.1. Anche questi sono ottimi risultati in vista dell'utilizzo nel campo applicativo del *bioimaging* ottico. Invece, per quanto riguarda le proprietà luminescenti dei campioni sintetizzati mediante approccio biogenico, le bande di emissione sono caratterizzate dalla presenza di clorofilla nonostante i lavaggi con acetone

effettuati durante la sintesi, come è stato possibile osservare dalle figure 6.30 e 6.31, derivante dall'estratto algale di *Nannochloropsis gaditana* utilizzato. Inoltre, non sono osservabili le bande di emissione corrispondenti alle transizioni caratteristiche dell'europio.

Capitolo 7

7. TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE

7.1 Diffrazione di Raggi X su polveri (XRD)

La struttura cristallina delle nanostrutture sintetizzate, così come la purezza delle stesse e la dimensione media dei cristalliti sono state determinate mediante analisi PXRD. Si tratta di una tecnica non distruttiva che si basa sull'interazione della radiazione elettromagnetica con strutture periodiche aventi distanze interatomiche confrontabili con la lunghezza d'onda dei raggi X incidenti ($10^{-9} - 10^{-12}$ m). Durante una misura PXRD, un campione cristallino viene colpito da un fascio di raggi X, che viene diffuso dai piani atomici del cristallo; la radiazione diffusa dà origine ad interferenze costruttive (massimo di diffrazione) quando viene soddisfatta la legge di Bragg[149]:

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

Equazione 1: Legge di Bragg

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. Le posizioni angolari dei riflessi nel diffrattogramma sono dunque inversamente correlate alle distanze tra i piani che li generano. Oltre alla posizione angolare dei riflessi nel diffrattogramma, un altro parametro di interesse è la loro ampiezza, ed in particolare l'ampiezza a mezza altezza (FWHM – *Full Width at Half Maximum*), dalla quale è possibile ricavare la dimensione media dei cristalliti, mediante la formula di Scherrer[150]:

$$D = K \cdot \frac{\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Equazione 2: Formula di Scherrer

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 (FWHM – *Full Width at Half Maximum*) e θ è l'angolo di incidenza della radiazione (angolo di Bragg).

I campioni sintetizzati 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 $20\text{-}80^\circ$. Inoltre, l'identificazione delle fasi cristalline è stata eseguita attraverso una procedura di *Search and Match* utilizzando il software Bruker Diffrac EVA.

7.2 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

La morfologia e le dimensioni delle nanostrutture di ossido di zinco e solfuro di zinco, sia per quanto riguarda i campioni puri che per quelli drogati con europio, sono state analizzate mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Per svolgere la misura, è stata depositata una goccia delle sospensioni dei prodotti su un reticolo di rame rivestito di carbonio. Le immagini TEM sono state acquisite mediante l'utilizzo di un microscopio FEI Tecnai G2 (Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova), operante a 100 kV , munito di una telecamera Olympus Veleta ed una telecamera TVIPS F114. L'analisi delle dimensioni delle nanoparticelle è stata effettuata tramite il software ImageJ[151].

7.4 Fotoluminescenza

Per valutare le proprietà di fotoluminescenza dei campioni di ossido di zinco e solfuro di zinco, sono stati registrati gli spettri in riflettanza diffusa e di emissione. Il fluorimetro utilizzato è uno Spettrofluorimetro FLS 1000 (Edinburgh), equipaggiato con lampada Xe2 Xenon Arc Lamp (450 W), Xenon μF2 Microsecond Flashlamp (60 W , 100 Hz), un TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*), monocromatori in configurazione Czerny – Turner con lunghezza focale di 325 mm , e *detector* PMT – 980. Gli spettri in riflettanza diffusa sono stati registrati sulle polveri mediante l'ausilio di una sfera di

integrazione (o sfera di Ulbricht), rivestita in solfato di bario (BaSO_4), un materiale altamente riflettente e diffusivo della luce che permette di assicurare una distribuzione uniforme della luce incidente sulla superficie del campione da analizzare. I campioni sono stati diluiti con BaSO_4 in polvere. Gli spettri in riflettanza ottenuti sono stati utilizzati per il calcolo del band gap tramite lo sfruttamento della funzione di Kubelka-Munk, solitamente usata, appunto, per calcolare la riflettanza diffusa di un materiale, che è una misura della quantità di luce che viene diffusa all'interno del materiale e non viene trasmessa o assorbita. Essa dipende dal coefficiente di estinzione del materiale, che rappresenta la somma delle perdite di luce dovute all'assorbimento e alla diffusione.

$$(1 - R)^2 / (2 \cdot R) = k/s$$

Equazione 3: Formula di Kubelka-Munk

R rappresenta la riflettanza del materiale, k il coefficiente di assorbimento e diffusione del materiale e S rappresenta lo spessore del campione.

Dopodiché sono stati acquisiti gli spettri di emissione di alcuni campioni puri e drogati, di solfuro di zinco e ossido di zinco prendendo in considerazione la lunghezza d'onda associata al band-gap calcolato in precedenza. Le misure sono state effettuate ponendo le polveri all'interno di una cuvetta in quarzo. Gli spettri di emissione sono stati acquisiti soltanto su campioni, i cui diffrattogrammi, non presentano riflessi caratteristici di eventuali fasi secondarie.

7.5 Microscopia elettronica a scansione (SEM) spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDX)

La morfologia in 3D di alcune delle nanostrutture di ossido di zinco e solfuro di zinco è stata determinata mediante microscopia a scansione elettronica (SEM).

Per poter eseguire l'analisi, sono state preparate delle sospensioni dei campioni in etanolo, favorendo la dispersione con l'ultrasonificatore a punta (Sartorius Stedim LabsonicP, 30 s, impulsi di 0,9 s e potenza 100 W). Alcune gocce delle sospensioni sono state depositate su un frammento di silicio, fissato su un supporto tramite un nastro conduttore. Le immagini SEM sono state acquisite con un microscopio Zeiss SUPRA 40VP, con un'accelerazione del fascio che è di 5,0 kV, rilevando gli elettroni secondari. Aumentando l'accelerazione del fascio a

20,0 kV è stato possibile effettuare spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDX), su tutti i campioni di ossido di zinco e solfuro di zinco drogati al 3% at. rispetto alle moli del precursore di Zn^{2+} , sfruttando un software collegato al microscopio Zeiss SUPRA 40 VP, in modo da verificare la percentuale atomica degli atomi di drogante all'interno del campione.

