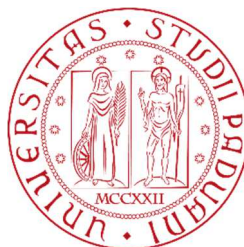


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Chimiche



Corso di Laurea Magistrale in Chimica

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

NANOPARTICELLE CORE-SHELL DI Ag@TiO₂ PER
NANOTERMOMETRIA RAMAN

Relatore: Prof.ssa Raffaella Signorini

Correlatore: Prof.ssa Silvia Gross

Controrelatore: Prof. Gian Andrea Rizzi

Laureando: Roberto Zambon

Anno Accademico 2021 - 2022

Abstract

La determinazione della temperatura locale è essenziale per comprendere i fenomeni di trasporto termico a livello nanometrico e per la progettazione di nanodispositivi per applicazioni biomediche, fotoniche e optoelettroniche. In particolar modo, con l'emergere della terapia fototermica per il trattamento locale dei tessuti cancerosi si è resa necessaria la disponibilità di tecniche nanotermometriche ad alta risoluzione spaziale in grado di determinare e di modificare da remoto la temperatura intracellulare. Sotto questo punto di vista, la spettroscopia Raman si mostra adeguata allo scopo: il rapporto tra le intensità dei segnali anti-Stokes e Stokes di uno specifico modo normale di vibrazione di un materiale Raman attivo, segue infatti la distribuzione di Boltzmann, legata alla temperatura locale.

Nel presente lavoro di tesi, nanoparticelle costituite da un core di Ag ricoperto da una shell di TiO_2 , ovvero core-shell Ag@TiO_2 , sono state opportunamente sintetizzate attraverso un metodo *one-pot* e un processo a due stadi, seguiti da un trattamento solvotermale. I nanocompositi sono stati quindi caratterizzati tramite spettroscopia UV/Vis, Dynamic Light Scattering (DLS), Diffrazione a Raggi X (XRD), High Resolution Transmission Electronic Microscopy (HRTEM) e spettroscopia Raman. Il loro possibile impiego nell'ambito della terapia fototermica è reso ottimale dalla presenza di un core di nanoparticelle d'argento, che funge in contemporanea da *nanoheater* e da substrato plasmonico, e da una shell di anatasio, materiale biocompatibile, che funge da nanotermometro Raman.

Indice

Introduzione	1
La Nanotermometria	3
1.1 <i>Temperatura</i>	3
1.2 <i>Temperatura Locale</i>	4
1.3 <i>Scale Termometriche</i>	5
1.4 <i>Nanotermometri</i>	6
1.5 <i>Nanotermometri a Contatto</i>	8
1.6 <i>Nanotermometri Luminescenti</i>	9
1.7 <i>Nanotermometri Non Luminescenti</i>	10
Nanotermometria Raman nella Terapia Fototermica del Cancro	11
2.1 <i>Trattazione Classica</i>	11
2.2 <i>Trattazione Quanto-Meccanica</i>	12
2.3 <i>Lo Spettro Raman</i>	14
2.4 <i>Spettroscopia SERS</i>	16
2.5 <i>Nanotermometria Raman</i>	17
2.6 <i>Terapia Fototermica</i>	19
Nanoparticelle Core-Shell di Ag@TiO ₂	21
3.1 <i>Nanoparticelle d'Argento</i>	22
3.2 <i>Nanoparticelle di Titania</i>	23
3.3 <i>Core-shell di Ag@TiO₂</i>	25

3.4	<i>Sintesi di Core-Shell di Ag@TiO₂</i>	26
3.5	<i>Sintesi One-Pot</i>	27
3.6	<i>Sintesi a Due Stadi</i>	29
3.7	<i>Sintesi Assistita da Radiazioni</i>	30
3.8	<i>Sintesi con Micelle Inverse</i>	30
3.9	<i>Cristallizzazione della Shell</i>	31
	Sezione Sperimentale.....	31
	Materiali e Metodi.....	33
4.1	<i>Sintesi di Nanoparticelle d'Argento in DMF</i>	34
4.2	<i>Sintesi di Nanoparticelle di Anatasio</i>	35
4.3	<i>Sintesi One-Pot di Ag@TiO₂</i>	36
4.4	<i>Sintesi di Nanoparticelle d'Argento con Citrato</i>	38
4.5	<i>Sintesi a Due Stadi di Ag@TiO₂</i>	39
	Caratterizzazione	41
5.1	<i>Spettroscopia UV/Visibile</i>	41
5.2	<i>Analisi DLS</i>	42
5.3	<i>Diffrazione a Raggi X</i>	44
5.4	<i>Microscopia Elettronica a Scansione ed EDX</i>	46
5.5	<i>Strumentazione Raman</i>	47
5.6	<i>Protocollo per la nanotermometria</i>	48
	Risultati e Discussione	51
6.1	<i>Sintesi di Nanoparticelle d'Argento</i>	51
6.2	<i>Sintesi di Nanoparticelle di Anatasio</i>	55
6.3	<i>Sintesi One-Pot di Ag@TiO₂</i>	59
6.4	<i>Riepilogo della Sintesi One-Pot di Ag@TiO₂</i>	69
6.5	<i>Sintesi a Due Stadi di Ag@TiO₂</i>	71

6.6	<i>Riepilogo della Sintesi a Due Stadi di Ag@TiO₂</i>	79
6.7	<i>Nanotermometria</i>	79
	Conclusioni.....	87
	Appendice.....	91
	A. <i>Acronimi e Abbreviazioni</i>	91
	B. <i>Costanti</i>	93
	C. <i>Frase di Pericolo (H)</i>	93
	D. <i>Consigli di Prudenza (P)</i>	93
	Riferimenti Bibliografici.....	95
	Ringraziamenti.....	101

Parte I

Introduzione

Capitolo 1

La Nanotermometria

Disciplina afferente agli ambienti della fisica e dell'ingegneria, la nanotermometria è definita come la determinazione della temperatura e delle sue variazioni nell'intervallo dimensionale dei micro e dei nanometri [1] [2]. La necessità di determinare localmente la temperatura è emersa con lo sviluppo di dispositivi sempre più piccoli ed efficienti per applicazioni nella micro e optoelettronica. Per minimizzare la conseguente drammatica produzione di calore e risolvere problemi di progettazione e realizzazione di questi strumenti, è fondamentale possedere la conoscenza dei meccanismi di riscaldamento termico alla nanoscala, del tutto differenti da quelli osservabili a livello macroscopico.

La nanotermometria nel tempo ha trovato applicazioni in settori quali la microfluidica, la nanomedicina, la fotonica e lo studio di reazioni chimiche e biochimiche. Ciò ha stimolato la ricerca a migliorare le proprietà dei materiali tradizionalmente impiegati o a svilupparne di nuovi. In questo capitolo verrà introdotta la nanotermometria a partire dal concetto chiave di temperatura locale, per poi definire le scale termometriche in uso ed enunciare le caratteristiche di un termometro alla nanoscala. La trattazione sarà conclusa presentando le principali tecniche impiegate nell'analisi nanotermometrica.

1.1 Temperatura

La nozione di temperatura è da sempre legata alla nostra esperienza per cui un corpo al tatto appare essere più caldo o più freddo rispetto ad un altro. Se si considera un sistema termodinamico suddivisibile in due o più parti in grado di scambiare energia fra di loro, esso è definito essere in equilibrio termico quando la sua energia è stazionaria, dunque costante [3]. Ne deriva che le sue parti costituenti hanno la stessa temperatura, conclusione valida anche nel caso di due sistemi interagenti fra loro. Per giungere ad una definizione quantitativa di temperatura, è necessario ricorrere alla meccanica statistica dove è definita per un insieme canonico come il reciproco della derivata dell'entropia S rispetto all'energia interna \bar{E} , a volume V e numero di particelle N costanti:

$$T^{-1} = \left(\frac{\partial S}{\partial \bar{E}} \right)_{V,N} \quad (\text{eq. 1.1})$$

L'entropia, a sua volta, è espressa nella forma di Von Neumann come il prodotto tra la costante di Boltzmann k_B e la traccia del prodotto tra l'operatore matrice densità $\hat{\rho}$ e il suo logaritmo naturale:

$$S = -k_B \text{Tr} \hat{\rho} \ln \hat{\rho} \quad (\text{eq. 1.2})$$

Notare come la definizione di temperatura riportata in (eq. 1.1) comporti che essa esista fintanto che l'entropia dipende matematicamente dall'energia interna, esplicitata in (eq. 1.3):

$$\bar{E} = \text{Tr} \hat{\rho} \hat{H} \quad (\text{eq. 1.3})$$

dove \hat{H} è l'operatore hamiltoniano la cui azione su un sistema isolato restituisce l'energia del sistema stesso. Secondo le leggi della termodinamica statistica, un sistema sarà all'equilibrio quando la sua entropia assumerà il valore massimo, ovvero quello in cui il suo operatore matrice densità è in forma canonica:

$$\hat{\rho} = \frac{\exp\left(-\frac{\hat{H}}{k_B T}\right)}{Z} \quad (\text{eq. 1.4})$$

Z , detta funzione di partizione, è il fattore di normalizzazione di $\hat{\rho}$ tale da rendere la sua traccia unitaria:

$$Z = \text{Tr}(\hat{H} \hat{\rho}) \quad (\text{eq. 1.5})$$

1.2 Temperatura Locale

Tutte le considerazioni di cui sopra sono riferite all'hamiltoniano di un sistema isolato, dunque non interagente con l'ambiente. Quando si parla di temperatura locale, però, si ha a che fare con una piccola regione all'interno del sistema dove le interazioni con il suo intorno non sono più trascurabili [1] [3]. Anche assumendo una distribuzione canonica per cui ci si trovi localmente all'equilibrio termico, condizione difficile da raggiungere, lo stesso concetto di temperatura perderebbe di significato in quei sistemi sub-micrometrici dove le leggi della termodinamica non sono ragionevolmente applicabili. Una descrizione termodinamica del sistema, difatti, presuppone che la quasi totalità dei suoi microstati abbia le stesse proprietà macroscopiche, ad esempio la temperatura, indipendentemente dalla configurazione assunta dal sistema stesso. L'emergere di queste proprietà intensive all'aumentare delle dimensioni del sistema porta al raggiungimento del limite termodinamico. Lavorare in questo regime, dove tutte le possibili partizioni della regione considerata sono all'equilibrio termico, permette di considerare come equivalenti i profili di temperatura registrati in posizioni discrete successive da un singolo termometro che campiona l'intero sistema e quelli ottenuti da più termometri spazialmente vicini che operano simultaneamente.

Adottando come modello una catena armonica omogenea di particelle dove sono rilevanti solo interazioni a corto raggio, è stato possibile stimare il limite dimensionale inferiore a cui si può parlare di temperatura locale, dunque adottare una descrizione termodinamica, per diversi materiali [1]. Se si suddivide la catena in N_G gruppi di n particelle, la lunghezza minima l_{min} a cui esiste una temperatura intensiva è pari al prodotto tra n_{min} e la costante reticolare a_0 , ovvero la distanza tra le particelle stesse:

$$l_{min} = n_{min} a_0 \quad (\text{eq. 1.6})$$

n_{min} è la minima dimensione del gruppo N_{Gesimo} e la sua definizione cambia se la temperatura assoluta T è maggiore o inferiore della temperatura di Debye Θ del materiale:

$$n_{min} \approx \begin{cases} \frac{2\alpha}{\delta} & \text{per } T > \Theta \\ \frac{3\alpha\Theta^3}{2\pi^2 T^3} & \text{per } T < \Theta \end{cases} \quad (\text{eq. 1.7})$$

dove α e δ sono dei parametri di accuratezza collegati all'energia del gruppo N_{Gesimo} .

Per esempio, per una catena di atomi di silicio ($\Theta=645$ K, $a_0=2.4$ Å) la più piccola regione a cui si può rilevare una temperatura di 1 K è lunga 0.1 m [1] [3]. Questo limite diventa sempre più piccolo all'aumentare della temperatura, e.g. 100 nm alla sua temperatura di Debye, il che comporta una sfida quando si tenti di misurare localmente la temperatura. I risultati appena discussi sono tuttavia da prendere con cautela in quanto basati su un modello monodimensionale dove non sono considerati effetti di riscaldamento o raffreddamento del materiale e che richiede dunque aggiustamenti caso per caso.

1.3 Scale Termometriche

Per misurare in modo concreto la temperatura di un sistema, si ricorre al principio zero della termodinamica, per cui se due sistemi A e B sono in equilibrio termico con un terzo sistema C, allora anche A e B sono in equilibrio termico fra loro e hanno la stessa temperatura [4]. Nella termometria A è il sistema di cui si vuole conoscere la temperatura, C è il termometro utilizzato e B è il sistema con cui si è calibrato il termometro stesso.

Grazie alla definizione di una scala termodinamica, è stato possibile attribuire un valore numerico per quantificare la temperatura di un corpo. Secondo la vecchia definizione del Sistema Internazionale delle unità di misura (SI), una temperatura di 1 Kelvin (K) corrispondeva ad un 273.16esimo del punto triplo dell'acqua, posto a 273.16 K [5] [6]. Dal 2018 un Kelvin è definito dal valore numerico della costante di Boltzmann $k_B=1.380649 \cdot 10^{-23}$ J/K [7]. La scala Kelvin è assoluta, in quanto tutte le temperature fanno riferimento allo zero della scala, coincidente con lo zero assoluto. Un'altra scala termodinamica utilizzata è quella Celsius ($^{\circ}\text{C}$), dove un grado corrisponde numericamente a quello Kelvin ma lo zero della scala è posto al punto di congelamento dell'acqua, 273.15 K. A differenza della scala assoluta, quindi, si possono misurare valori negativi di

temperatura secondo la (eq. 1.8):

$$t [^{\circ}\text{C}] = T[\text{K}] - 273.15 \quad (\text{eq. 1.8})$$

Le scale di temperatura sopra introdotte fanno riferimento a delle macchine termiche ideali, non realizzabili in quanto violano i principi della termodinamica classica. Pertanto, come loro approssimazione, è stata adottata dal Comitato Internazionale dei Pesi e delle Misure (CIPM) la Scala Internazionale della Temperatura del 1990 (ITS-90) [6]. Essa è stata definita a partire da cinque intervalli operativi di temperatura tra loro sovrapposti:

- 0.65-5 K utilizzando la dipendenza tra le tensioni di vapore di ^3He e ^4He e la temperatura;
- 3-24.5561 K tramite un termometro a gas di elio calibrato in tre temperature (punti fissi) con specifiche procedure di interpolazione;
- 13.8033-273.16 K usando termometri a resistenze di platino calibrati su punti tripli di diversi materiali e con opportune interpolazioni;
- 273.15-1234.93 K tramite i termometri di cui sopra calibrati su punti di congelamento e fusione fissati;
- 1234.94 K in su utilizzando la legge di Plank per la radiazione.

Nelle zone di sovrapposizione, valori di temperatura ottenuti tramite diverse strumentazioni sono tra loro equivalenti con differenze numeriche trascurabili. Rispetto alle scale termodinamiche, le temperature ITS-90 sono determinate più facilmente, con precisione maggiore e alta riproducibilità.

1.4 Nanotermometri

La termometria convenzionale non è adeguata alla nanoscala dove la risoluzione spaziale Δx_{\min} , definita come il minimo spostamento per avere una variazione di temperatura maggiore della sensibilità del termometro stesso, scende nell'ordine dei sub-micrometri [8]. La sua definizione matematica è presentata in (eq. 1.9).

$$\Delta x_{\min} = \frac{\Delta T_{\min}}{\left| \frac{dT}{dx} \right|} \quad (\text{eq. 1.9})$$

Non sempre ridurre le dimensioni dei termometri tradizionali è sufficiente, in quanto l'accesso all'area di interesse potrebbe essere comunque interdetto [2]. È stato dunque necessario lo sviluppo di nanotermometri che permettano misure stabili nel tempo e nelle condizioni operative per evitare frequenti calibrazioni e perdere in riproducibilità del dato termometrico.