7.6 Spettrometria di massa a plasma accoppiato (ICP – MS)

L'analisi ICP-MS è stata effettuata soltanto su alcuni campioni di ossido di zinco e solfuro di zinco sintetizzati mediante approccio idrotermale, utilizzando uno strumento ICP-MS Agilent Technologies 7700xx (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova), con plasma di 1550 W di potenza. Prima di effettuare l'analisi, i campioni sono stati sottoposti a mineralizzazione con acido nitrico concentrato al 69% e riscaldati a bagnomaria per 45 minuti. Dopo il raffreddamento, le soluzioni sono state diluite con acqua e acido nitrico.

Capitolo 8

8. PROCEDURE SPERIMENTALI

8.1. Reagenti

In questa tabella sono elencati i reagenti impiegati nella sintesi delle nanoparticelle di ZnO e di ZnS mediante i due approcci sintetici.

Nome reagente	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
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
Idrossido di sodio	NaOH	40	1310-73-2	VWR
Europio nitrato pentaidrato	$\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	428,06	63026-01-7	Merck

Tabella 2: Reagenti utilizzati per la sintesi delle nanoparticelle di ZnO e ZnS mediante i due approcci sintetici

La biomassa algale di *Nannochloropsis gaditana* è stata fornita dal prof. Tomas Morosinotto (Dipartimento di Biologia, Università di Padova).

8.2. Sintesi biogenica

8.2.1. Preparazione dell'estratto algale

Il primo passaggio della sintesi biogenica di ZnO prevede la preparazione di un estratto algale. Dalla Falcon contenente la biomassa di *Nannochloropsis gaditana* (73 g/L), vengono prelevati 13 ml di biomassa, corrispondenti a 1g di microalga, e diluiti con acqua in un cilindro graduato, in modo da raggiungere i 50 ml. Dopodiché la biomassa diluita con acqua viene posta in una beuta e riscaldata a 100°C per 20 minuti, sotto agitazione. Successivamente, si va incontro allo step di filtrazione per gravità, utilizzando carta da filtro *Macherey-Nagel* avente pori di dimensioni pari a 16 µm.

8.2.2 Sintesi biogenica di ZnO

Una volta ottenuto l'estratto, viene preparata la soluzione di zinco acetato diidrato, $(\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ 0,2 M, pesando 4,39 g di quest'ultimo (0,02 mol) che vengono disciolti in acqua deionizzata in un matraccio da 100 ml. Questa soluzione viene trasferita in un pallone da 250 ml e in seguito viene aggiunto l'estratto algale goccia a goccia. Nel caso dei campioni drogati con europio all'1%, 2% e 3% at. rispetto alle moli del precursore di zinco presente all'interno della reazione, dopo aver aggiunto l'estratto algale viene aggiunto l'europio pentaidrato $(\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$, il cui quantitativo da aggiungere varia in base alla percentuale con cui si vuole drogare il campione. La sintesi è stata svolta a refluxo e la miscela finale ottenuta viene riscaldata e mantenuta a 100°C per 3 ore sotto agitazione. Alla fine della reazione si ottiene un precipitato verde, che viene isolato mediante tre cicli di centrifugazione (12000 rpm e 5 min) e purificato effettuando due lavaggi con acetone, centrifugando ad ogni passaggio a 12000 per 5 minuti. Il prodotto solido viene essiccato per una notte in forno a 80°C e macinato nel mortaio.

8.2.2. Preparazione dell'estratto algale

Come visto in precedenza per l'ossido di zinco, anche in questo caso, viene preparato l'estratto algale mediante riscaldamento della biomassa di *Nannochloropsis gaditana* (73 g/L) a 100°C sotto agitazione e successiva filtrazione su carta da filtro *Macherey-Nagel* avente pori con dimensioni pari a 16 µm. Per la preparazione dell'estratto vengono prelevati dalla Falcon contenente la biomassa algale 13 ml di campione, corrispondenti a 1 g di alga.

8.2.3. Sintesi biogenica di ZnS

La sintesi biogenica per i campioni di solfuro di zinco, come visto precedentemente per i campioni di ossido di zinco, è stata svolta a riflusso. Viene preparata una soluzione di zinco acetato diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) con concentrazione 0,1M in un matraccio da 100 ml, pesando 2,195 g del precursore degli ioni Zn^{2+} (0,01 mol). La soluzione ottenuta viene trasferita in un pallone da 250 ml a cui poi vengono aggiunti 4,804 g (0,02 mol) di solfuro di sodio nonaidrato ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), seguendo il rapporto molare Zn:S pari a 1:2, con concentrazione del solfuro di sodio pari a 0,2 M. Dopodiché viene aggiunto l'estratto algale, precedentemente ottenuto, goccia a goccia. Nel caso dei campioni drogati con europio all'1%, 2% e 3% at. rispetto alle moli del precursore di zinco presente all'interno della reazione; dopo aver aggiunto l'estratto algale viene aggiunto l'eurobio pentaidrato, il cui quantitativo da aggiungere varia in base alla percentuale con cui si vuole drogare il campione. La miscela risultante è stata riscaldata e mantenuta a 100°C per 3 ore sotto costante agitazione. Alla fine della reazione si ottiene un precipitato verde, che viene isolato mediante tre cicli di centrifugazione (12000 rpm e 5 min) e purificato effettuando due lavaggi con acqua deionizzata, centrifugando ad ogni passaggio a 12000 per 5 minuti. Il prodotto solido viene essiccato per una notte in forno a 80°C e macinato nel mortaio.

8.3. Sintesi idrotermale

8.3.1. Sintesi idrotermale di ZnO

Per quanto riguarda la sintesi idrotermale dei campioni di ossido di zinco, sono stati disciolti 2,195 g (0,01 mol) di zinco acetato diidrato in acqua deionizzata, in un matraccio, in modo da produrre una soluzione di zinco acetato 1 M. Contemporaneamente è stata allestita una soluzione di NaOH con concentrazione 10 M. La soluzione di zinco acetato è stata trasferita all'interno di un contenitore in PTFE A255AC (detto "liner") e sotto agitazione sono stati aggiunti goccia a goccia rispettivamente 1 ml della soluzione di NaOH precedentemente preparata. Invece, per quanto riguarda i campioni sintetizzati con rapporto molare $Zn^{2+}/NaOH$ di 1/4, sono stati aggiunti 4 ml della soluzione di NaOH 10 M. Successivamente viene aggiunto un quantitativo variabile di europio pentaidrato in relazione alla percentuale di europio con cui si vuole drogare il campione. I campioni sono stati drogati al 1%, 2% e 3% at. di europio rispetto alle moli del precursore di zinco impiegato nella reazione di sintesi. In seguito, il liner viene posto all'interno di un'autoclave in acciaio inossidabile (*4745 General Purpose Acid-Digestion Bomb, Parr Instrument Company*) che viene poi riscaldata a 135°C per 24 ore in forno. Successivamente, concluse le 24 ore, il prodotto viene lasciato raffreddare a temperatura ambiente e isolato mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti). Dopo aver recuperato il campione si effettuano due cicli di lavaggi con acqua deionizzata (12000 rpm, 5 minuti). Dopodiché viene eliminato il surnatante e il prodotto ottenuto viene asciugato in forno a 80 °C per una notte e in seguito macinato per mezzo di un mortaio.

Invece, per quanto riguarda i campioni sintetizzati seguendo il protocollo di Diodati et al.[90] viene 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, che funge da agente peptizzante e un quantitativo variabile di europio pentaidrato in relazione alla percentuale di europio con cui si vuole drogare il campione. I campioni sono stati drogati al 1%, 2% e 3% at. di europio rispetto alle moli del precursore di zinco impiegato nella

reazione di sintesi. In seguito, viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di NaOH (10 M) per portare il pH della soluzione a 12. La soluzione risultante è stata poi posta all'interno dell'autoclave in acciaio ed è stata riscaldata a 135°C per 24 ore in forno. Come nelle sintesi precedenti la soluzione viene lasciata raffreddare a temperatura ambiente, si isola il prodotto mediante centrifugazione (12000 rpm, 5 minuti) e si effettuano, anche in questo caso, due lavaggi con acqua deionizzata. Dopodiché viene eliminato il surnatante e il prodotto viene posto a seccare in forno a 80°C per tutta la notte e macinato con l'ausilio di un mortaio fino ad ottenere una fine polvere bianca.

8.3.2. Sintesi idrotermale di ZnS

Sono stati pesati 0,219 g (0,0010 mol) di zinco acetato, successivamente disciolti in 10 ml di acqua deionizzata all'interno di un contenitore in PTFE A255AC (liner). A questa soluzione sono stati aggiunti 0,384 g (0,0016 mol) di sodio solfuro nonaidrato (rapporti molari Zn:S 1:1,6), lasciando agitare per 10 minuti. Per le sintesi con rapporto molare Zn:S 1:1 e 1:2 sono stati aggiunti rispettivamente 0,4804 g (0,0020 mol) e 0,2402 g (0,0010 mol) di sodio solfuro nonaidrato. Dopodiché viene aggiunto un quantitativo variabile di europio pentaidrato in relazione alla percentuale di europio con cui si vuole drogare il campione. I campioni sono stati drogati al 1%, 2% e 3% at. di europio rispetto alle moli del precursore di zinco impiegato nella reazione di sintesi. La sospensione è stata posta all'interno di un'autoclave in acciaio (*4745 General Purpose Acid-Digestion Bomb, Parr Instrument Company*), riscaldando 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). In seguito, vengono eseguiti due lavaggi con acqua deionizzata (12000 rpm, 5 minuti), viene eliminato il surnatante e il prodotto viene lasciato seccare in forno a 80 °C per tutta la notte. Successivamente viene macinato, mediante un mortaio, fino ad ottenere una fine polvere bianca.

8.4. Analisi ed elaborazione dati

I dati ottenuti con le varie tecniche di caratterizzazione sono stati analizzati ed elaborati utilizzando il software Origin 2018 (versione 95E).

Capitolo 9

9.CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

L'elaborato svolto ha permesso di conseguire interessanti risultati sperimentali relativi alle sintesi di ossido di zinco e solfuro di zinco ottenuti mediante: sintesi biogenica, tramite l'utilizzo di estratti algali ricavati da *Nannochloropsis gauditana*, e sintesi idrotermale. Si tratta di metodiche di sintesi semplici, "green", in quanto svolte a basse temperature e senza l'utilizzo di leganti e/o tensioattivi e riproducibili.

Da analisi PXRD è stato possibile osservare come entrambi gli approcci sintetici permettono la produzione di prodotti puri, presentanti struttura cristallina omologa per la maggior parte dei campioni, sintetizzati mediante rapporti diversi: sfalerite per i campioni di solfuro di zinco e wurtzite per i campioni di ossido di zinco. Soltanto i diffrattogrammi associati ai campioni di solfuro di zinco sintetizzati con rapporto molare tra Zn^{2+}/Na_2S pari a 1/1 e 1/2, mediante approccio idrotermale, presentano dei riflessi caratteristici della wurtzite (Figura 6.1).

È stato osservato che, mediante l'approccio idrotermale, è possibile modulare le dimensioni delle nanoparticelle di ossido e solfuro di zinco variando il rapporto molare tra i precursori implicati nelle varie sintesi; Na_2S per il solfuro di zinco e $NaOH$ per i campioni di ossido di zinco.

Inoltre, mediante analisi TEM è stato osservato che sono state ottenute nanoparticelle di solfuro di zinco con dimensioni di circa 10 nm, sia per i campioni puri che per quelli drogati al 3% at. ottenuti tramite entrambi gli approcci sintetici. Si parla dei campioni di ZnS puro e drogato al 3% at., sintetizzati mediante approccio idrotermale con rapporto tra Zn^{2+}/Na_2S di 1/1,6 e dei campioni di ZnS puro e drogato al 3% at. sintetizzati mediante approccio biogenico con rapporto Zn^{2+}/Na_2S pari a 1/2. Entrambi i campioni sono caratterizzati da una ridotta distribuzione dimensionale ($PDI = 0,2$).