Ad oggi molti sensori alla nanoscala sono stati proposti, sebbene nessuno riesca a soddisfare tutti e tre i requisiti richiesti per un nanotermometro ideale, ovvero stabilità del sistema, riproducibilità e accuratezza della misura. Ogni tecnica nanotermometrica è caratterizzata da un proprio indicatore termometrico Q , ovvero un parametro dalla cui

misurazione è possibile ottenere in modo indiretto informazioni sulla temperatura locale. In genere se esiste un'equazione di stato ben definita che correla Q alla temperatura, i termometri sono detti primari [2]. Sono secondari, invece, se è richiesta una calibrazione. Non sempre è facile scegliere il nanotermometro più adeguato all'applicazione di interesse basandosi solo sulle sue dimensioni, sulla tecnologia disponibile, sul suo costo e sull'intervallo di temperatura da esso rilevabile. Spesso è necessario, infatti, considerare parametri chiave quali la sensibilità e la risoluzione termica [4]. La sensibilità assoluta S è definita matematicamente come il modulo della derivata prima dell'indicatore termometrico Q rispetto alla temperatura ed esprime la minima variazione nell'indicatore attesa in seguito ad un cambiamento infinitesimo della temperatura:

$$S = \left| \left(\frac{\partial Q}{\partial T} \right) \right| \quad (\text{eq. 1.10})$$

È riportata numericamente con l'unità di misura dell'indicatore contro quella di temperatura, espressa in °C o K in base alla scala termometrica impiegata. Per permettere il confronto tra tecniche basate su differenti indicatori termometrici, è preferibile normalizzare rispetto a Q ottenendo così la sensibilità relativa, in °C⁻¹ o K⁻¹:

$$S_{rel} = \left| \frac{\left(\frac{\partial Q}{\partial T} \right)}{Q} \right| \quad (\text{eq. 1.11})$$

A volte è possibile trovarla riportata in percentuale, moltiplicando la (eq. 1.11) per 100.

La risoluzione termica ΔT_{min} , invece, è definita come la più piccola variazione di temperatura che permette di apprezzare un cambiamento nel valore assunto dall'indicatore termometrico e si misura in unità di temperatura. Assumendo che Q sia dipendente solo da T, ΔT_{min} può essere espressa matematicamente tramite le leggi della propagazione dell'errore dove ΔQ esprime l'incertezza sul valore assunto dall'indicatore, connessa al come le misure di termometria sono state eseguite, mentre S la sensibilità, legata al meccanismo fisico tramite cui Q varia con la temperatura:

$$\Delta T_{min} = \frac{\Delta Q}{S} \quad (\text{eq. 1.12})$$

ΔQ può essere calcolato come deviazione standard di misure ripetute, dunque a identiche posizioni, campioni e condizioni, o di misure riproducibili, ovvero con diverse posizioni, campioni ed operatori. Nel primo caso, il più frequente, il confronto tra diversi sistemi nanotermometrici non è immediato in quanto pesantemente condizionato dal protocollo di misura impiegato per ciascuno di essi.

I nanotermometri possono essere suddivisi in due classi a seconda del fatto che siano a contatto o meno con l'oggetto d'interesse per l'applicazione in esame, rispettivamente invasivi e non invasivi [4]. Nel primo caso, la presenza del termometro perturba il sistema, non permettendo la misurazione dell'effettiva temperatura locale. Nel secondo, invece, la

misura avviene da remoto e non vi sono problemi di degradazione del termometro ad alte temperature o in presenza di specie chimiche particolarmente reattive. Vi sono anche metodi semi-invasivi dove il sistema viene ricoperto con un materiale sensibile alla temperatura la cui variazione delle proprietà ottiche può essere monitorata da remoto. Tuttavia, rimane il problema della perturbazione del campo termico da cui dipende l'incertezza della misura, stimabile tramite modelli matematici più o meno complessi. Solitamente le tecniche a contatto utilizzano proprietà elettriche o meccaniche del sistema di interesse, mentre quelle di non contatto sono basate su quelle ottiche. In particolare, tra quelle non invasive è possibile distinguere tra nanotermometri luminescenti e non luminescenti [4]. Le specifiche generali delle differenti metodologie impiegate, discusse nelle sezioni seguenti, sono riportate in Tabella 1.1. Per ciascuna di esse è specificato l'ordine di grandezza della risoluzione spaziale, termica e temporale ottenibile. La risoluzione temporale Δt_{min} è definita come il minimo intervallo di tempo tra due misure successive in cui è possibile determinare una temperatura superiore alla risoluzione termica [8]:

$$\Delta t_{min} = \frac{\Delta T_{min}}{\left| \frac{dT}{dt} \right|} \quad (\text{eq. 1.13})$$

Nell'ultima colonna di Tabella 1.1 è inoltre specificata la possibilità di fare *imaging* termico, dunque di avere un'immagine che mostra la distribuzione spaziale delle variazioni di temperatura nel campione [9]. Sebbene alcune tecniche termometriche permettano di ottenere ordinariamente queste mappe topografiche, altre richiedono di eseguire una scansione superficiale sul campione.

Tabella 1. 1: Panoramica delle tecniche di misura termica ad alta risoluzione più impiegate alla nanoscala, adattata da letteratura [2] [10]. Per ciascun metodo sono specificate la risoluzione spaziale, termica e temporale assieme alla possibilità di *imaging* termico.

Metodo	Δx_{min} [μm]	ΔT_{min} [K]	Δt_{min} [μs]	Possibilità di <i>imaging</i>
SThM	10^{-1}	10^{-1}	10^2	Si, tramite scansione
Microtermocoppia	10^2	10^{-1}	10	No
Termografia fluorescente	10^{-1}	10^{-2}	10	Si, tramite scansione
Termografia infrarossa	10	10^{-1}	10	Si
Termoriflettanza	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	Si
Interferometria ottica	1	10^{-5}	10^{-3}	Si, tramite scansione
Micro Raman	1	10^{-1}	10^6	Si, tramite scansione

1.5 Nanotermometri a Contatto

Tra le tecniche a contatto vi sono quelle basate sulla microscopia termica a scansione (*Scanning Thermal Microscopy*, SThM) dove in corrispondenza della punta è presente una piccola termocoppia [10]. Questa è costituita da due coni di differente materiale metallico, uno esterno ed uno interno, uniti da una giunzione di diametro 20-100 nm. Quando è

presente una differenza di temperatura anche di 1 mK tra i due a seguito del contatto con un campione conduttore, in corrispondenza della giunzione è possibile misurare una differenza di potenziale per effetto Seebeck [2]. Altri indicatori termometrici utilizzabili sono variazioni di resistenza, conduttività o capacità elettrica. In modo del tutto analogo, è possibile ottenere una termocoppia depositando nanostrisce metalliche su superficie tramite deposizione di vapori o tecniche nanolitografiche. In questo caso la difficoltà consiste nell'assicurare robustezza e consistenza chimica del sensore. Accoppiando una termocoppia ad un microscopio a forza atomica (*Atomic Force Microscope*, AFM), è possibile ottenere mappe topografiche della distribuzione della temperatura di una superficie ad alta risoluzione (50 nm) tramite riflessione di radiazione laser da parte del cantilever a cui è ancorata la punta [10]. Sebbene non richieda una superficie conduttrice, il tempo di acquisizione delle immagini termiche può essere considerevole. Tra le problematiche associate a questo tipo di nanotermometria vi sono la complessità della strumentazione, della calibrazione, dell'analisi dati e della valutazione di trasferimenti di calore punta-campione al fine di avere misure quantitative. Inoltre, dal momento che la misura è superficiale, è necessario avere accesso fisico alla zona di interesse ad eccezione delle termocoppie basate su effetto Seebeck.

Ispirandosi ai termometri a liquido macroscopici, tramite microscopio elettronico a scansione (*Scanning Electron Microscope*, SEM) è possibile misurare la variazione di temperatura associata al livello di un liquido, confinato all'interno di un nanotubo, che subisce dilatazioni o contrazioni [2]. Il primo ad essere realizzato era costituito da gallio in nanotubo di carbonio, il cui coefficiente di dilatazione termica era caratterizzato da un intervallo di linearità tra 323 e 773 K.

1.6 Nanotermometri Luminescenti

Conosciuti anche come nanotermometri ai fosfori termografici, questi sensori luminescenti basano il loro funzionamento sulla dipendenza dalla temperatura della forma di banda, dell'energia e dell'intensità del picco e dei tempi di vita degli stati eccitati [1]. Una sorgente continua o impulsata può essere impiegata a seconda dell'indicatore termometrico desiderato. Vi sono diversi tipi di nanotermometri luminescenti, caratterizzati da elevata sensibilità e risoluzione spaziale a tempi di acquisizione brevi, tra i quali:

- Coloranti organici, ampiamente disponibili e selezionabili a seconda della solubilità nell'ambiente di misura e dell'intervallo di lunghezze d'onda di emissione/eccitazione richiesto [2]. Molti di questi complessi organici sono caratterizzati da elevata resa quantica che li rende facilmente rilevabili. Sono, però, limitatamente fotostabili a causa di fenomeni di *photobleaching* a tempi lunghi. Se due molecole a distanza inferiore di 1 nm entrano in risonanza, possono dare luogo ad eccimeri (o ecciplessi se sono coloranti differenti), ovvero specie molecolari esistenti solo allo stato eccitato. In questo caso è possibile ottenere informazioni sulla temperatura dal rapporto tra l'intensità della banda di luminescenza emersa in seguito a questa interazione e quella

del monomero, con una sensibilità relativa fino a $4.5\% \text{ K}^{-1}$ [4];

- Quantum dots, nanocristalli di semiconduttori di 2-10 nm di diametro caratterizzati da fotoluminescenza modulabile con le dimensioni, alta resa quantica (50-90%) e fotostabilità [2]. Il loro impiego sotto continua illuminazione, limitato per insorgenza di *bluing*, *photobleaching* (inferiore rispetto a quello per i coloranti) e *blinking* della luminescenza a bassa concentrazione, può essere risolto tramite rivestimento con un materiale inerte. Problematiche legate al loro utilizzo termometrico sono la forte dipendenza dell'intensità della luminescenza dalla funzionalizzazione e dall'ambiente, con necessità di una calibrazione ad hoc, e il quenching termico non completamente reversibile oltre una certa temperatura di soglia;
- Nanostrutture o molecole organiche drogate con lantanoidi Ln^{3+} , dove come indicatori termometrici sono utilizzate le intensità delle transizioni intraorbitaliche 4f e i tempi di vita di alcuni stati eccitati [2].

1.7 Nanotermometri Non Luminescenti

I termometri nell'infrarosso (IR) sono dei sensori non luminescenti dove, tramite microscopia termica IR, viene misurata una banda specifica oppure tutta la radiazione termica emessa dal campione da temperature criogeniche fino a oltre 6000 K [1]. Informazioni sulla temperatura sono ottenute utilizzando la legge di Plank per il corpo nero, che deve tuttavia essere corretta dall'emissività locale del campione con conseguente perdita di accuratezza (sopra 1°C) [4]. È possibile ottenere anche mappe termiche tramite apposite telecamere il cui limite di diffrazione delle lenti va a ridurre la risoluzione spaziale complessiva ($10 \mu\text{m}$) [1]. È una tecnica rapida ma permette di misurare solo la temperatura superficiale.

Nanotermometri a termoriflettanza utilizzano l'immagine ottica riflessa dalla superficie del campione per monitorare la dipendenza dell'indice di rifrazione dalla temperatura [2]. La risoluzione spaziale è limitata dall'apparato strumentale. Tramite interferenza ottica è possibile ottenere informazioni sia sulla temperatura locale che sulla dilatazione termica e deformazione della superficie. Le risoluzioni termica e spaziale sono rispettivamente di $10 \mu\text{K}$ e $1 \mu\text{m}$ [2].

Un'altra importante tipologia di nanotermometri non luminescenti è basata sulla spettroscopia Raman, che sarà discussa in maggior dettaglio nel capitolo seguente.

Capitolo 2

Nanotermometria Raman nella Terapia Fototermica del Cancro

La spettroscopia Raman è una tecnica non invasiva basata sul fenomeno della diffusione anelastica della luce da parte di molecole o cristalli, nota come *scattering* Raman in quanto osservata per la prima volta da Raman e Krishnan nel 1928 sulla base dei calcoli di quantomeccanica classica di Smekal del 1923 [11]. La sua implementazione è stata possibile solo dagli anni 80, grazie ai significativi progressi nella strumentazione. Diversi esperimenti sono stati sviluppati per amplificare i segnali spettrali, tra cui la *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS), inconsapevolmente impiegata per la prima volta nel 1974 da Fleischmann per distinguere due tipi di piridina adsorbiti su un elettrodo d'argento.

Di seguito l'effetto Raman verrà presentato sia tramite un approccio classico che quantomeccanico, dove sono considerate anche le proprietà molecolari del sistema. In particolare, sarà trattata la diffusione ad opera di reticoli cristallini. Quindi verrà introdotta la spettroscopia SERS e giustificato il suo impiego nella nanotermometria, in special modo nel trattamento del cancro tramite terapia fototermica.

2.1 Trattazione Classica

L'approccio classico per la descrizione dello scattering Raman considera la luce come un'onda elettromagnetica monocromatica la cui intensità del campo magnetico E_0 è modulata armonicamente nel tempo dalla frequenza del laser ν_L [12]:

$$E_L = E_0 \cos(\vec{k}_L \cdot \vec{r} - 2\pi\nu_L t) \quad (\text{eq. 2.1})$$

\vec{k}_L è il vettore d'onda mentre \vec{r} il vettore posizione. Quando un cristallo è soggetto al campo E_L , la sua distribuzione di carica all'equilibrio subisce una distorsione in base alla sua tendenza ad esserlo, quantificata dalla suscettibilità dielettrica del materiale χ [11]. Viene così generata una polarizzazione P , proporzionale al campo elettrico esterno secondo il prodotto tra la permittività nel vuoto ϵ_0 e χ [12]:

$$P = \varepsilon_0 \chi E_L = \varepsilon_0 \chi E_0 \cos(\vec{k}_L \cdot \vec{r} - 2\pi\nu_L t) \quad (\text{eq. 2.2})$$

Il reticolo cristallino così irradiato si trova a vibrare alla frequenza ν_{mn} di uno specifico modo normale, ovvero una vibrazione estesa a più atomi del reticolo associata ad una determinata coordinata q . Per sistemi complessi, ogni vibrazione è il risultato della sovrapposizione di modi normali indipendenti l'uno dall'altro. Se si assume che la conseguente variazione di q sia sufficientemente piccola e che la suscettibilità dielettrica non si discosti di molto dal valore di equilibrio, è possibile esprimere χ come serie di Taylor troncata al primo termine non nullo, ovvero quello di ordine 1 [11]:

$$\chi = \chi_0 + \left(\frac{\partial\chi}{\partial q}\right)_0 q \quad (\text{eq. 2.3})$$

dove la derivata prima calcolata nella posizione di equilibrio indica la variazione della suscettibilità dielettrica rispetto a q , a sua volta modulato dalla frequenza del modo normale di vibrazione:

$$q = q_0 \cos(\vec{k}_{mn} \cdot \vec{r} - 2\pi\nu_{mn} t) \quad (\text{eq. 2.4})$$

Sostituendo le (eq. 2.3) e (eq. 2.4) all'interno della (eq. 2.2) e impiegando la formula di Werner della (eq. 2.5), si ottiene la (eq. 2.6) per la polarizzazione indotta dalla radiazione:

$$\cos(\alpha) \cos(\beta) = \frac{1}{2} [\cos(\alpha - \beta) + \cos(\alpha + \beta)] \quad (\text{eq. 2.5})$$

$$P = \varepsilon_0 \chi_0 E_0 \cos(\vec{k}_L \cdot \vec{r} - 2\pi\nu_L t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\chi}{\partial q}\right)_0 q_0 \varepsilon_0 E_0 [\cos\{(\vec{k}_L + \vec{k}_{mn}) \cdot \vec{r} - 2\pi(\nu_L + \nu_{mn})t\} + \cos\{(\vec{k}_L - \vec{k}_{mn}) \cdot \vec{r} - 2\pi(\nu_L - \nu_{mn})t\}] \quad (\text{eq. 2.6})$$

Si può riconoscere come P comprenda due contributi, il primo dei quali modulato da ν_L e dovuto alla diffusione elastica della luce (*Rayleigh scattering*). All'interno del secondo, legato alla diffusione anelastica (*Raman scattering*), è possibile distinguere tra Raman anti-Stokes e Raman Stokes, rispettivamente caratterizzati da una frequenza di oscillazione superiore e inferiore rispetto a quella del laser. Rispetto alla diffusione di tipo Rayleigh, quella Raman è molto poco intensa, con un rapporto tra le relative intensità di 10^{-5} - 10^{-12} [13]. Per questo motivo come sorgente eccitatrice viene impiegata una radiazione monocromatica intensa come quella fornita dai laser.