Il drogaggio con ioni europio però porta alla formazione di fasi secondarie, attribuibili a ossidi e idrossidi di europio, che sono state analizzate mediante una

procedura di Search and Match, come precedentemente discusso. Esse sono presenti principalmente nei campioni di ossido di zinco sintetizzati mediante entrambi gli approcci sintetici. Invece, la maggior parte dei campioni di solfuro di zinco non presentano fasi secondarie e in particolare, campioni di solfuro di zinco ottenuti mediante approccio idrotermale con rapporto Zn^{2+}/Na_2S pari a 1/1,6, non presentano fasi cristalline diverse dalla sfalerite, per tutti i campioni della serie (campione puro e drogati al 1%, 2% e 3% at. rispetto alle moli di zinco). Mediante analisi ICP-MS e spettroscopia EDX, è stato dimostrato che, per entrambi gli approcci sintetici, l'incorporazione del drogante europio è più efficace nei campioni di solfuro di zinco rispetto ai campioni di ossido di zinco. Essi sono infatti caratterizzati da una percentuale atomica sperimentale di europio confrontabile con quella teorica: è dunque possibile che sia avvenuta una reale incorporazione degli ioni di europio all'interno della struttura cristallina, i.e., un effettivo drogaggio della matrice di ZnS.

Le proprietà ottiche dei campioni sintetizzati sono state valutate mediante l'acquisizione di spettri in riflettanza diffusa e di emissione. I campioni che presentano band gap maggiormente confrontabili con la letteratura sono quelli di solfuro di zinco sintetizzati mediante approccio idrotermale (ca. 3,4 eV). Inoltre, nei campioni sintetizzati mediante approccio idrotermale, sia per l'ossido di zinco che per il solfuro di zinco è possibile osservare le transizioni caratteristiche del drogante e le transizioni elettroniche all'interno della banda proibita della matrice di ZnS, dovute all'aggiunta di ione Eu^{3+} . Queste proprietà sono molto importanti in vista della possibile applicazione delle nanoparticelle in questione nel campo del *bioimaging ottico*. Infatti, in particolare per quanto riguarda il solfuro di zinco sintetizzato per via idrotermale, le ridotte dimensioni delle nanoparticelle le rendono facilmente penetrabili all'interno di cellule e tessuti. Inoltre, l'efficace incorporazione dell'europio all'interno della matrice cristallina di ZnS permette di osservare transizioni elettroniche all'interno della banda proibita di ZnS che portano ad uno shift verso il rosso della banda di emissione del nanomateriale sintetizzato. In questo modo è possibile aumentare la lunghezza d'onda utile ad eccitare il campione in modo che cada vicino al *NIR (Near-Infra Red)*, regione antistante l'IR che va dai 780 ai 2500 nm ("finestra biologica"). In questo caso

però, in nessun campione è visualizzabile la transizione caratteristica dell'europio ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ la cui banda di emissione si trova intorno ai 789 nm.

Al contrario, le nanoparticelle di ossido di zinco sintetizzate mediante approccio idrotermale e biogenico non possono essere utilizzate nell'ambito del *bioimaging* ottico, in quanto presentano dimensioni medie molto elevate, in particolar modo mediante approccio biogenico (dimensioni medie nell'ordine dei micron). Però, in futuro si potrebbe effettuare una variazione sistematica del rapporto molare tra il precursore di zinco e l'agente precipitante (NaOH), allo scopo di ridurre le dimensioni delle nanoparticelle di ZnO.

Per un'eventuale applicazione delle nanostrutture sintetizzate, in ambito biomedico è inoltre necessario condurre delle analisi di citotossicità, come per esempio il conseguimento di saggi clonogenici (come saggio MTS o MTT)[152]. Inoltre, è necessaria la funzionalizzazione superficiale delle stesse, al fine di: i) renderle disperdibili in ambiente fisiologico, ii) stabilizzarle per effetto sterico in modo da evitare l'aggregazione e iii) attribuire specifiche proprietà di riconoscimento molecolare. In più, sarebbe necessario un approfondimento delle qualità di fotoluminescenza delle stesse, con determinazione della resa quantica di fluorescenza, e l'ottimizzazione della percentuale di ione drogante in funzione di essa. Infine, un'ulteriore prospettiva di sviluppo che può essere intrapresa a partire da questo elaborato di tesi, riguarda l'esplorazione di *doping* multiplo del solfuro di zinco in modo da conseguire specifiche proprietà di luminescenza (i.e. *multiplexing emission*).

BIBLIOGRAFIA

1. Walter, P., Welcomme, E., and Hallégot, P. (2006) Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula. *Nano Lett.*, **6**, 2215–2219.
2. Jeevanadam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., and Dufresne, A. (2018) No Title. *Beilstein J. Nanotechnol.*, **9**, 1050–1074.
3. Heiligtag, F.J., and Niederberger, M. (2013) The fascinating world of nanoparticle research. *Mater. Today*, **16**, 262–271.
4. Carvalho, D. (1904) *Forty Centuries of Ink*.
5. Zsigmondy, R. (1914) *Colloids and the ultramicroscope*, New York.
6. Feynman, R.P. (1960) An invitation to enter a new field of physics. *Eng. Sci.*, **23**, 22–36.
7. Dowling, A., Clift, R., and Grobert, N. (2004) Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties. *London R. Soc. R. Acad. Eng. Rep.*, **46**, 618–618.
8. Schubert, U., and Husing, N. (2012) *Synthesis of Inorganic Materials*.
9. Alivisatos, A.P. (1996) Semiconductor Clusters , Nanocrystals , and Quantum Dots. **271** (5251), 933–937.
10. Taniguchi, N. (1974) On the basic concept of nanotechnology. *Proc. Int. Conf. Prod. Eng.*, (PART II), 18–23.
11. Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, M., and Laird Forrest, P. (2012) Toxicity of nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2323–2343.
12. Medintz, I.L., Uyeda, H.T., and Goldman, E.R. (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.*, **4**, 435–446.
13. Selvan, S.T. (2010) Functional and Multifunctional Nanoparticles for Bioimaging and Biosensing. *Am. Chem. Soc.*, **26** (14), 11631–11641.

14. Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R. (2008) Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, **4** (1), 26–49.
15. Yu, Z., Ma, X., Yu, B., and Pan, Y. (2012) Synthesis and characterization of ZnS:Mn/ZnS core/shell nanoparticles for tumor targeting and imaging in vivo. *J. Biomater. Appl.*, **0**, 1–9.
16. Klingshirn, C.F. (2007) ZnO: Material, physics and applications. *ChemPhysChem*, **8** (6), 782–803.
17. von Embden, J., Gross, S., Kittilstved, K.R., and Della Gaspera, E. (2023) Colloidal Approaches to Zinc Oxide Nanocrystals. *Chem. Rev.*, **123** (1), 271–326.
18. Fang, X., Zhai, T., Gautam, U.K., Li, L., Wu, L., Bando, Y., and Golberg, D. (2011) ZnS nanostructures: From synthesis to applications. *Prog. Mater. Sci.*, **56** (2), 175–287.
19. Baig, N., Kammakam, I., Falath, W., and Kammakam, I. (2021) Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater. Adv.*, **2** (6), 1821–1871.
20. Anastas, P.T., and Warner, J.C. (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*, New York.
21. Faramarzi, M.A., and Sadighi, A. (2013) Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **189–190**, 1–20.
22. Asadian, M. (2013) Thermodynamic Analysis of ZnO Crystal Growth from the Melt. *J. Cryst. Process Technol.*, **3**, 75–80.
23. Morkoç, H., & Özgür, Ü. (2009) *Zinc Oxide: Fundamentals, Materials and Device Technology*.
24. Sirelkhatim, A., Mahmud, S., and Seeni, A. (2015) Review on Zinc Oxide Nanoparticles : Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.*, **7**, 219–242.

25. Lin Wang, Z. (2004) Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *J. Phys. Condens. Matter.*, **16**, 829–858.
26. Samadi, M., Zirak, M., and Naseri, A. (2019) Design and tailoring of one-dimensional ZnO nanomaterials for photocatalytic degradation of organic dyes: a review. *Res. Chem. Intermed.*, **45** (4), 2197–2254.
27. Wang, Z.L. (2004) Nanostructures of zinc oxide. *Mater. Today*, **7**, 26–33.
28. Baruah, S., and Dutta, J. (2009) Hydrothermal growth of ZnO nanostructures. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **10**, 1.
29. Zare, M., Namratha, K., and Byrappa, K. (2022) Emerging Trends for ZnO Nanoparticles and Their Applications in Food Packaging. *ACS Food Sci. Technol.*, **2**, 763–781.
30. Zhang, Z., and Xiong, H.M. (2015) Photoluminescent ZnO Nanoparticles and Their Biological Applications. *Materials (Basel)*, **8** (6), 3101–3127.
31. Naveed Ul Haq, A., Nadhman, A., and Ullah, I. (2017) Synthesis Approaches of Zinc Oxide Nanoparticles: The Dilemma of Ecotoxicity. *J. Nanomater.*
32. Xiong, H.M. (2013) ZnO Nanoparticles Applied to Bioimaging and Drug Delivery. *Adv. Mater.*, **25** (37), 5329–5335.
33. Gil, H.M., and Price, T.W. (2021) NIR-quantum dots in biomedical imaging and their futur. *iScience*, **24** (3), 102189.
34. Zhang, L., Yin, L., and Wang, C. (2010) Origin of Visible Photoluminescence of ZnO Quantum Dots: Defect-Dependent and Size-Dependent. *J.Phys. Chem. C*, **114** (21), 9651–9658.
35. Sharma, A., Singh, B.P., and Dhar, S. (2012) Effect of surface groups on the luminescence property of ZnO nanoparticles synthesized by sol–gel route. *Surf. Sci.*, **606** (3), L13–L17.
36. Xiong, H.M. (2010) Photoluminescent ZnO nanoparticles modified by polymers. *J. Mater. Chem.*, **20** (21), 4251–4262.

37. Khataee, A., Karimi, A., Zarei, M., and Joo, S.W. (2015) Eu-doped ZnO nanoparticles: sonochemical synthesis, characterization, and sonocatalytic application. *Ultrason. Sonochem*, **67**, 102822.
38. Zhang, Y., Nayak, T.R., and Hong, H. (2013) Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials. *Curr Mol Med*, **13** (10), 1633–1645.
39. Müller, H., Kulkarni, K., and Mottskin, J. (2010) pH-Dependent Toxicity of High Aspect Ratio ZnO Nanowires in Macrophages Due to Intracellular Dissolution. *ACS Nano*, **4** (11), 6767–6779.
40. A Rama Narishima, R. (2018) Valuation of In Vitro Cytotoxicity of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Using Human Cell Lines. *J. Toxicol. Risk Assess.*, **4** (1).
41. Mohan, S., and Vellakkat, M. (2020) Hydrothermal synthesis and characterization of Zinc Oxide nanoparticles of various shapes under different reaction conditions. *Nano Express*, **1** (3).
42. Zhang, Y., Leu, Y.R., and Aitken, R.J. (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 Heal.*, **12** (8), 8717–8743.
43. Kolodziejczak-Radzimska, A., and Jesionowski, T. (2014) Zinc Oxide—From Synthesis to Application. *Mater.*, **7** (4), 2833–2881.
44. Hong, R.Y., Li, J.H., Chen, L.L., Liu, D.Q., and Li, H.Z. (2009) Synthesis, surface modification and photocatalytic property of ZnO nanoparticles. *Powder Technol.*, **189** (3), 426–432.
45. Smijs, T.G. (2011) Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol Sci Appl*, **4**, 95–112.
46. Sharma, D.K., Shukla, S., and Sharma, K.K. (2022) A review on ZnO: Fundamental properties and applications. *Mater. Today Proc.*, **49**, 3028–3035.