2.2 Trattazione Quanto-Meccanica

Nell'approccio basato sulla meccanica quantistica, la radiazione elettromagnetica viene considerata come costituita da pacchetti discreti di energia chiamati fotoni mentre i

livelli vibrazionali del cristallo risultano essere quantizzati ed esprimibili da una loro funzione d'onda. Gli stessi modi normali di vibrazione risultano quantizzati in fononi $h\nu_{mn}$, ovvero quanti associati ad una vibrazione collettiva degli atomi del reticolo [14]. La trattazione quanto-meccanica della diffusione della radiazione da parte dei fononi prende le mosse dal modello dell'*energy transfer* per le transizioni elettroniche [15]. In seguito all'interazione di un certo numero di fotoni incidenti con energia $h\nu_L$ con un sistema a due livelli, un fotone viene annichilito ed un altro ad energia $h\nu_S$ viene creato, con seguente transizione dallo stato elettronico fondamentale a quello eccitato. Applicando il modello al fenomeno della diffusione per i cristalli, l'energia del fotone incidente non è sufficiente a promuovere alcuna transizione elettronica. Pertanto, ciò che si osserva è l'eccitazione di un fonone, indotta tra due livelli vibrazionali generici m e n all'interno dello stato elettronico fondamentale. Sebbene non valido nello *scattering* Raman, il principio di conservazione dell'energia è comunque applicabile per definire matematicamente l'energia dei fotoni $h\nu_S$, prodotti in tutte le direzioni [12]:

$$h\nu_S = h\nu_L \pm (E_m - E_n) \quad (\text{eq. 2.7})$$

Come riportato in (eq. 2.6), i fotoni diffusi hanno energia maggiore o inferiore a quella dei fotoni incidenti. A seconda che vi sia un segno $+$ o $-$, si trova rispettivamente l'energia dei fotoni Raman anti-Stokes e Stokes, in cui un fonone è stato annichilito o formato.

Per capire quando sia possibile osservare l'effetto Raman, è necessario prendere in esame la natura vettoriale della polarizzazione e del campo elettrico oscillante in (eq. 2.2), dove appare evidente come la suscettibilità dielettrica sia un tensore di rango 2, rappresentabile da una matrice 3x3 [11] [12]:

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} = \epsilon_0 \begin{bmatrix} \chi_{xx} & \chi_{xy} & \chi_{xz} \\ \chi_{yx} & \chi_{yy} & \chi_{yz} \\ \chi_{zx} & \chi_{zy} & \chi_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (\text{eq. 2.8})$$

Ne deriva che il fattore moltiplicativo della polarizzabilità al primo ordine in (eq. 2.6) può essere riscritta come il tensore Raman R , il quale determina l'ampiezza dei fotoni diffusi per un determinato modo vibrazionale a . L'espressione generale per un suo elemento $\sigma\rho$ -esimo, dove σ e ρ indicano le direttrici del tensore x , y e z , è riportata in (eq. 2.9):

$$R_{\sigma\rho,a} = \left(\frac{\partial \chi_{\sigma\rho}}{\partial q_a} \right)_0 q_a \quad (\text{eq. 2.9})$$

Impiegando la teoria dei gruppi, è possibile trovare la regola di selezione per osservare *scattering* Raman, ovvero che almeno uno degli elementi di $R_{\sigma\rho,a}$ per ogni modo vibrazionale a -esimo deve essere diverso da 0:

$$R_{\sigma\rho,a} = e_{\rho}^S R_{\rho\sigma,a} e_{\sigma}^L \neq 0 \quad (\text{eq. 2.10})$$

dove e^S ed e^L indicano le direzioni di polarizzazione rispettivamente della radiazione diffusa e di quella incidente. La vibrazione associata al segnale corrispondente viene detta Raman attiva, altrimenti Raman inattiva. Nel caso dei cristalli centrosimmetrici, ovvero con un centro di inversione, le vibrazioni Raman attive sono quelle dove lo stato iniziale e finale hanno la stessa parità. Dal momento che frequenze dei fononi a bassa energia sono molto sensibili alla struttura cristallina, i segnali Raman ad essi dovuti costituiscono un'impronta digitale (*fingerprint*) per distinguere simultaneamente fasi cristalline differenti [16].

2.3 Lo Spettro Raman

L'intensità dei fotoni diffusi è rappresentata in funzione della loro energia in cm^{-1} negli spettri Raman, dove per convenzione viene impiegato il Raman Shift, ovvero la differenza tra i numeri d'onda dei fotoni incidenti e diffusi $\Delta\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_S$ [13]. Ne risulta che lo spettro è centrato in corrispondenza del segnale dovuto allo scattering Rayleigh, dove $\tilde{\nu}_L = \tilde{\nu}_S$. Per Raman Shift positivi, in accordo con la (eq. 2.7), si osservano picchi Raman Stokes mentre per Raman Shift negativi si hanno picchi Raman anti-Stokes.

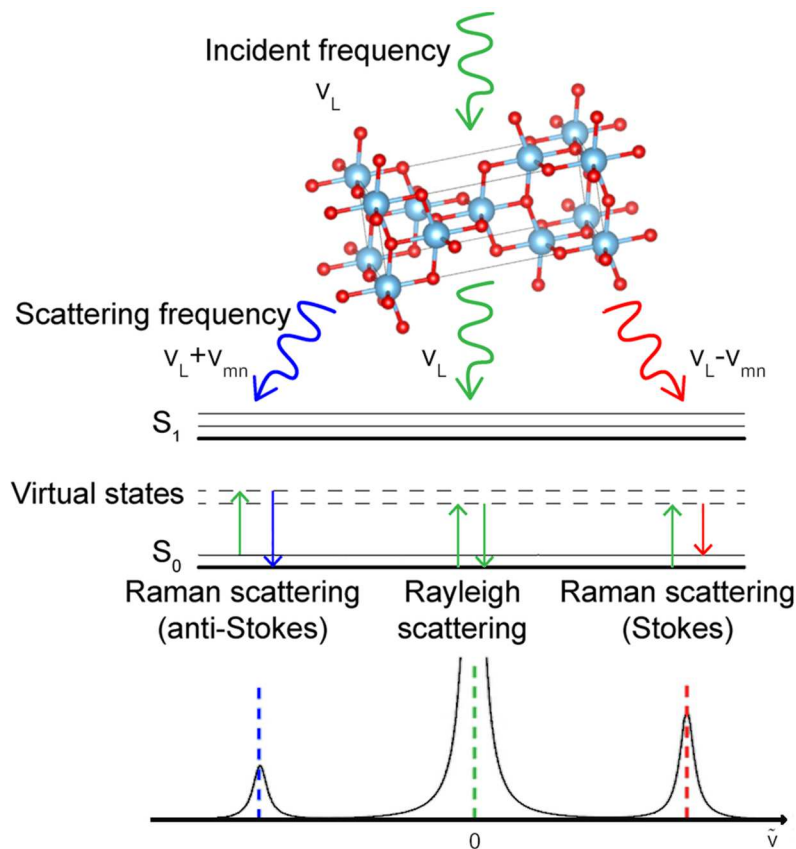


Figura 2. 1: Diagramma di Jablonski e corrispondente spettro Raman per un cristallo singolo di anatasio, riadattato da [17] [18].

La posizione relativa dei segnali può essere compresa osservando la Figura 2.1, dove è rappresentato il diagramma dei livelli energetici di Jablonski. La popolazione di fononi n_v per un determinato livello vibrazionale segue una distribuzione di Bose-Einstein, in quanto bosoni [19]:

$$n_v = \frac{1}{\exp\left(\frac{h\nu_{mn}}{k_B T}\right) - 1} \quad (\text{eq. 2.11})$$

dove k_B è la costante di Boltzmann. In genere, dal momento che a temperatura ambiente $k_B T \approx 200 \text{ cm}^{-1}$, fononi ad alta energia non saranno popolati e dunque il sistema si troverà principalmente nel suo stato fondamentale al livello vibrazionale $v=0$ [14]. Stati eccitati a bassa energia, quale $v=1$, risulteranno in minima parte popolati, condizione necessaria per poter osservare segnali in anti-Stokes. In genere questi ultimi sono meno intensi rispetto a quelli Stokes dal momento che la loro intensità è proporzionale alla popolazione di fononi n_v del livello vibrazionale di partenza. Nell'intensità dei segnali in Stokes viene considerato anche il fonone popolato in seguito a diffusione:

$$\begin{aligned} I_S &\propto n_v + 1 \\ I_{aS} &\propto n_v \end{aligned} \quad (\text{eq. 2.12})$$

La dipendenza dalla temperatura si può vedere anche dalle seguenti espressioni per le intensità dei segnali Stokes e anti-Stokes [13]:

$$\begin{aligned} I_S &= N\sigma_S I_L \\ I_{aS} &= N \exp\left(-\frac{h\nu_{mn}}{k_B T}\right) \sigma_{aS} I_L \end{aligned} \quad (\text{eq. 2.13})$$

σ è la sezione d'urto, che quantifica l'efficienza del processo corrispondente per un determinato cristallo orientato in modo casuale nello spazio, mentre N è il numero di centri di diffusione irradiati.

In seguito alla perturbazione del sistema da parte della radiazione elettromagnetica, questo viene portato in un livello virtuale, non corrispondente in genere ad uno fisico, da cui è possibile osservare transizioni spettroscopiche differenti dall'assorbimento che avvengono all'interno dello stesso livello elettronico. In seguito a diffusione, per *scattering* Stokes il cristallo viene a trovarsi in uno stato vibrazionale a più alta energia rispetto a quello di partenza, mentre per l'anti-Stokes in uno ad energia inferiore. I fotoni incidenti che subiscono diffusione non hanno in genere energia tale da promuovere alcuna transizione elettronica. Si parla in questo caso di *scattering* Raman normale (*Normal Raman Scattering*, NRS). A mano a mano che ci si avvicina alla condizione di risonanza, si osserva un'amplificazione del segnale che raggiunge il suo massimo nello *scattering* Raman risonante (*Resonant Raman Scattering*, RRS), dove l'energia è sufficiente per portare il reticolo in uno stato elettronico eccitato. In questo caso si raggiunge un'amplificazione rispetto al NRS di 10^3 - 10^5 [13]. In presenza di specie fluorescenti, però,

i segnali in condizione di risonanza sono nascosti dalla fluorescenza verso lo stato elettronico fondamentale. Lo si può vedere dal confronto tra le rispettive sezioni d'urto, come riportato in Tabella 2.1. Il valore riportato per il RRS è in questo caso riferito a coloranti organici quali la Rodamina 6G.

Tabella 2. 1: Confronto tra le sezioni d'urto caratteristiche dei processi di scattering Raman normale, scattering Raman risonante e fluorescenza.

σ NRS [cm ²]	σ RRS [cm ²]	σ fluorescenza [cm ²]
10^{-31} - 10^{-29} [20]	10^{-24} - 10^{-23} [13]	10^{-16} [20]

2.4 Spettroscopia SERS

Tramite l'utilizzo di substrati plasmonici su cui far aderire i sistemi di interesse, è possibile amplificare i segnali Raman con un fattore EF (*Enhancement Factor*) di 10^4 - 10^6 [13]. Si parla in questo caso di spettroscopia SERS, che permette di ottenere elevata sensibilità, selettività e precisione. La definizione dell'EF è riportata nella (eq. 2.14), dove *surf* e *vol* si riferiscono rispettivamente a campioni su substrati SERS e in soluzione acquosa [18]:

$$EF = \frac{I_{surf}N_{vol}}{I_{vol}N_{surf}} \quad (\text{eq. 2.14})$$

L'intensità dei segnali ottenuti durante un esperimento SERS è espressa dalla (eq. 2.15), dove è possibile identificare i due principali contributi per l'amplificazione dei picchi Raman [13]:

$$I_{mnSERS} = costante * I_L(\nu_L \pm \nu_{mn})^3 |E(\nu_S)|^2 |E(\nu_L)|^2 \sigma_{SERS} \quad (\text{eq. 2.15})$$

L'amplificazione elettromagnetica (*Electromagnetic Mechanism*, EM) è rappresentata dal prodotto del modulo quadro del campo elettrico incidente e di quello dovuto all'eccitazione di plasmoni superficiali. Questi sono oscillazioni coerenti di elettroni sulla superficie di un conduttore metallico indotte dalla radiazione elettromagnetica, e soggette alla forza di richiamo generata dall'attrazione coulombiana tra cariche positive e negative, come esemplificato in Figura 2.2.

Un caso particolare è quello di nanoparticelle (NPs) plasmoniche di dimensioni di molto inferiori rispetto alla lunghezza d'onda d'eccitazione, in grado di manifestare risonanza plasmonica di superficie localizzata (*Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR). Questa dipende dalle dimensioni delle NPs, dalla loro forma e materiale, dalle proprietà dielettriche esterne e dalla distanza interparticellare. Essendo il loro plasmone localizzato in regioni nanometriche tra le particelle o in prossimità di punte particolarmente affilate (*hot spots*), l'EM produce un elevato rafforzamento del campo elettrico locale per il *lightning rod effect* con seguente contributo alla sezione d'urto da 10^{10} a 10^{12} [13]. Dal momento che ν_S è differente per i segnali in Stokes e in anti-Stokes,

la loro amplificazione non sarà la stessa. Limitante per l'effetto SERS è l'efficacia dell'EM solo per le sostanze a contatto con il substrato impiegato o in prossimità (1-10 nm). Inoltre, l'inomogeneità e disposizione casuale degli *hot spots*, assieme all'interferenza di stabilizzanti impiegati per le nanoparticelle in sospensione, limita fortemente la riproducibilità delle misure Raman su substrati SERS.

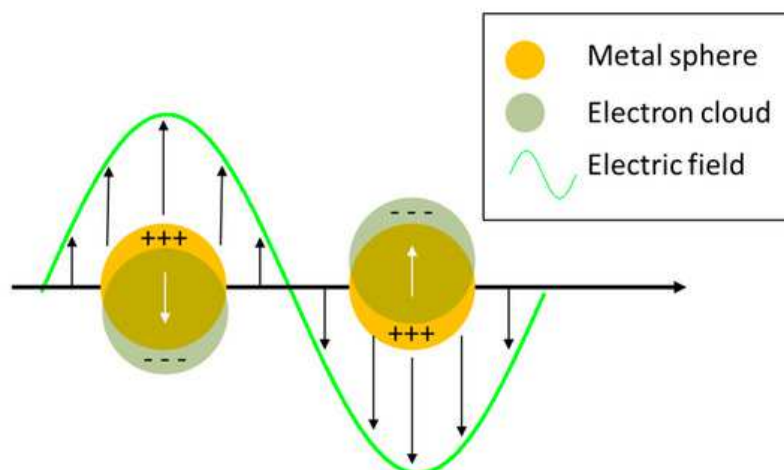


Figura 2. 2: Oscillazione collettiva di elettroni in nanoparticelle sferiche sotto l'azione del campo magnetico esterno, da Pilot et al. [21].

La sezione d'urto modificata dalla presenza di un substrato SERS nella (eq. 2.15) indica invece la presenza di amplificazione chimica (*Chemical Mechanism, CM*), detta anche elettronica, che porta ad un contributo di 10^3 - 10^5 alla σ della specie non adsorbita [13]. Sebbene sia inferiore rispetto a quello EM, è importante per la forma dello spettro dal momento che l'interazione con il substrato porta a modificare la struttura elettronica e la geometria del campione d'interesse.