47. Barick, K.C., Nigam, S., and Bahadur, D. (2010) Nanoscale assembly of mesoporous ZnO: A potential drug carrier. *J. Mater. Chem.*, **20**, 6446.
48. Yuan, Q., Hein, S., and Misra, R.D.K. (2010) New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: synthesis, characterization and in vitro drug delivery response. *Acta Biomater*, **6**, 2732.
49. Muhammad, F., Guo, M.Y., Qi, W.X., Sun, F.X., Wang, A.F., Guo, Y.J., and Zhu, G.S. (2011) pH-triggered controlled drug release from mesoporous silica nanoparticles via intracellular dissolution of ZnO nanolids. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 8778.
50. Sun, H., Du, W., and Peng, Q. (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.
51. Haynes, W.M. (2014) *Handbook of Chemistry and Physics 95th Edition*.
52. Yeh, C.Y., Lu, Z., Froyen, S., and Zunger, A. (1992) Zinc-blende - wurtzite polytypism in semiconductors. *Phys. Rev. B*, **46**, 10086–10097.
53. Fang, X., Zhai, T., and Gautam, U. (2011) ZnS nanostructures: From synthesis to applications. *Prog. Mater. Sci.*, **56**, 175–287.
54. Vogt, P., and Esser, N. (2014) Surface and Interface Science. *Wiley VCH*, **3**, 101–176.
55. Barin, I., Knacke, O., and Kubshewski, O. (1977) *Thermochemical Properties of Inorganic Substances*, Berlin.
56. Engel, G.E. (1990) Simulation of polytype formation in zinc sulphide. *J. Phys. Condens. Matter*, **2**, 6905–6919.
57. Denzler, D., Olschewski, M., and Sattler, K. (1998) Luminescence studies of localized gap states in colloidal ZnS nanocrystals. *J. Appl. Phys.*, **84**, 2841–2845.

58. Zhang, H., and Banfield, J.F. (2009) Identification and Growth Mechanism of ZnS Nanoparticles with Mixed Cubic and Hexagonal Stacking. *J. Phys. Chem.*, **113**, 9681–9687.
59. Ves, S., and Schwarz, U. (1990) Cubic ZnS under pressure: Optical-absorption edge, phase transition, and calculated equation of state. *Phys. Rev. B*, **42**, 9113–9118.
60. Desgreniers, S., and Beaulieu, L. (2000) Pressure-induced structural changes in ZnS. *Phys. Rev. B*, **61**, 8726–8733.
61. Wang, X., Shi, J., Feng, Z., Li, M., and Li, C. (2011) Visible emission characteristics from different defects of ZnS nanocrystals. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 4715–4723.
62. Shannon, R.D., H. M., Baur, N.H., Gibbs, O.H., Eu, M., and Cu, V. (1976) Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides *Acta Cryst.* (1969), **B25**, 925-945.
63. Kurnia, F., and Hart, J. (2015) Band-Gap Control of Zinc Sulfide: Towards an Efficient Visible-Light-Sensitive Photocatalyst. *ChemPhysChem*, **16**, 2397–2402.
64. Hu, H., and Zhang, W. (2006) Synthesis and properties of transition metals and rare-earth metals doped ZnS nanoparticles. *Opt. Mater.*, **28**, 536–550.
65. Corrado, C., Cooper, J., and Zhang, J. (2012) Cu-Doped ZnS Nanocrystals: Synthesis, Structure, and Optical Properties. *Sci. Adv. Mater*, **4**, 254–265.
66. Soo, Y.L., Ming, Z.H., and Huang, S.W. (1994) Local structures around Mn luminescent centers in Mn-doped nanocrystals of ZnS. *Phys. Rev. B*, **50**, 7602–7607.
67. Boyn, R. (1988) 4f–4f Luminescence of Rare-Earth Centers in II–VI Compounds. *Phys. Status Solidi*, **148**, 11–47.
68. Kobayashi, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P.L., and Urano, Y. (2010) New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging.

- Chem. Rev.*, **110**, 2620–2640.
69. Wegner, J., and Ceylan, S. (2011) Ten key issues in modern flow chemistry. *Chem. Commun*, **47**, 4583–4592.
 70. Tajoli, F., Dengo, N., Mognato, M., Dolcet, P., and Gross, S. (2020) Microfluidic Crystallization of Surfactant-Free Doped Zinc Sulfide Nanoparticles for Optical Bioimaging Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **12** (39), 44074–44087.
 71. Mohammad, F., and Al-Lohedan, H.A. (2016) Toxicity assessment of engineered Mn–ZnS quantum dots in vitro. *J Mater Sci*, **51** (20), 9207–9216.
 72. Weilnau, J.N., Black, S.E., and Chehata, V.J. (2013) ZnS nanocrystal cytotoxicity is influenced by capping agent chemical structure and duration of time in suspension. *J. Appl. Toxicol.*, **33** (3), 227–237.
 73. <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/z/zinc-sulfide.html>.
 74. Kaur, N., Kaur, S., Singh, J., and Rawat, M. (2016) Review on Zinc Sulphide Nanoparticles: From Synthesis, Properties to Applications. *J Bioelectron Nanotechnol*, **1** (1), 5.
 75. Labiadh, H., Lahbib, K., and Hidouri, S. (2016) Insight of ZnS nanoparticles contribution in different biological uses. *Pacific J. Trop. Med.*, **9** (8), 757–762.
 76. Ajibade, P.A., Oluwalana, A.E., Sikakane, B.M., and Singh, M. (2020) photocatalytic and anticancer studies of hexadecylamine capped ZnS nanoparticles. *Chem. Phys. Lett.*, **7**, 755.
 77. Caires, A.J., Mansur, A.A.P., and Carvalho, S.M. (2020) Green synthesis of ZnS quantum dot/biopolymer photoluminescent nanoprobe for bioimaging brain cancer cells. *Mater. Chem. Phys.*, **244**, 122716.
 78. Gorai, S. (2019) A review on biogenic synthesis of ZnS nanoparticles and

- potential applications. *J. Indian Chem. Soc.*, **97**, 2972–2980.
79. Reber, J.F., and Meier, K. (1984) Photochemical production of hydrogen with zinc sulfide suspensions. *J. Phys. Chem.*, **88** (24), 5903–5913.
 80. Pfaff, G. (2021) Zinc sulfide pigments. *Phys. Sci. Rev.*, **6** (8), 369–373.
 81. Bretos, I., Diodati, S., Jimenez, R., Tajoli, F., Ricote, J., Bragaggia, G., Franca, M., Calzada, M.L., and Gross, S. (2020) Low-Temperature Solution Crystallization of Nanostructured Oxides and Thin Films. *A Eur. J.*, **26** (42), 9157–9179.
 82. Abid, N., Khan, A.M., Shujait, S., Chaudhary, K., Ikram, M., Imran, M., Haider, J., Khan, M., Khan, Q., and Maqbool, M. (2022) Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **300** (December 2021), 102597.
 83. Della Gaspera, E. Special Issue “Wet Chemical Synthesis of Functional Nanomaterials”. **11** (4), 1044.
 84. Nikam, A.V., Prasad, B.L.V., and Kulkarni, A.A. (2018) Wet chemical synthesis of metal oxide nanoparticles: a review. *Cryst Eng Comm*, **20** (35), 5091–5107.
 85. Patil, N., Bhaskar, R., and Vyavhare, V. (2021) Overview on methods of synthesis of nanoparticles. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, **13**, 11–16.
 86. Mohammed, L., Gomaa, H.G., Ragab, D., and Zhu, J. (2017) Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, **30**, 1–14.
 87. Ingle, A., Biswas, A., Vanlalveni, C., Lalfakzuala, R., Gupta, I., Ingle, P., Rokhum, S.L., and Rai, M. (2020) Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Their Role in the Management. *CRC Press.*, 135–162.
 88. Diodati, S., Dolcet, P., Casarin, M., and 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.