In regime di saturazione debole, ovvero quando $\exp\left(\frac{h\nu_{mn}}{k_B T}\right) \ll 1$, le intensità in funzione delle sezioni d'urto di (eq. 2.13) diventano [13]:

$$I_{aS} = N \left[\exp\left(-\frac{h\nu_{mn}}{k_B T}\right) + \sigma_{SERS} \tau_1 I_L \right] \sigma_{SERS} I_L \quad (\text{eq. 2.16})$$

dove τ_1 è il tempo di rilassamento vibrazionale del primo livello vibrazionale eccitato dello stato fondamentale. I due termini nell'espressione per l'intensità anti-Stokes vengono rispettivamente identificati come popolazione termica e *vibrational pumping*, contributo di popolazione dovuto ad assorbimenti e rilassamenti da stati a più alta energia.

2.5 Nanotermometria Raman

La spettroscopia Raman presenta molti vantaggi, tra i quali la facilità nella preparazione del campione, le piccole quantità di materiale richieste e la sua applicazione nelle condizioni più disparate quali durante reazioni chimiche o a temperature e pressioni estreme [13]. Il suo ampio intervallo termico di lavoro è limitato sopra i 1000 K per effetto

del segnale di fondo dovuto alla radiazione del corpo nero e a basse temperature per i picchi poco intensi, specie in anti-Stokes. Queste caratteristiche rendono la spettroscopia Raman una tecnica ideale per lo sviluppo di nanotermometri non luminescenti, dove le variazioni di temperatura misurabili sono dovute alla dipendenza dei modi normali di vibrazione dalla posizione degli atomi del sistema molecolare e dalla loro energia [4].

Come indicatore termometrico Q è normalmente impiegato il rapporto tra le intensità dei segnali anti-Stokes e Stokes di un preciso modo di vibrazione, che segue una distribuzione di Boltzmann [13]:

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = C \frac{(\nu_L + \nu_{mn})^3}{(\nu_L - \nu_{mn})^3} \exp\left(-\frac{h\nu_{mn}}{k_B T}\right) \quad (\text{eq. 2.17})$$

Si può vedere come il fattore pre-esponenziale sia costituito da due contributi. Il primo è la costante di calibrazione C , specifica del modo normale selezionato, determinata dall'apparato sperimentale impiegato, dalla polarizzazione della luce incidente e dall'efficienza del rivelatore [22]. Il secondo, invece, è il rapporto tra le frequenze dei fotoni (mW/cm^2) diffusi al cubo o alla quarta a seconda che si abbia rispettivamente un contatore di fotoni (e.g. *charge-coupled devices*, CCD) o un sistema di rivelazione del segnale basato sulla misura dell'energia raccolta. È atteso che i valori assunti da Q crescano all'aumentare della temperatura in quanto maggiore è il numero di vibrazioni eccitate, ovvero il numero di fotoni diffusi in anti-Stokes. A temperature elevate, inoltre, bisogna considerare l'effetto dell'indebolimento dei legami chimici con diminuzione della frequenza associata e i cambiamenti strutturali indotti nel campione. Sebbene gli incrementi termici siano più rilevanti per modi normali a Raman Shift elevati, è preferibile lavorare a $\Delta\tilde{\nu}$ bassi per avere segnali in anti-Stokes di intensità apprezzabile [23].

La risoluzione spaziale è limitata dalla dimensione dello spot del laser sul campione ($0.5 \mu\text{m}$), mentre la risoluzione termica è di alcuni gradi (tra 1 e 10°C), il che rende la tecnica poco sensibile a variazioni di temperatura [2] [10]. Tra i punti critici vi sono il tempo richiesto per le misure, la bassa velocità di campionamento (0.5 punti al secondo) e la necessità di calibrazione dei segnali [1]. Quest'ultimo problema può essere ovviato impiegando come indicatore lo spostamento della posizione del segnale in Raman Shift, sebbene comporti una risoluzione termica inferiore. Altri Q adottabili sono l'ampiezza a metà altezza del segnale (*Full Width Half Maximum*, FWHM), che aumenta con T , o la sua intensità in Stokes o anti-Stokes. Per evitare problemi con il meccanismo competitivo della fluorescenza in liquidi, è preferibile lavorare con campioni trasparenti. Substrati SERS possono essere invece impiegati per amplificare segnali poco intensi.

La nanotermometria Raman trova applicazioni nella PCR (*Polymerase Chain Reaction*), nello studio del trasporto termico e dello stress termico in microdispositivi, nanotubi, nanofili e grafene, nel monitoraggio di reattori industriali tramite fibra ottica e nell'analisi dell'efficienza di riscaldamento di nanodischi d'oro. In particolare, di interesse per questo lavoro di tesi è il suo impiego nella terapia fototermica per il trattamento dei tessuti cancerosi, trattato in maggior dettaglio nella sezione seguente.

2.6 Terapia Fototermica

La fototerapia costituisce uno dei metodi emergenti per la rimozione di cellule cancerogene dai tessuti malati tramite irraggiamento di agenti fototermici (*Photothermal Agents*, PTAs) o fotosensibilizzanti [24]. Al suo interno è possibile distinguere tra terapia fotodinamica (*Photodynamic Therapy*, PDT) e terapia fototermica (*Photothermal Therapy*, PTT). Nella terapia fotodinamica i PTAs fungono da precursori di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) che tramite reazioni radicaliche causano la morte del tessuto canceroso. Questa strategia è fortemente limitata dalla bassa concentrazione di ossigeno e dalla natura riducente del microambiente cellulare di interesse. Nella terapia fototermica i PTAs, caratterizzati da un'elevata efficienza di fotoconversione, assorbono energia sotto forma di fotoni e la rilasciano in modo non radiativo come calore, secondo il meccanismo dell'ipertermia. Agendo dunque da *nanoheaters*, causano danni nell'ambiente intracellulare dove sono stati accumulati per innescare l'apoptosi, ovvero la morte programmata della cellula [25].

Il riscaldamento del *nanoheater* deve essere sufficiente per superare la soglia di resistenza delle cellule cancerogene all'ipertermia. Per questo motivo, spesso è necessario lavorare anche sopra 50°C, usando laser ad alta intensità, frequenza e durata [24]. Per individuare univocamente le cellule bersaglio ed evitare di colpire anche le cellule sane limitrofe o di provocare l'infiammazione del tessuto, bisogna controllare il processo di riscaldamento e monitorare in modo preciso la distribuzione termica intracellulare [26]. Ciò è possibile impiegando nanotermometri con intervalli di rilevazione della temperatura adeguati, alte risoluzioni termiche, temporali e spaziali, con risultati indipendenti dalla concentrazione di PTAs, che permettano di eseguire facilmente misure in modo ripetibile [26]. L'individuazione delle cellule cancerogene è resa possibile grazie alla loro temperatura più alta del normale a causa del loro metabolismo potenziato.

La tecnica utilizzata in questo lavoro di tesi è appunto la spettroscopia SERS, le cui caratteristiche sono state elencate nei paragrafi precedenti. Il suo comune impiego per analizzare soluzioni acquose, per via dei deboli segnali Raman dell'acqua, la rende ideale per monitorare la temperatura in ambiente fisiologico. È necessario, però, rendersi indipendenti dall'inomogeneità dell'ambiente circostante e dalle variazioni di pH, forza ionica e indice di rifrazione.

Sebbene i PTAs possano lavorare sia nel vicino infrarosso (NIR, 750-1350 nm) che nel visibile (400-700 nm), è preferibile impiegare il primo intervallo spettrale in quanto permette una migliore penetrazione dei tessuti e cade nella finestra ottica biologica, trasparente alla radiazione [24]. Gli incrementi di temperatura ottenuti in questo modo sono inferiori ma evitano danni tissutali. Sono state sviluppate molte classi di PTAs organici e inorganici. I più utilizzati sono basati su nanoparticelle opportunamente rivestite e funzionalizzate per penetrare e colpire in modo selettivo le cellule bersaglio. Affinché possano superare la membrana cellulare tramite il meccanismo dell'endocitosi, le NPs devono essere di dimensioni adeguate da poter essere incapsulate in vescicole, in genere di 50-60 nm [27]. Al termine del trattamento fototermico è poi necessario rimuovere le

NPs e quanto rimasto in seguito ad apoptosi. Vista la necessità di impiegare un nanosensore, questo può essere presente in una particella diversa da quella del *nanoheater* oppure essere incorporato in esso [25]. Nel primo approccio non si ha accesso diretto alla temperatura della cellula cancerogena, in quanto il *nanoheater* è posto ad una certa distanza, non controllabile, dal nanotermometro. È necessario ricorrere a modelli di *heat transfer*, che sono però poco accurati alla nanoscala. Per questo motivo il secondo approccio è preferibile. L'agente fototermico indagato dal presente elaborato è costituito da nanoparticelle core-shell di Ag@TiO₂, dove l'argento funge da *nanoheater* e il rivestimento di titania anatasio da nanotermometro.

Capitolo 3

Nanoparticelle Core-Shell di Ag@TiO₂

Si definiscono nanoparticelle core-shell quella categoria di nanomateriali, dunque con una o più dimensioni nella nanoscala (≤ 100 nm), in cui è possibile distinguere una componente interna, chiamata core, ed una esterna, la shell, che copre completamente o in parte il core stesso [28] [29]. Quando questo arrangiamento non è osservabile ma sono presenti due o più fasi distinte dove almeno una rientra nella classe dei nanomateriali, si parla di nanocompositi [30]. Originariamente coniato per definire nanoparticelle semiconduttrici concentriche, il termine core-shell è stato poi esteso fino a comprendere diverse classi che si differenziano per l'arrangiamento specifico e per la natura organica (principalmente polimeri) o inorganica (nanoparticelle metalliche, metalloidi e di sali inorganici) di una delle due parti. Un'ulteriore classificazione derivata dalla nanocatalisi permette di distinguere fra altri tipi di core-shell:

- *hollow-core-shell*, ottenute in seguito a rimozione del core;
- *multicore-shell*, dove un'unica shell cresce attorno ad un raggruppamento di piccoli core;
- *core-multishell*, dove uno o più materiali rivestono successivamente il core. In caso di alternanza ABA tra il materiale dielettrico del core e quello metallico della shell, si parla di nanomatriosche, importanti per le loro proprietà plasmoniche. Se la shell interna della struttura concentrica viene rimossa, si ottiene un core mobile all'interno di una *hollow-shell*;
- *core-porous-shell*, caratterizzati da una shell porosa.

Il crescente interesse degli ultimi anni verso questo tipo di nanomateriali è giustificato dalle loro peculiari proprietà strutturali, chimiche e fisiche emergenti dall'interazione sinergica tra il core e le shell. Queste dipendono anche dai materiali costituenti, dal rapporto tra le dimensioni del core e della shell e dalla forma assunta dalla nanoparticella, che può essere oltre che una sfera anche un cubo, un prisma, un esagono, un ottaedro, un disco, un filo, un bastoncino, un tubo, etc. Tra le motivazioni che hanno spinto la ricerca ad investire sulle core-shell vi sono anche la loro buona stabilità e disperdibilità, la protezione del nucleo dall'ambiente circostante, l'amplificazione delle proprietà semiconduttrici, il vantaggio di risparmiare in quantità di metalli preziosi rivestendoli con materiali economici a parità di dimensioni, e la possibilità di modificare e funzionalizzare con facilità la superficie della shell a seconda delle applicazioni di interesse [29]. Tra

queste si ricordano quelle presenti e future nella bio-nanotecnologia, nell'ingegneria genetica, nel *bioimaging*, nello sviluppo di dispositivi magnetici e opto-elettronici, nelle celle di Grätzel e a combustibile, nella catalisi ed elettrocatalisi.

In generale per la loro sintesi è possibile adottare un approccio *top-down* (dall'alto verso il basso), dove stimoli esterni quali tecniche litografiche, meccaniche e laser portano alla frammentazione del materiale massivo, oppure uno *bottom-up* (dal basso verso l'alto), in cui nanomateriali sono ottenuti dalle mutue interazioni tra le specie atomiche o molecolari di partenza tramite sintesi chimica, deposizione di vapori, *laser tapping*, *self-assembly*, aggregazione colloidale, deposizione di film e accrescimento [28]. Il secondo è preferibile in quanto permette di realizzare particelle molto più piccole, con un controllo preciso sul processo, sulla forma e sull'uniformità del rivestimento del core. Un approccio intermedio consiste nell'utilizzare un metodo *top-down* per il core ed uno *bottom-up* per la shell.

In questo capitolo, l'attenzione sarà rivolta alle nanoparticelle core-shell di Ag@TiO₂. Come specificato dal nome, appartengono alla famiglia inorganico@inorganico dove è presente un core metallico di argento (a sinistra della chiocciola) ed una shell di ossido di titanio (a destra della chiocciola). Prima di giustificare l'idea alla base del loro potenziale utilizzo nella nanotermometria Raman e per la terapia fototermica, saranno analizzate le proprietà dei materiali costituenti, da cui saranno poi dedotte quelle peculiari delle core-shell. Quindi saranno descritte le diverse tipologie di sintesi bottom-up sviluppate in letteratura fino ad oggi.

3.1 Nanoparticelle d'Argento

L'argento presente sotto forma di nanoparticelle è caratterizzato da un'eccellente conduttività, stabilità termica e riflettanza [31]. Costituisce inoltre un centro per LSPR, motivo per cui è impiegato nella spettroscopia SERS e nella *Metal Enhanced Fluorescence* (MEF) [32]. L'amplificazione del campo elettromagnetico locale sperimentato dalle specie di interesse a contatto con le nanoparticelle d'argento AgNPs arriva ad essere fino a dieci volte più intensa rispetto a quella delle nanoparticelle d'oro, vista la maggiore sezione d'urto di scattering Raman ($8 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ contro $9.02 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2$), calcolata tramite l'equazione di Rayleigh per particelle di 30 nm di diametro in un ambiente con indice di rifrazione di 1.33 [33]. Sulla base della LSPR vi è il loro utilizzo come sensori chimici e biologici. Controllando le dimensioni delle AgNPs è inoltre possibile modulare le loro proprietà ottiche.

L'attività antibatterica e fotocatalitica delle nanoparticelle d'argento è amplificata rispettivamente dalla loro bassa tossicità nell'uomo e dal loro elevato rapporto area superficiale/volume [34]. Le AgNPs possono anche essere incorporate all'interno delle cellule e portare a fuoriuscita di sostanze intracellulari ed eventualmente alla morte delle stesse. Più le nanoparticelle sono di ridotte dimensioni, più l'attività antimicrobica è incrementata a discapito della sua efficacia sotto i 200 nm di diametro, vista la tendenza delle stesse ad aggregare spontaneamente, poiché poco stabili in dispersione, e a coagulare

sotto azione di forze di Van der Waals. Ulteriore applicazione delle AgNPs è quella di *optical limiters* [35].

3.2 Nanoparticelle di Titania

L'ossido di titanio TiO_2 , più comunemente noto come titania, è un materiale caratterizzato da un'eccellente stabilità chimica, da una bassa tossicità e da un costo contenuto rispetto ad altri ossidi [36]. È facilmente reperibile in natura sotto forma di diversi polimorfi, principalmente anatasio e rutilo, dove quest'ultimo costituisce la fase cristallina termodinamicamente più stabile, a cui si giunge da tutte le altre aumentando la temperatura, come illustrato in Figura 3.1.

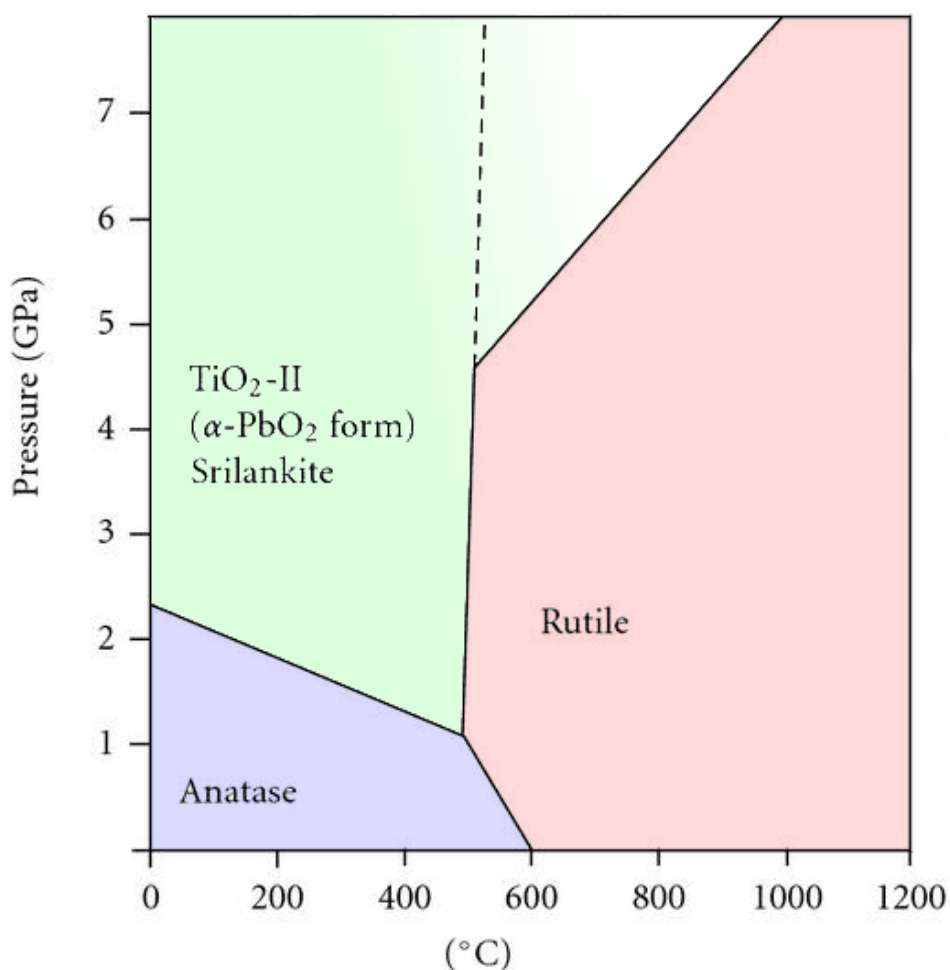


Figura 3. 1: Diagramma di fase per l'ossido di titanio TiO_2 riadattato da Niel et al. [37], dove sono mostrate le fasi di anatasio, di rutilo e di srilankite.

Sia il rutilo che l'anatasio sono caratterizzati da assorbimento nell'ultravioletto (UV) e da un elevato indice di rifrazione n , come riportato nella Tabella 3.1 [38]. In particolare, si può notare come passando dalla fase amorfa al rutilo n aumenti, assumendo valori più importanti nell'UV.

Tabella 3. 1: Valori dell'indice di rifrazione n per TiO_2 amorfa, anatasio e rutilo rispettivamente alle lunghezze d'onda di 300, 600 e 900 nm, misurate con un ellissometro da Liu et al. [39].

	n (300 nm)	n (600 nm)	n (900 nm)
Titania amorfa	2.87	2.11	2.05
Anatasio	2.93	2.16	2.09
Rutilo	3.02	2.22	2.15

La titania si comporta come un semiconduttore caratterizzato da un band gap, ovvero la separazione energetica tra banda di valenza e di conduzione da compensare per la creazione della coppia buca-elettrone, particolarmente elevato (3.2 eV per l'anatasio, 3.06 eV per il rutilo), che ne permette l'applicazione nell'elettrochimica, nello sviluppo di celle solari e nella fotocatalisi [38]. Quest'ultima è, però, caratterizzata da una bassa resa quantica per la rapida ricombinazione buca-elettrone, e da una scarsa efficienza dovuta alla sua attività limitata nella regione ultravioletta dello spettro [40]. Dal momento che l'UV costituisce solo il 4-5% della radiazione solare, il processo fotocatalitico non potrebbe avvenire a condizioni ambiente e risulterebbe pertanto costoso.

Le nanoparticelle di titania mantengono e amplificano le stesse proprietà del materiale massivo. Sono usate in particolare come agenti antimicrobici vista la loro capacità di decomporre cellule di batteri, funghi, alghe e virus [41]. Vengono inoltre impiegate per processi di pulizia ambientale da inquinanti organici nell'aria e da coloranti nelle acque reflue delle industrie tessili, tramite loro ossidazione da parte di buche fotogenerate e radicali ossidrilici. Altre applicazioni rilevanti comprendono cosmetici e prodotti di cura della pelle, sensori di gas, pigmenti bianchi per pittura, materiali filler, rivestimenti anticorrosivi od ottici.

L'inertia chimica e non tossicità di questo nanomateriale, unite alla sua biocompatibilità con i tessuti umani e al suo facile ancoraggio e accumulazione nella membrana cellulare, rendono la titania un materiale ideale per la realizzazione di nanotermometri basati sulla spettroscopia Raman [34]. Dal momento che in fase amorfa non si osserva alcun segnale nello spettro Raman, vi è possibilità di lavorare o con anatasio o con rutilo. Se si confrontano i loro spettri Raman Stokes, riportati in Figura 3.2, entrambi presentano segnali ben risolti e identificabili e hanno un'elevata sezione d'urto per lo scattering Raman.

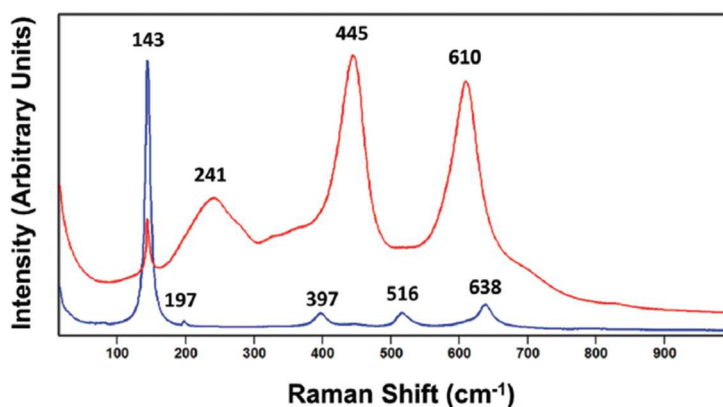


Figura 3. 2: Spettri Raman Stokes di anatasio (blu) e di rutilo (rosso) registrati eccitando a 532 nm [16].

Per ottenere valori dell'indicatore termometrico, definito in (eq. 2.17), apprezzabilmente diversi da zero, è preferibile eseguire misure in corrispondenza dei segnali più intensi di modo da osservare il picco in anti-Stokes anche a basse temperature. Se si considera l'intervallo di lunghezze d'onda normalmente impiegate nella terapia fototermica, appare evidente come l'anatasio sia la scelta migliore in quanto richiede un delta energetico inferiore rispetto a quello del rutilo per ottenerne il segnale più prominente. L'utilizzo di picchi intensi a bassi Raman shift permette inoltre di massimizzare i valori assunti da Q , come riportato nella parte destra di Figura 3.3 alle diverse lunghezze d'onda impiegate nel lavoro di tesi [42]. Da notare come tra i 20 e i 50°C l'andamento dell'indicatore contro la temperatura si possa approssimare come lineare, come mostrato dall'ingrandimento del grafico di $Q(T)$ nella parte destra di Figura 3.3. Ciò permettendo di calcolare in modo più immediato la sensibilità termica, definita in (eq. 1.10), a partire dalla pendenza della retta.

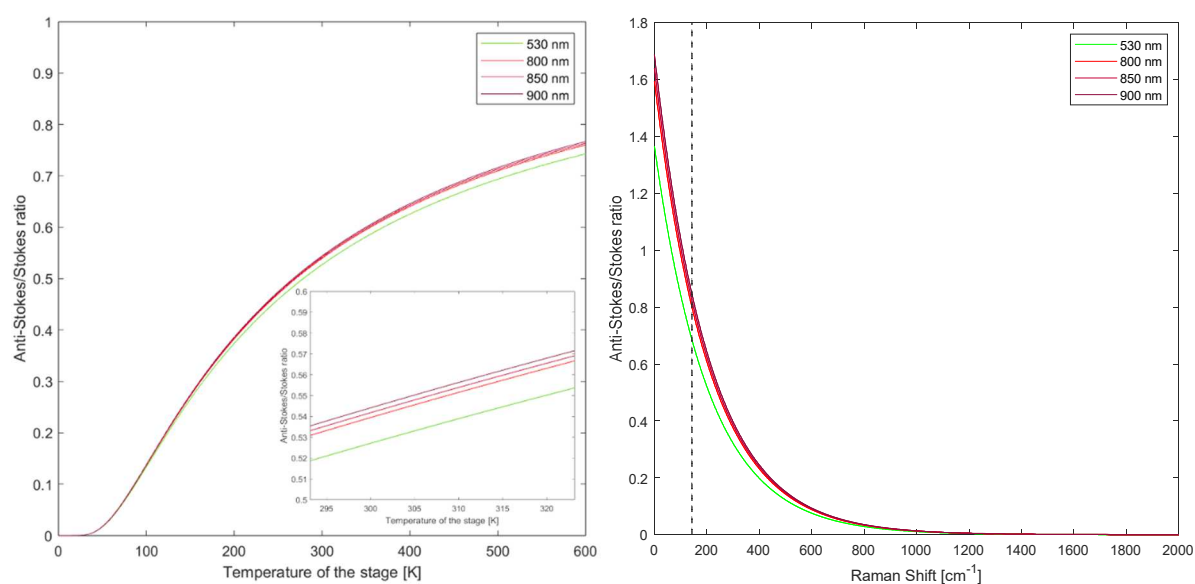


Figura 3. 3: A sinistra, andamento del rapporto tra le intensità dei segnali anti-Stokes su Stokes al variare della temperatura a diverse lunghezze d'onda del laser considerando il modo normale dell'anatasio a 143 cm^{-1} . È riportato un ingrandimento tra 20 e 50°C. A destra, andamento del rapporto tra le intensità dei segnali anti-Stokes su Stokes al variare del Raman shift associato al modo normale selezionato alla temperatura di 298.15 K. La linea tratteggiata evidenzia il modo a 143 cm^{-1} . Per i grafici è stata impiegata la (eq. 2.17) con $C=1$.

3.3 Core-shell di Ag@TiO₂

L'adozione di un arrangiamento core-shell di Ag@TiO₂ permette di proteggere le nanoparticelle d'argento dalla dissoluzione e ossidazione da parte di agenti esterni e dell'ambiente circostante durante la loro azione antimicrobica, andandone a prolungarne il periodo d'azione [38] [43]. Se si forma una shell di titanina sottile e porosa, tale da permettere diffusione di molecole e ioni con seguente variazione della costante dielettrica, l'argento può essere rilasciato lentamente all'esterno andando ad aumentare la citotossicità complessiva, assieme alla tossicità fototermica dovuta all'assorbimento plasmonico del *nanoheater* [44]. Una volta rimosso completamente il core, si ottengono delle *hollow-*

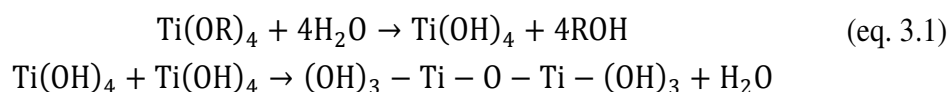
core-shell di titania che possono essere utilizzate per *drug delivery*, per microencapsulazione e in fotonica [45].

Il core di argento agisce da fotosensibilizzante nei confronti della titania, portandola ad avere un contributo di assorbimento nel visibile ($\lambda \approx 400$ nm), modulabile variando le dimensioni del core, che migliora la sua attività fotocatalitica e la sua efficienza in condizioni ambientali [46]. L'argento inoltre ha un'energia di Fermi favorevole ($EF=0.4$ eV) ed è in grado di accettare gli elettroni fotogenerati nella shell, riducendo significativamente la velocità di ricombinazione buca-elettrone [38]. La maggior concentrazione di buche nella banda di valenza aumenta dunque l'efficienza complessiva per la degradazione delle molecole organiche. Le $Ag@TiO_2$ trovano impiego anche nelle *Dye-Sensitized Solar Cells* (DSSCs), dove la risonanza plasmonica del core porta ad un maggior assorbimento della luce da parte dei coloranti adsorbiti sulla shell, e come precursori per la sintesi plasmonica di perovskiti colloidali per celle solari [47].

Per l'applicazione nella nanotermometria Raman, si prevede che la presenza del core d'argento vada a migliorare le prestazioni attese dalle nanoparticelle di titania, in quanto la risonanza plasmonica delle AgNPs andrebbe ad amplificare per effetto SERS i segnali dell'anatasio lavorando nel visibile. Per quanto riguarda l'impiego nella terapia fototermica, il core d'argento fungerebbe da *nanoheater* mentre la shell da nanotermometro. Dal momento che nella PTT è preferibile lavorare nel NIR piuttosto che nel visibile, è interessante approfondire se vi sia qualche contributo del plasmone anche a queste lunghezze d'onda.

3.4 Sintesi di Core-Shell di $Ag@TiO_2$

Le sintesi di core-shell di $Ag@TiO_2$ riportate in letteratura appartengono alla categoria dei metodi Sol-Gel [29]. Si tratta di sintesi umide dove avvengono reazioni di idrolisi di specifiche molecole di precursore, in genere alcossidi, seguite da policondensazione, in questo caso attorno al core metallico:



Quando si deve decidere quale alcossido di titanio utilizzare, bisogna considerare che gruppi R stericamente ingombrati per ramificazione e con un elevato numero di carboni portano ad avere alcossidi più stabili, dunque idrolisi più lente e controllabili [48]. Per questo motivo, spesso in letteratura è impiegato tetrabutossido di titanio $Ti(OBu)_4$ (TOB) invece dei corrispondenti etossido e isopropossido (TTIP), con il vantaggio addizionale di essere più economico. Le nanoparticelle d'argento su cui viene fatta crescere la shell sono in genere ottenute per riduzione di suoi sali, con il riducente che ne determina velocità di accrescimento e dimensioni.

In genere i problemi delle sintesi di $Ag@TiO_2$ sono quelli riscontrati anche per altre categorie di core-shell:

- agglomerazione delle nanoparticelle metalliche nell'ambiente di reazione;

- formazione preferenziale di particelle di titania isolate piuttosto che loro condensazione sul core per formare la shell. Si parla in questo caso di nanocompositi;
- rivestimento incompleto del core;
- difficoltà nel controllo della velocità di reazione.

Queste problematiche sono state affrontate in letteratura sviluppando diversi tipi di sintesi Sol-Gel tramite riduzione chimica, assistita da radiazioni e con micelle inverse [49]. All'interno della prima categoria è possibile ulteriormente distinguere tra metodi a due stadi, in cui particelle metalliche precedentemente sintetizzate e purificate vengono ricoperte dalla shell tramite loro modificazione superficiale, e metodi *one-pot*, in cui la shell viene fatta crescere in situ nello stesso pallone di reazione in cui è stato ottenuto il core grazie alle diverse velocità dei processi di riduzione e d'idrolisi [29].

3.5 Sintesi *One-Pot*

La grande maggioranza delle sintesi sviluppate negli ultimi anni appartengono alla classe delle reazioni *one-pot*. Dal momento che la formazione delle nanoparticelle metalliche e il loro rivestimento avvengono nello stesso ambiente di reazione, è particolarmente difficile controllare il processo di accrescimento del core per ottenere le dimensioni desiderate [48]. A tal proposito spesso è necessaria la presenza di stabilizzanti o inibitori di crescita. Inoltre, se si desidera avere una shell uniforme e completa, si deve ricorrere a surfattanti o polimeri con il rischio di avere impurezze intrappolate all'interfaccia argento titania.

Uno schema delle sintesi *one-pot* di letteratura è riportato in Figura 3.4. In quasi tutte il nitrato d'argento AgNO_3 è stato scelto come precursore delle AgNPs ad eccezione di quella di Wang et al. dove acetato d'argento viene ridotto da 1-dodecilammina con seguente amminolisi di complessi di carbossilati di titanio [50]. Peculiare è la separazione dei processi di formazione del core e della shell tramite controllo della temperatura della miscela di reazione. A 120°C , infatti, solo nanoparticelle d'argento sono prodotte mentre il TOB reagisce con l'acido oleico (OLEA) per formare carbossilati. In un secondo momento, a 150°C , questi reagiscono con la dodecilammina portando all'accrescimento della shell di titania. La sintesi di Wang ha però lo svantaggio di richiedere più di due giorni di trattamento termico.