89. Yang, G., and Park, S.J. (2019) Conventional and microwave hydrothermal synthesis and application of functional materials: A review. *Materials (Basel)*, **12** (7).
90. Diodati, S., Hennemann, J., Fresno, F., Gialanella, S., Dolcet, P., Lavrenčič Štangar, U., Smarsly, B.M., and Gross, S. (2019) Easy and Green Route towards Nanostructured ZnO as an Active Sensing Material with Unexpected H₂S Dosimeter-Type Behaviour. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2019** (6), 837–846.
91. Diodati, S., Pandolfo, L., Caneschi, A., Gialanella, S., and Gross, S. (2014) Green and low temperature synthesis of nanocrystalline transition metal ferrites by simple wet chemistry routes. *Nano Res.*, **7** (7), 1027–1042.
92. Einarsrud, M.A., and Grande, T. (2014) 1D oxide nanostructures from chemical solutions. *Chem. Soc. Rev.*, **43** (7), 2187–2199.
93. Rabenau, A. (1985) The Role of Hydrothermal Synthesis in Preparative Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 1026–1040.
94. Byrappa, K. and Yoshimura, M. (2001) *Handbook of Hydrothermal Technology*.
95. Dem'yanets, L.N., Li, L.E., and Uvarova, T.G. (2006) Zinc oxide: Hydrothermal growth of nano- and bulk crystals and their luminescent properties. *J. Mater. Sci.*, **41** (5), 1439–1444.
96. Jin, Y., An, C., Tang, K., Huang, L., and Shen, G. (2003) Hydrothermal synthesis and characterization of CuIn_{2.0}Se_{3.5} nanocrystallites. *Mater. Lett.*, **57**, 4267–4270.
97. Ehrentraut, D., Sato, H., Kagamitani, Y., Sato, H., Yoshikawa, A., and Fukuda, T. (2006) Solvothermal growth of ZnO. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, **52** (4), 280–335.

98. Khanna, P., Kaur, A., and Goyal, D. (2019) Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *J. Microbiol. Methods*, **163** (September 2018), 105656.
99. Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S.K., and Poinern, G.E.J. (2015) Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*, **2015**, 8(11), 7278-7308.
100. Makarov, V. V, Love, A.J., Sinitsyna, O. V, Makarova, S.S., and Yaminsky, I. V (2014) “ Green ” Nanotechnologies : Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *ActaNaturae* **6** (20), 35–44.
101. Iravani, S. (2011) Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, **13** (10), 2638–2650.
102. Begum, N.A., Mondal, S., Basu, S., and Laskar, R.A. (2009) Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **71** (1), 113–118.
103. Karnan, T., and Selvakumar, S.A.S. (2016) Biosynthesis of ZnO nanoparticles using rambutan (*Nephelium lappaceum*L.) peel extract and their photocatalytic activity on methyl orange dye. *J. Mol. Struct.*, **1125**, 358–365.
104. Azizi, S., Ahmad, M.B., Namvar, F., and Mohamad, R. (2014) Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using brown marine macroalga *Sargassum muticum* aqueous extract. *Mater. Lett.*, **116**, 275–277.
105. Rajabi, H.R., Sajadiasl, F., Karimi, H., and Alvand, Z.M. (2020) Green synthesis of zinc sulfide nanophotocatalysts using aqueous extract of *Ficus Johannis* plant for efficient photodegradation of some pollutants. *J. Mater. Res. Technol.*, **9** (6), 15638–15647.
106. Hibberd, D.J. (1981) Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, **82** (2), 93–119.

107. Lubian, M.L. (1982) *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Nannochloropsis Gaditana Sp. Nov., Una Nueva Eustigmatophyceae Mar.*, **4**, 287–293.
108. Rocha, J.M.S., Garcia, J.E.C., and Henriques, M.H.F. (2003) Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol. Eng.*, **20**, 237–242.
109. Chini Zittelli, G., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M., and Tredici, M.R. (1999) Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Prog. Ind. Microbiol.*, **35**, 299–312.
110. Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G.M., Bertucco, A., and Morosinotto, T. (2012) Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS One*, **7**, 38975.
111. Weissleder, R., and Mahmood, U. (2018) Molecular imaging. *Radiology*, **219**, 316–333.
112. Massoud, T.F., and Gambhir, S.S. (2003) Molecular imaging in living subjects: Seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev.*, **17**, 545–580.
113. Janssen, Y.M., Van Houten, B., Borm, P.J., and Mossman, B.T. (1993) Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest*, **69**, 261–274.
114. Eliseeva, S. V., and Bunzli, J.C.G. (2010) Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 189–227.
115. Bunzli, J.C.G. (2010) Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. *Chem. Rev.*, **110**, 2729–2755.
116. Williams, D.F. (2008) On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, **29**, 2941–2953.
117. Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., and