Liz-Marzán et al. hanno utilizzato la N,N-dimetilformammide (DMF) come riducente e solvente basico per l'idrolisi del TOB, rallentata dall'agente chelante acetilacetone [51] [52]. Li et al. hanno impiegato anche cloruro di cetiltrimetilammonio (CTAC) quale stabilizzante per evitare l'aggregazione e l'adesione delle nanoparticelle d'argento sulle pareti del pallone e per facilitarne il rivestimento [31] [53]. In altre sintesi simili sono stati adottati come precursori della shell TTIP [35] [49] [34] [32], e isopropossido di titanio-trietanolaminato (TTEAIP) [54] [55] [36] [56] [40]. In particolare, nella procedura di Zhang et al. *hollow-core-shell* sono ottenute successivamente tramite precipitazione di cloruro d'argento formato attaccando il core con NaCl invece del più comune CCl_4 [49].

Afanasyev et al. hanno sostituito la DMF con boroidruro di sodio NaBH_4 , per la sua

elevata azione riduttiva e la sua capacità di stabilizzare le AgNPs [47]. Un riducente meno aggressivo quale l'idrazina è stato utilizzato assieme a bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB) come stabilizzante e TTIP come precursore [57] [58] [43] [59]. L'impiego di disolfato di titanio $Ti(SO_4)_2$ al posto del TTIP da parte di Lin et al. ha portato a strutture dove il core non era più al centro [60]. Nithyadevi et al. hanno trovato che l'uso di alginato di sodio come stabilizzante permette di ottenere core più sferici e grandi [41].

Un'alternativa all'utilizzo di sostanze tossiche e pericolose come agenti riducenti è stata proposta da Abdulla-Al-Mamun et al., dove viene impiegato citrato di sodio, che funge anche da stabilizzante, e le sospensioni di $Ag@TiO_2$ risultano essere più stabili rispetto a quelle in DMF [44].

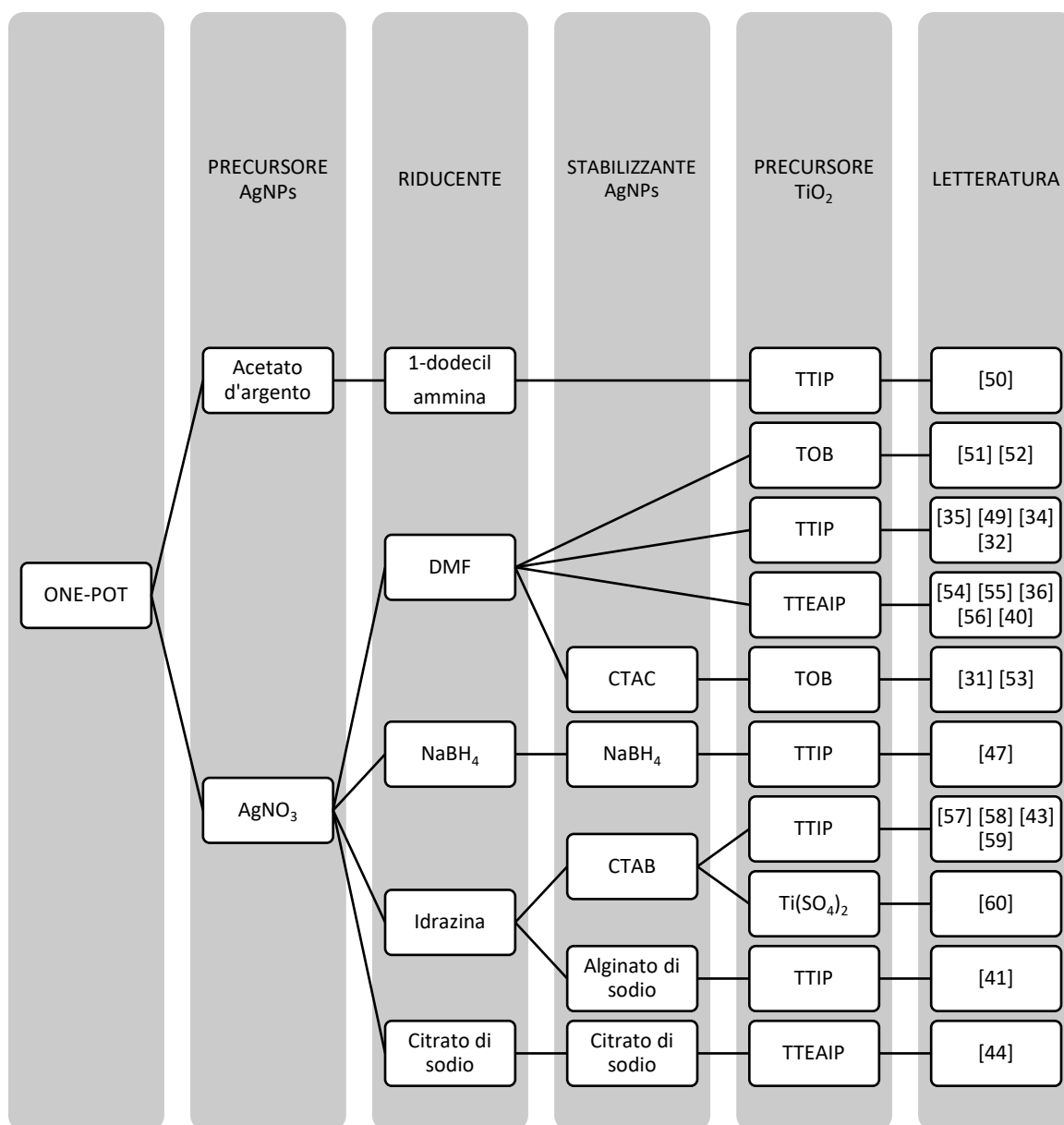


Figura 3. 4: Schema delle sintesi one-pot di core-shell di $Ag@TiO_2$ trovate in letteratura. I riferimenti specifici sono riportati in figura.

3.6 Sintesi a Due Stadi

Rispetto alle sintesi *one-pot*, un approccio a due stadi permette di sintetizzare e rivestire nanoparticelle di varie forme, anche non centrosimmetriche, e dimensioni, con maggiore monodispersione [61]. Il processo di crescita del core è controllato tramite stabilizzazione antecedente al rivestimento con surfattanti e stabilizzanti, in seguito rimossi tramite processi di centrifugazione, lavaggio ed essiccazione sottovuoto evitando così impurezze. Nonostante i vantaggi, il processo non ha prevalso in letteratura in quanto richiede tempi lunghi ed è fortemente sensibile all'ambiente di reazione, rendendolo inadatto ad applicazioni industriali dove è richiesta una produzione di massa delle core-shell [31].

Nelle sintesi adottate vengono in genere utilizzati come precursori delle AgNPs e di titania rispettivamente AgNO_3 e TOB, come evidente dallo schema di Figura 3.5. Eccezione è la procedura a polioli di Qi et al. dove è stato impiegato TTIP per rivestire il core, ottenuto riducendo il nitrato con glicole etilenico (EG) e stabilizzandolo con polivinilpirrolidone (PVP) e acido poliacrilico (PAA) prima e dopo la fase di purificazione delle nanoparticelle d'argento [62]. Analogo metodo è quello sviluppato due anni dopo da Yang et al. dove in un primo momento TOB ed EG reagiscono per formare una shell di glicolato di titanio, assicurando un miglior controllo sul rivestimento [46]. Quindi questa viene convertita a titania scaldando la sospensione acquosa di core-shell a $100\text{ }^\circ\text{C}$. Un'altra sintesi a polioli è quella di Demirörs et al. in cui al posto di EG viene impiegato l'1,5-pentanediolo come riducente e Lutensol ON50 come surfattante [45].

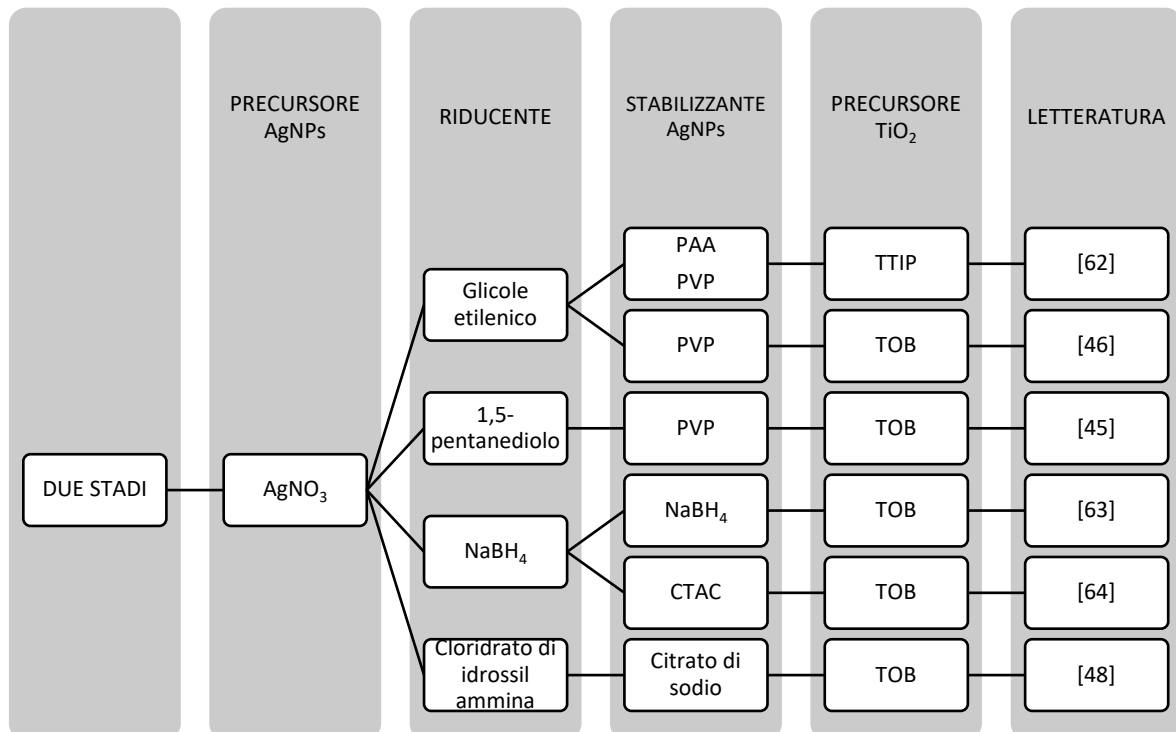


Figura 3. 5: Schema delle sintesi a due stadi di core-shell di Ag@TiO₂ trovate in letteratura. I riferimenti specifici sono riportati in figura.

Tra le sintesi di letteratura dove NaBH_4 è impiegato come agente riducente vi sono quelle di Kumbhar et al. [63], dove l'idruro funge anche da stabilizzante, e di Hong et al. [64], in cui le AgNPs sono stabilizzate con CTAC. Nel metodo impiegato da Bartosewicz et al. [48], le nanoparticelle d'argento sono state ottenute in ambiente acquoso basico riducendo con cloridrato di idrossilammina e stabilizzando con citrato di sodio. In quest'ultimo metodo, multicore-shell sono osservate con core di diametro di 20 nm o inferiore.

3.7 Sintesi Assistita da Radiazioni

Rispetto alle sintesi per riduzione chimica precedentemente descritte, queste sono caratterizzate dalla presenza di radiazione elettromagnetica impiegata come reagente ausiliario per l'ottenimento delle core-shell. Questo tipo di approccio, figlio della chimica verde, permette di ottenere nanoparticelle di argento in maniera pulita e senza l'introduzione di specifici agenti riducenti, spesso in eccesso, che potrebbero portare ad altre reazioni indesiderate e impurezze [65].

Nella sintesi di Banerjee et al., raggi γ sono utilizzati per la radiolisi dell'acqua in cui è disciolto AgNO_3 , con produzione di elettroni e radicali idrogeno che fungono da riducenti [38]. Peculiare è l'utilizzo della gomma arabica come stabilizzante del core per la sua solubilità in acqua, la sua non tossicità e la sua azione cappante tramite adsorbimento fisico non specifico. Per quanto riguarda la shell, segue il tradizionale processo di rivestimento con TTIP, non prima di aver aggiunto *scavenger* molecolari per terminare l'azione di altri radicali presenti nell'ambiente di reazione. Criticità di questo approccio è che, mentre lo stabilizzante viene sostituito dalla shell, il core tende ad aggregare e a crescere ulteriormente.

Differente è il meccanismo alla base dell'utilizzo delle microonde, radiazioni non ionizzanti e dunque meno pericolose rispetto alle γ , impiegate da Ebrahimi, Karimipour et al. nelle loro sintesi dove PVP funge da cappante e TTIP da precursore della titania [66] [67]. In questo caso ad agire come riducente è l'etanolo stesso, il cui utilizzo nelle condizioni di riscaldamento efficace ed omogeneo garantito dalle microonde è possibile grazie alla sua elevata capacità di dissipare calore e al potenziale di riduzione sufficientemente negativo [68].

3.8 Sintesi con Micelle Inverse

Una tipologia molto particolare di sintesi è quella che utilizza micelle inverse, nanobolle di acqua disperse nella fase organica e stabilizzate da surfattanti posti all'interfaccia, come nanoreattori per la sintesi di core-shell di Ag@TiO_2 [69]. L'ambiente finemente confinato in cui le nanoparticelle si trovano a crescere previene la loro eccessiva aggregazione e consente di ottenere una distribuzione monodispersa a piccole dimensioni. La morfologia dei prodotti può essere poi controllata grazie all'azione templante dei surfattanti presenti mentre le dimensioni del core sono regolate modulando il rapporto tra le concentrazioni di acqua e di surfattanti [70].

Zhang et al. hanno svolto la riduzione del reattivo di Tollens con glucosio nella fase acquosa mentre l'idrolisi di TOB all'interfaccia con la fase organica composta da toluene e due surfattanti non ionici, Span80 e Op10 [69]. Vaidya et al. invece hanno utilizzato microemulsioni acquose di nitrato d'argento, idrazina e idrossido di sodio in cicloesano, con tergitolo come surfattante e 1-ottanolo come co-surfattante [70]. Per il rivestimento delle AgNPs ottenute, si sono usati alternativamente tetrakisopropossido e idrossiacilato di titanio, quest'ultimo sintetizzato da TTIP e acido acetico glaciale. Ciò che è stato visto è che il secondo precursore idrolizza più lentamente e permette di ottenere una shell più completa.

3.9 Cristallizzazione della Shell

Come gran parte delle applicazioni presentate nella sezione 3.3, inclusa in particolar modo quella nella nanotermometria, è necessario calcinare le core-shell per ottenere anatasio con la possibilità che vadano incontro alla loro decomposizione, all'ossidazione del core e alla variazione delle caratteristiche superficiali della titania da idrofilica a idrofobica [20] [21]. Alcune delle strategie sintetiche di letteratura discusse in precedenza non si fermano ad una shell di titania amorfa ma proseguono con un trattamento termico, come riassunto nella Tabella 3.2.

Tabella 3. 2: Panoramica dei trattamenti termici adottati in letteratura per la cristallizzazione delle core-shell di Ag@TiO₂.

Sintesi	Trattamento termico	Solvente	Condizioni	Risultato
Wang, P. et al. [50]	Solvotermale	OLEA	150°C, 47 h	Anatasio
Nbelayim et al. [52]	Calcinazione	Etanolo	>500°C	Anatasio
Li et al. [31] [53]	Calcinazione	Acqua	800°C, 2 h	Rutilo
Dhanalekshmi et al. [34]	Annealing	Isopropanolo	650°C, 5 h	Anatasio
Khanna et al. [56] [40]	Calcinazione	Etanolo	450°C, 3 h	Anatasio
Nithyadevi et al. [41]	Calcinazione	Acqua	600°C, 2 h	Anatasio, rutilo
Qi et al. [62]	Annealing	EG	500°C, 15 min	Anatasio
Yang et al. [46]	Riflusso	Acqua	100°C, 2 h	Anatasio, rutilo
Wang, W. et al. [58]	Calcinazione	Acqua	180°C, 12 h	Anatasio
Kumbhar et al. [63]	Idrotermale	Acqua	350°C, 4 h	Anatasio
Hong et al. [64]	Calcinazione	Etanolo	500°C, 2 h	Anatasio
Banerjee et al. [38]	Annealing	Acqua	600-800°C	Anatasio (pura a 800°C)
Zhang, D. et al. [69]	Calcinazione	Micella inversa acqua toluene	500-800°C, 4 h	Anatasio, rutilo (da 775°C)
Karimipour et al. [67]	Microonde	Etanolo	450 W, 20 min	Anatasio

Ove svolta una procedura di calcinazione è stato ottenuto puro anatasio da 180 a quasi 600°C, mentre lavorando da 600 a 800°C si è vista la presenza del rutilo [31] [40] [41] [52] [53] [56] [58] [64] [69]. Le sintesi solvotermali sono risultate più pulite e con temperature mediamente più contenute, da 150 a 350°C, in genere superiori al punto di ebollizione del solvente [50] [63]. Ciò è compensato dalla generazione di una pressione autogena elevata per la cristallizzazione da parte dei vapori confinati nel reattore. Procedure di annealing, ovvero di riscaldamento termico superiore alla temperatura di

ricristallizzazione, portano ad anatasio tra 500 e 800°C [34] [38] [62]. Interessanti sono la sintesi di Yang et al., dove l'assistenza dell'argento permette di convertire la shell di glicolato di titania direttamente ad anatasio con impurezze di rutilo [46], e quella di Karimipour et al., dove il trattamento a microonde a 450 W per 20 minuti permette apparentemente di ottenere subito una shell di anatasio [67].

Parte II

Sezione Sperimentale

Capitolo 4

Materiali e Metodi

Per ottenere nanoparticelle core-shell di Ag@TiO₂ sono state seguite due differenti strategie sintetiche tra quelle presentate nel capitolo precedente, ovvero la sintesi *one-pot* di Liz-Marzán et al. [51] ed una nuova procedura a due stadi.

Nel metodo *one-pot*, il core di argento viene ottenuto tramite riduzione di AgNO₃ in DMF, mentre la shell per idrolisi controllata di tetrabutossido di titanio, in contemporanea e nello stesso ambiente di reazione.

Nella sintesi a due stadi, invece, le NPs di argento vengono sintetizzate in ambiente acquoso e stabilizzate in citrato in un processo separato e antecedente rispetto al rivestimento con la shell di TiO₂.

Per verificare l'efficacia delle core-shell sono state sintetizzate separatamente anche nanoparticelle d'argento in DMF e di anatasio in etanolo. Dal momento che le AgNPs in DMF così ottenute non sono stabili, si è deciso di utilizzare come riferimento nanoparticelle opportunamente sintetizzate tramite metodo Turkevich, ovvero per riduzione con citrato di sodio in acqua [71] [72].

Tutte queste reazioni sono trattate nel seguito, riferendosi ad esse schematicamente tramite gli acronimi presentati in Tabella 4.1. Le informazioni dei reagenti impiegati nelle sintesi sono invece riportate in Tabella 4.2. Frasi di pericolo H e consigli di prudenza P sono disponibili in forma estesa in Appendice A e B.

Tabella 4. 1: Legenda degli acronimi impiegati per le sintesi discusse nel presente lavoro di tesi.

Acronimo	Descrizione	Paragrafo associato
AgDMF	Sintesi di nanoparticelle d'argento in DMF	4.1
TiO ₂ A	Sintesi di nanoparticelle di titania anatasio	4.2
OP	Sintesi <i>one-pot</i> di core-shell di Ag@TiO ₂	4.3
AgCit	Sintesi di nanoparticelle d'argento stabilizzate in citrato	4.4
DS	Sintesi a due stadi di core-shell di Ag@TiO ₂	4.5

Tabella 4. 2: Reagenti impiegati per tutte le sintesi nel presente lavoro di tesi.

Composto	Formula molecolare	Massa molare [g/mol]	Marca CAS-No.	Purezza [%]	Punto di fusione/ebollizione [°C]	Densità [g/mL]	Fraresi H/P
Nitrato d'argento	AgNO ₃	169.87	Fluka 7761-88-8	≥99.0	212/-	-	H272, H290, H314, H318, H400, H410, P210, P260, P273, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338
N,N-dimetilformammide	C ₃ H ₇ NO (DMF)	73.09	Merck Millipore 68-12-2	≥99.8	-61/153 (1013 hPa)	0.944 (25°C)	H226, H312+H332, H319, H360D, P210, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P312, P305+P351+P338, P308+P313
Acqua bidistillata	H ₂ O	18.02	-	-	0/100	1.00	-
Tetrabutossido di titanio	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Ti (TOB)	340.32	Fluka 5593-70-4	≥97.0	<-75/206 (10 mmHg)	1.00 (20°C)	H226, H315, H318, H335, H336, P332+P313, P305+P351+P338, P310, P304+P340, P280, P303+P361+P353, P210
Acetilacetone	C ₅ H ₈ O ₂	100.12	Sigma-Aldrich 123-54-6	-	-23/140.4	0.975 (25°C)	H226, H302, H311+H331, P210, P280, P301+P312+P330, P302+P352+P312, P304+P340+P311
Etanolo	C ₂ H ₆ O (EtOH)	46.07	Sigma-Aldrich 64-17-5	≥99.8	-114/78	0.789 (25°C)	H225, H319, P210, P233, P240, P241, P242, P305+P351+P338
Citrato di sodio diidrato	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O	294.1	Fluka 6132-04-3	≥99.0	>300/309.6 (1013 hPa)	-	-

4.1 Sintesi di Nanoparticelle d'Argento in DMF

Le nanoparticelle d'argento sono state sintetizzate ponendo in una falcon da 50 mL AgNO₃ 3.8 mM e H₂O 0.8 M in DMF, secondo una variazione della procedura di Liz-Marzán et al. [73] [74]. La sospensione è stata trasferita in un pallone a tre colli da 250 mL e portata a riflusso tramite riscaldamento su bagno di olio silconico in presenza di agitazione magnetica. La reazione è stata lasciata procedere per almeno 60 minuti. Da un'iniziale colorazione gialla, la sospensione è diventata grigio-verde lattiginosa. Al termine della reazione nel pallone si sono osservate nanoparticelle d'argento depositate sul fondo.

Tabella 4. 3: Specifiche riguardanti le diverse sintesi di nanoparticelle d'argento in DMF AgDMF.

Sintesi	Massa AgNO ₃ [mg]	Volume H ₂ O [mL]	Volume DMF [mL]	Durata riflusso [min]
AgDMF1	21	0.48	33	60
AgDMF2	21	0.48	33	60
AgDMF3	22	0.48	33	90
AgDMF4	22	0.43	30	Reazione non portata a riflusso
AgDMF5	22	0.43	30	90

Maggiori dettagli sulle sintesi di nanoparticelle d'argento in DMF AgDMF eseguite sono riportati in Tabella 4.3. In particolar modo, si può vedere come le reazioni AgDMF1 e AgDMF2 siano state ottenute con la stessa procedura mentre nella AgDMF3 il tempo di riflusso è stato aumentato da 60 a 90 minuti, ovvero la stessa durata riportata in letteratura per la sintesi *one-pot* di core-shell di Ag@TiO₂ [51]. La sintesi AgDMF4, invece, è riferita ad una sospensione di AgNPs in DMF più concentrata, impiegata poi nella reazione *one-pot* OP4. In questo caso, una piccola aliquota è stata prelevata per monitorare in parallelo il processo di accrescimento delle nanoparticelle a temperatura ambiente tramite spettroscopia UV/Vis ogni 15 minuti. Si è osservata la variazione progressiva di colore da giallo a grigio-verde. Per quanto riguarda la AgDMF5, invece, 15 mL di AgNPs alla stessa concentrazione della AgDMF4 sono stati posti nel pallone a tre colli con 60 mL di etanolo. La miscela è stata portata a riflusso sotto agitazione magnetica e lasciata procedere per 90 minuti, tempo nel quale è rimasta di colorazione gialla. Ogni 15 minuti sono stati registrati spettri UV/Vis raccogliendo di volta in volta piccole aliquote utilizzate anche, dopo diluizione, per le analisi DLS.

4.2 Sintesi di Nanoparticelle di Anatasio

Due campioni di nanoparticelle di anatasio sono stati ottenuti seguendo due procedure differenti, come meglio specificato in Tabella 4.4.

Tabella 4. 4: Specifiche riguardanti le diverse sintesi di nanoparticelle di titania anatasio TiO₂A.

Sintesi	Volume TOB [μL]	Volume acetilacetone [μL]	Volume EtOH [mL]	Durata riflusso [min]
TiO ₂ A1	200	60	100	90
TiO ₂ A2	150	0	75	Reazione non portata a riflusso

Nella TiO₂A1 si è preso spunto dalla sintesi *one-pot* di core-shell di Ag@TiO₂ di Liz-Marzán et al, riportata anche nella sezione 4.4 [51]. In un matraccio da 100 mL è stata preparata una soluzione di TOB/acetilacetone 5.75 mM in etanolo. Questa è stata trasferita in un pallone a tre colli da 250 mL e portata a riflusso tramite riscaldamento con bagno silconico su piastra riscaldante e con agitazione magnetica. Si è aggiunta acqua fino ad osservare lo sviluppo di una colorazione bianca opaca (4 mL in totale), poi si è lasciato reagire per 90 minuti. La sospensione è stata lasciata raffreddare in una bottiglia di vetro da 100 mL, quindi è stata centrifugata e lavata 2 volte con etanolo. Dopo trasferimento in una falcon da 50 mL, è stata posta in forno in un liner di teflon da 150 mL a 150°C per 24

h. Al termine del trattamento solvotermale, il precipitato sul fondo è stato disciolto in etanolo ottenendo una sospensione bianco lattiginosa. Dopo centrifugazione e due lavaggi con etanolo, si è lasciato essiccare sottovuoto il solido bianco. Si è ottenuto un campione marrone che, dopo macinazione per analisi Raman e XRD, è risultato bianco.

La sintesi $\text{TiO}_2\text{A2}$ segue una variazione della procedura di Hong et al. e di quella precedente, ovvero senza aggiunta di acetilacetone [64]. In una beuta da 75 mL è stata preparata una soluzione di TOB 5.75 mM in etanolo, posta sotto agitazione magnetica. Si sono aggiunti 4 mL di acqua e riscaldato leggermente fino ad osservare lo sviluppo di una colorazione bianca opaca, quindi si è lasciato agitare il tutto per 20 minuti. La sospensione, riportata in Figura 4.1, è stata lasciata raffreddare e poi posta in forno in un liner di teflon da 150 mL a 150°C per 24 h. Al termine del trattamento solvotermale, il precipitato sul fondo è stato disciolto in etanolo ottenendo una sospensione bianco lattiginosa. Dopo centrifugazione si è lasciato essiccare sottovuoto il solido bianco, poi macinato per analisi Raman.

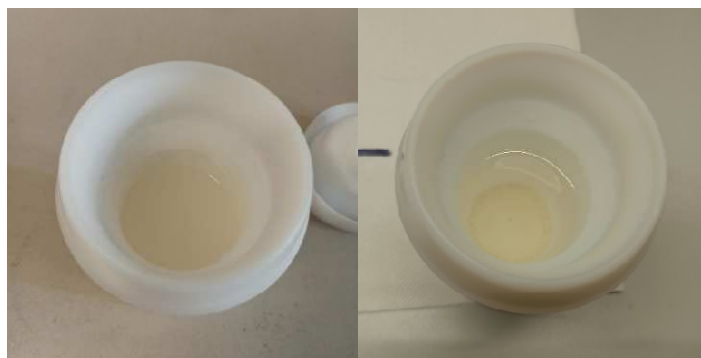


Figura 4. 1: Sospensione $\text{TiO}_2\text{A2}$ prima e dopo trattamento solvotermale a 150°C per 24 h.

4.3 Sintesi *One-Pot* di Ag@TiO_2

Per la sintesi delle core-shell di Ag@TiO_2 è stata modificata la procedura *one-pot* di Liz-Marzán et al., riportata schematicamente in figura 4.2 [51].

In un matraccio da 100 mL è stata preparata una soluzione di TOB/acetilacetone 5.75 mM in etanolo, miscelata ed eventualmente sonicata prima dell'uso (soluzione 1). In una falcon da 50 mL protetta da un foglio di alluminio è stata preparata una soluzione di nitrato d'argento 3.8 mM e acqua 0.8 M in 30 mL di DMF (soluzione 2). In seguito all'aggiunta del riducente, la soluzione assume una colorazione gialla progressivamente sempre più intensa. In un pallone a tre colli da 250 mL sono state unite due aliquote delle due soluzioni in rapporto (soluzione 1):(soluzione 2) 4:1, le cui quantità specifiche utilizzate nelle 11 reazioni eseguite sono riportate in Tabella 4.5. In particolare i rapporti molari $\text{TiO}_2\text{:Ag}$ sono stati variati da 5.0:1 a 6.2:1.

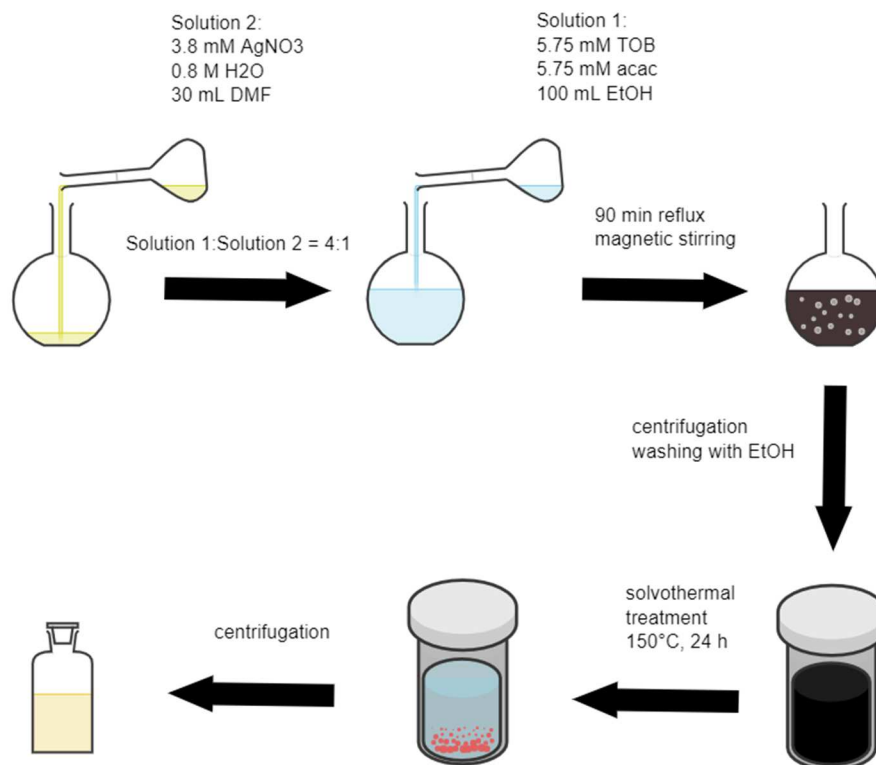


Figura 4. 2: Schema di reazione per le sintesi di core-shell one-pot (OP) seguite da trattamento solvotermale.

Tramite bagno di olio silconico su piastra riscaldante e con agitazione magnetica, la miscela è stata portata a riflusso. La reazione è stata lasciata procedere per almeno 80 minuti, tempo in cui da incolore è diventata prima rosata, poi marroncina-rossa e infine nera-marrone, come riportato in Figura 4.3. Per alcune delle sintesi *one-pot* OP in Tabella 4.5 si è monitorata la reazione tramite spettroscopia UV/Visibile e analisi DLS. In questi casi è specificato il periodo di tempo lasciato trascorrere tra una misura e quella successiva. Per la OP10 si è controllato inoltre il pH tramite cartine indicatrici al tornasole e si è constatato il non discostarsi dalla neutralità (6-7).

Tabella 4. 5: Specifiche riguardanti le diverse sintesi one-pot di Ag@TiO₂ OP eseguite.