- Nann, T. (2008) Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods*, **5**, 763–775.
118. Butner, R.W., and McPherson, A.R. (1983) Adverse reactions in intravenous fluorescein angiography. *Ann. Ophthalmol.*, **15**, 1084.
 119. Hope-Ross, M., Yannuzzi, L.A., Gragoudas, E.S., Guyer, D.R., Slakter, J.S., Sorenson, J.A., Krupsky, S., Orlock, D.A., and Puliafito, C.A. (1994) Adverse reactions due to indocyanine green. *Ophthalmology*, **101**, 529.
 120. Chan, W.C.W., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., and Nie, S. (2002) Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 40–46.
 121. Larson, D.R., Zipfel, W.R., Williams, R.M., Clark, S.W., Bruchez, M.P., Wise, F.W., and Webb, W.W. (2003) Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science*, **300**, 1434–1436.
 122. Ohlen, K., Chang, Y., Hegemann, W., Yin, C., and Lee, S. (2005) Enhanced degradation of chlorinated ethylenes in groundwater from a paint contaminated site by two-stage fluidized-bed reactor. *Chemosphere*, **58**, 373–377.
 123. Li, J., Chen, Z., Wang, R.J., and Proserpio, D.M. (1999) Low temperature route towards new materials: Solvothermal synthesis of metal chalcogenides in ethylenediamine. *Coord. Chem. Rev.*, **190–192**, 707–735.
 124. Gautam, U.K., Ghosh, M., Rajamathi, M., and Seshadri, R. (2002) Solvothermal routes to capped oxide and chalcogenide nanoparticles. *Pure Appl. Chem.*, **74** (9), 1643–1649.
 125. Cansell, F., Chevalier, B., Demourgues, A., Etourneau, J., Even, C., Garrabos, Y., Pessey, V., Petit, S., Tressaud, A., and Weill, F. (1999) Supercritical fluid processing: A new route for materials synthesis. *J. Mater. Chem.*, **9** (1), 67–75.
 126. Demazeau, G. (1999) Solvothermal processes: A route to the stabilization of new material. *J. Mater. Chem.*, **9** (1), 15–18.

127. Yu, S.H. (2001) Hydrothermal/solvothermal processing of advanced ceramic materials. *J. Ceram. Soc. Japan*, **109** (1269).
128. Hayashi, H., and Hakuta, Y. (2010) Hydrothermal Synthesis of metal oxide nanoparticles in supercritical water. *Materials (Basel)*, **3** (7), 3794–3817.
129. Jin, Y., An, C., Tang, K., Huang, L., and Shen, G. (2003) Hydrothermal synthesis and characterization of CuIn₂Se₃ nanocrystallites. *Mater. Lett.*, **57** (26–27), 4267–4270.
130. Rajamathi, M., and Seshadri, R. (2002) Oxide and chalcogenide nanoparticles from hydrothermal/solvothermal reactions. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, (6), 337–345.
131. Denzler, D., Olschewski, M., and Sattler, K. (1998) Luminescence studies of localized gap states in colloidal ZnS nanocrystals. *J. Appl. Phys.*, **84** (5), 2841–2845.
132. Dinnebier, R., and Billinge, S. (2008) *Powder Diffraction - Theory and Practice*, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
133. Bol, A.A., Van Beek, R., and Meijerink, A. (2002) On the incorporation of trivalent rare earth ions in II-VI semiconductor nanocrystals. *Chem. Mater.*, **14** (3), 1121–1126.
134. Girish Kumar, S., and Kavitha, R. (2021) Lanthanide ions doped ZnO based photocatalysts. *Sep. Purif. Technol.*, **274** (April), 118853.
135. Singh Lotey, G., Jindal, Z., Singhi, V., and Verma, N.K. (2013) Structural and photoluminescence properties of Eu-doped ZnS nanoparticles. *Mater. Sci. Semicond. Process.*, **16** (6), 2044–2050.
136. Yang, J., Mei, S., and Ferreira, M.F. (2000) Hydrothermal Synthesis of Nanosized Titania Powders: Influence of Peptization and Peptizing Agents on the Crystalline Phases and Phase Transitions. *J. Am. Ceram. Soc.*, **83** (6), 1361–68.
137. Tinello, S. (2022) Optimisation of a green synthesis of zinc oxide

nanoparticles exploiting an algae-mediated biogenic approach.

138. Kurnia, F., and Hart, J. (2015) Band-Gap control of Zinc Sulfide Towards an Efficient Visible-Light-Sensitive Photocatalyst. *Chem-PhysChem*, **16**, 2397–2402.
139. Deng, Z., Tong, L., Flores, M., Lin, S., Cheng, J.-X., and Yan, H. (2011) High-Quality Manganese-Doped Zinc Sulfide Quantum Rods with Tunable Dual-Color and Multiphoton Emissions. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 5389–5396.
140. Pedersen, K. (2006) Quantum Size Effects in Nanostructures. *APS Meet. Abstr.*, (August).
141. Dash, D., Panda, N.R., and Sahu, D. (2019) Photoluminescence and photocatalytic properties of europium doped ZnO nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.*, **494** (March), 666–674.
142. Vinoditha, U., Sarojini, B.K., Sandeep, K.M., Narayana, B., Maidur, S.R., Patil, P.S., and Balakrishna, K.M. (2019) Defects-induced nonlinear saturable absorption mechanism in europium-doped ZnO nanoparticles synthesized by facile hydrothermal method. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, **125** (6), 1–11.
143. Ashtaputre, S.S., Nojima, A., Marathe, S.K., Matsumura, D., Ohta, T., Tiwari, R., Dey, G.K., and Kulkarni, S.K. (2008) Investigations of white light emitting europium doped zinc oxide nanoparticles. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, **41** (1).
144. Binnemans, K. (2015) Interpretation of europium(III) spectra. *Coord. Chem. Rev.*, **295**, 1–45.
145. Qu, S.C., Zhou, W.H., and Liu, F.Q. (2002) Photoluminescence properties of Eu³⁺-doped ZnS nanocrystals prepared in a water/methanol solution. *Appl. Phys. Lett.*, **80**, 3605.
146. Djurišić, A.B., and Leung, Y.H. (2006) Optical properties of ZnO nanostructures. *Small*, **2** (8–9), 944–961.

147. Gu, Y., Kuskovsky, I.L., Yin, M., O'Brien, S., and Neumark, G.F. (2004) Quantum confinement in ZnO nanorods. *Appl. Phys. Lett.*, **85** (17), 3833–3835.
148. Buschmann, C. (2007) Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynth. Res.*, **92** (2), 261–271.
149. Bragg, W.H., and Bragg, W.L. (1913) The reflection of X-rays by crystals. *Proc. R. Soc. London A Math. Phys. Eng. Sci.*, **88**, 428–438.
150. Scherrer, P. (1918) Bestimmung der Größe und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. *Nachrichtenvon der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen*, **2**, 98–100.
151. Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Elicieri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat. Methods*, **9** (671–675).
152. Fard, J.K., Jafari, S., and Eghbal, M.A. (2015) A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Adv Pharm Bull*, **5** (4), 447–454.