Sintesi	Massa AgNO ₃ [mg]	Volume soluzione 1 [mL]	Volume soluzione 2 [mL]	Rapporto molare TiO ₂ :Ag	Durata riflusso [min]	Intervallo monitoraggio UV/Vis [min]	Frequenza monitoraggio DLS [min]
OP1	22	20	5	5.4:1	90	-	-
OP2	21	60	15	5.7:1	90	-	-
OP3	21	60	15	5.7:1	120	15	-
OP4	22	100	25	5.3:1	100	15	-
OP5	22	60	15	5.3:1	90	15	15
OP6	21	60	15	5.6:1	90	-	-
OP7	23	100	25	5.1:1	90	15	30
OP8	23	100	25	5.1:1	90	15	30
OP9	23	100	25	5.2:1	80	20	20
OP10	23	100	25	5.0:1	90	20	20
OP11	19	100	25	6.2:1	90	15	-

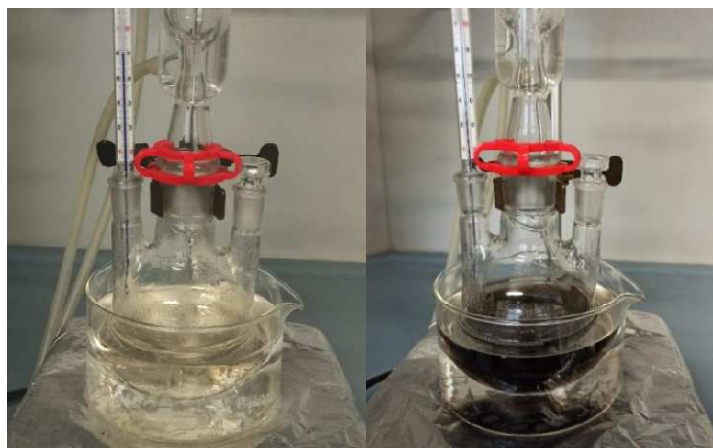


Figura 4. 3: Colore della miscela di reazione per la sintesi one-pot OP11 prima e dopo riflusso di 90 minuti.

Al termine del riflusso, la sospensione è stata trasferita su una bottiglia di vetro da 100 mL e lasciata raffreddare. Quindi si è proceduti alla sua centrifugazione su provette di teflon e lavaggio due volte con etanolo, ad eccezione della OP11 dove è stato svolto un singolo lavaggio. Il precipitato nero è stato portato in sospensione in etanolo su una falcon da 50 mL, per poi essere trasferita in un liner di teflon ed essere lasciata in forno a 150°C per 24 h. Il ricavato è stato centrifugato e, tranne che per la OP11, lavato due volte con etanolo. Il solido nero-marrone è stato lasciato ad essiccare sottovuoto prima di procedere con l'analisi Raman.

4.4 Sintesi di Nanoparticelle d'Argento con Citrato

Per la sintesi di nanoparticelle d'argento AgCit, in soluzione acquosa si è adattata la procedura di letteratura di Lee et al. [72]. In un matraccio opportuno è stata preparata una soluzione di nitrato d'argento in acqua, mentre in una fiala di vetro da 5 mL è stata preparata una soluzione acquosa all'1% di citrato di sodio diidrato. La prima è stata versata all'interno di un pallone a tre colli e, tramite riscaldamento con olio silconico su piastra riscaldante e agitazione magnetica, è stata portata a riflusso. Quindi si è aggiunta la seconda soluzione e la miscela si è progressivamente colorata di giallo-rosso fino a diventare grigio-verde. Il contenuto del pallone è stato raccolto in una bottiglia di vetro da 250 mL e lasciato raffreddare. Si è poi proceduti a centrifugare, lavando due volte con acqua. Dopo essiccazione sottovuoto si è ottenuto un solido nero dai riflessi metallici. Le quantità specifiche impiegate nelle sintesi sono riportate in Tabella 4.6. A differenza delle AgCit1 e AgCit2, nella AgCit3 il volume di soluzione di AgNO₃ è il doppio e il riflusso è stato lasciato proseguire 5 minuti in più rispetto ai 70 riportati in letteratura [72].

Tabella 4. 6: Specifiche riguardanti le diverse sintesi di nanoparticelle d'argento stabilizzate in citrato AgCit.

Sintesi	Massa AgNO ₃ [mg]	Massa citrato [mg]	Volume H ₂ O [mL]	Durata riflusso [min]
AgCit1	22	28	100	70
AgCit2	22	27	100	70
AgCit3	37	40	200	75



Figura 4. 4: Da sinistra a destra, variazioni di colore osservate nei primi dieci minuti da riflusso per il primo stadio delle sintesi di core-shell a due stadi DS9 e DS10.

4.5 Sintesi a Due Stadi di Ag@TiO₂

Le nanoparticelle core-shell di Ag@TiO₂ sono state preparate anche tramite un processo a due stadi, riassunto in Figura 4.5.

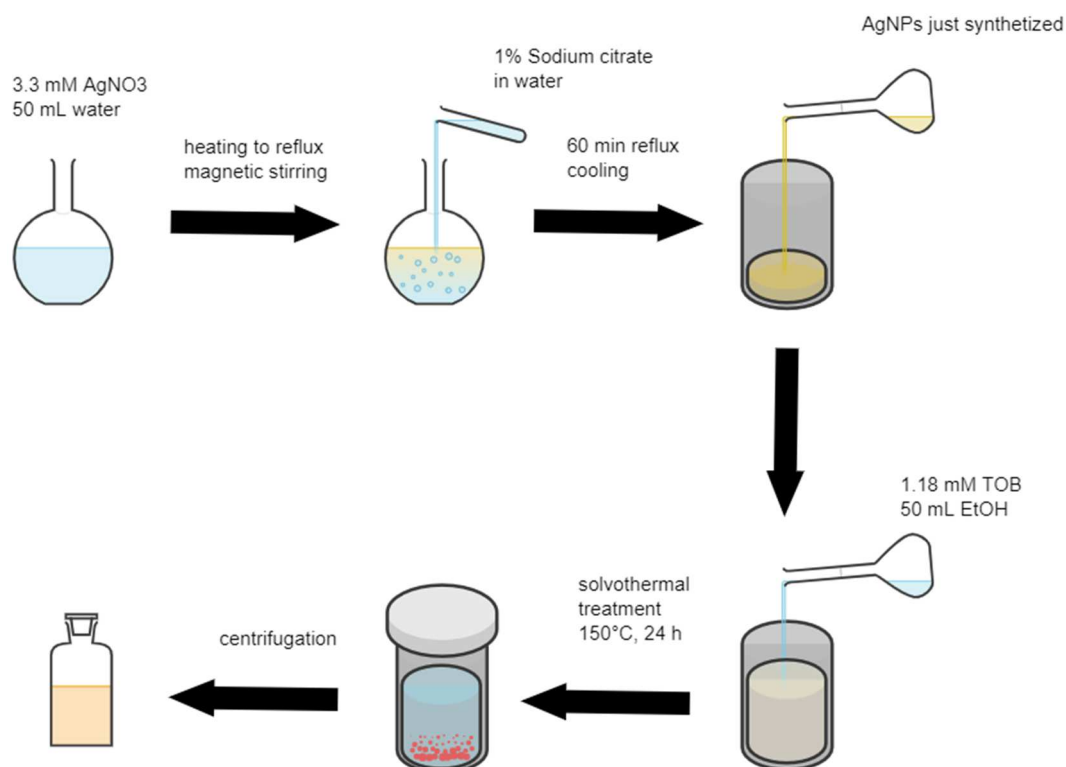


Figura 4. 5: Schema di reazione per le sintesi a due stadi delle core-shell di Ag@TiO₂ DS.

Nel primo passaggio, sospensioni da 50 mL di nanoparticelle d'argento sono state sintetizzate in modo analogo alla procedura di sezione 4.4, con la differenza che non si è eseguito alcun lavaggio dopo la prima centrifugazione. Per le reazioni DS1, DS2, DS3, DS4 l'iniziale volume di 200 mL è stato ridotto tramite centrifugazione e posto in un matraccio da 50 mL. Le variazioni di colore per il primo stadio nei primi dieci minuti da riflusso sono riportate in Figura 4.4 e sono le stesse osservate per le sintesi AgCit. Nel

secondo passaggio, una soluzione 1.18 mM di TOB in etanolo è stata preparata in un matraccio da 50 mL. In un liner di teflon da 23 mL, sono state aggiunte nell'ordine quantità variabili di AgNPs 3.3 mM, specificate in Tabella 4.7, e 10 mL di soluzione di TOB. Dopo un trattamento solvotermale a 150°C per 24 h, si è ridisperso il precipitato e centrifugato la sospensione per effettuare le analisi XRD e Raman.

Tabella 4. 7: Specifiche riguardanti le diverse sintesi di Ag@TiO₂ a due stadi DS.

Sintesi	Massa AgNO₃ [mg]	Massa citrato [mg]	Volume soluzione citrato [mL]	Rapporto molare TiO₂:Ag
DS1	28	50	5	36:1
DS2	28	50	5	18:1
DS3	28	50	5	12:1
DS4	28	50	5	8.9:1
DS5	28	33	3	9.0:1
DS6	28	33	3	6.0:1
DS7	28	33	3	5.6:1
DS8	28	33	3	5.2:1
DS9	30	32	3	17:1
DS10	30	32	3	6.1:1

Capitolo 5

Caratterizzazione

5.1 Spettroscopia UV/Visibile

La spettroscopia ultravioletta/visibile (UV/Vis) è una tecnica spettroscopica che studia l'interazione della radiazione elettromagnetica, nella regione spettrale dell'UV (10-400 nm) e del visibile (400-750 nm), con la materia [75]. È chiamata anche spettroscopia elettronica in quanto studia le transizioni degli elettroni di valenza da uno stato elettronico all'altro. Per esempio, se si considera un sistema a due livelli elettronici rispettivamente ad energia E_1 ed E_2 , si osserva una transizione quando l'energia dei fotoni incidenti soddisfa la condizione di risonanza [75]:

$$h\nu = E_2 - E_1 \quad (\text{eq. 5.1})$$

Ad ogni singola transizione elettronica corrisponde un picco nello spettro UV/Vis, riportato in assorbanza A contro la lunghezza d'onda a λ in nm. L'assorbanza è definita come il logaritmo in base dieci del reciproco della trasmittanza T , che quantifica quanta della radiazione incidente è stata trasmessa dal campione:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) \quad (\text{eq. 5.2})$$

Dalla legge di Lambert-Beer, valida per specie assorbenti in ambiente omogeneo e in condizione di diluizione, ne deriva inoltre che A è pari al prodotto tra il coefficiente di assorbimento molare ϵ , lo spessore della cuvetta contenente il campione attraversato dalla radiazione b e la concentrazione del campione stesso C :

$$A = \epsilon b C \quad (\text{eq. 5.3})$$

Nelle sintesi svolte, la spettroscopia UV/Vis è stata impiegata principalmente per monitorare la banda plasmonica dell'argento e delle core-shell di Ag@TiO_2 . Gli spettri sono stati registrati tramite uno spettrofotometro a doppio raggio Agilent Cary 5000 UV-Vis-NIR impiegando due cuvette in quarzo da fluorescenza di cammino ottico 10x10 mm, attraverso il programma Cary WinUV Scan. Prima di ogni serie di misure è stata registrata

la *baseline* per rimuovere da esse il contributo del solvente ed ottenere il bilanciamento dei due raggi di misura.

5.2 Analisi DLS

La diffusione dinamica della luce (*Dynamic Light Scattering*, DLS), detta anche spettroscopia a correlazione di fotoni (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS), è una tecnica impiegata per monitorare la dimensione delle nanoparticelle, con limite di rivelabilità di 1 nm, sebbene le misure siano considerate affidabili nell'intervallo 10-200 nm [76]. Il parametro dimensionale di riferimento è il diametro idrodinamico (D_H), dove le particelle sottoposte a moto termico casuale di tipo browniano sono considerate quali sfere rigide ideali con lo stesso coefficiente di diffusione traslazionale D_t delle nanoparticelle disperse in un mezzo con viscosità assoluta η :

$$D_t = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_H} \quad (\text{eq. 5.4})$$

La (eq. 5.4) è nota come equazione di Stokes-Einstein. D_H dipende dalla superficie, dalla forza ionica, dalla morfologia, dall'aggregazione delle particelle e considera anche la loro sfera di solvatazione. Per poterlo stimare è necessario prima trovare il coefficiente di diffusione utilizzando la teoria della diffusione di Mie, valida per particelle più grandi di $\lambda/10$, in cui l'intensità fluttuante nel tempo della luce diffusa in modo anelastico è dipendente dalla dimensione delle nanoparticelle e dall'angolo di diffusione θ . Operativamente la procedura consiste nella determinazione della funzione di autocorrelazione dell'intensità (*Intensity Autocorrelation Function*, ACF) normalizzata $g_2(\tau)$, che esprime la correlazione tra il valore assunto dall'intensità della luce diffusa al tempo t e ad un istante successivo $t+\tau$ [76]:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (\text{eq. 5.5})$$

Essa viene estrapolata dal correlogramma della funzione di correlazione del campo elettrico grezza (*raw correlation function*, RCF), $|g_1(\tau)|^2$, contro il tempo:

$$|g_1(\tau)|^2 = \frac{g_2(\tau) - B}{\beta} \quad (\text{eq. 5.6})$$

dove B è la *baseline*, circa pari a 1, e β il fattore di coerenza che dipende dall'area del rivelatore, dall'allineamento ottico, e dalle proprietà diffusive del campione. La ACF in genere è modellata da un singolo esponenziale contenente il coefficiente di diffusione traslazionale:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta * \exp\left(-\frac{32\pi^2\eta^2}{\lambda^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) D_t \tau^2\right) \quad (\text{eq. 5.7})$$

La distribuzione dimensionale ottenuta in funzione dell'intensità della luce diffusa è nota come *Intensity Size Distribution*, la cui ampiezza corrisponde all'indice di polidispersione PDI, pari al quadrato del rapporto tra la deviazione standard della luce diffusa da diverse frazioni dimensionali di particelle e il valor medio. La dipendenza della distribuzione dal correlogramma e dalle oscillazioni di intensità è riportata in Figura 5.1. L'analisi DLS è considerata affidabile quando $PDI < 0.7$, ovvero quando il campione è sufficientemente polidisperso. La distribuzione di intensità tende a sopravvalutare il contributo delle particelle di più grandi dimensioni anche quando presenti in piccole quantità.

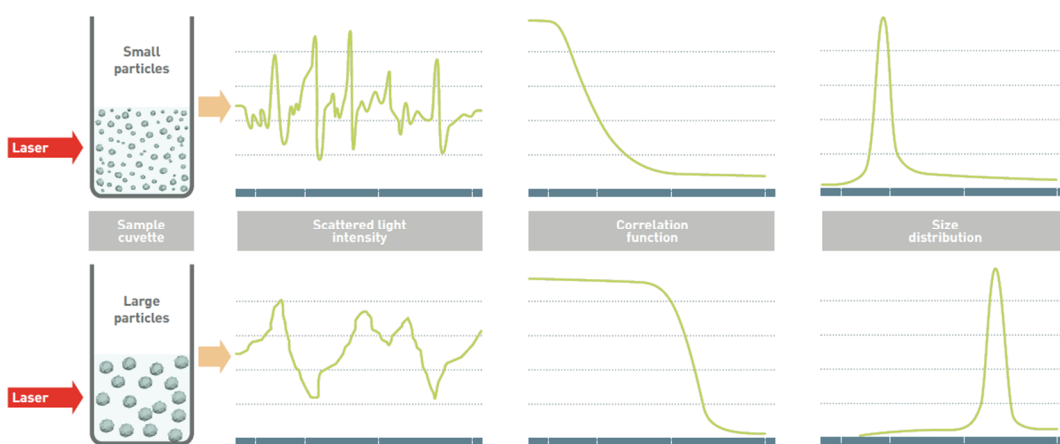


Figura 5. 1: Distribuzione dimensionale, funzione di correlazione e ampiezza delle fluttuazioni dell'intensità diffusa per nanoparticelle di piccole e grandi dimensioni [77].

L'analisi DLS è vantaggiosa in quanto non è una tecnica distruttiva o invasiva, è rapida e applicabile a tutte le miscele, con opportuni accorgimenti. Nelle sintesi svolte è stato impiegato un Malvern ZS nano Dynamic Light Scattering utilizzando cuvette in plastica monouso ZENO112. I campioni sono stati preparati diluendo opportunamente le sospensioni di partenza, filtrandole con filtro da siringa da $0.45 \mu\text{m}$ e ponendole in bagno ad ultrasuoni per qualche minuto. In genere si è visto che il trattamento ad ultrasuoni rende i valori di diametro idrodinamico più stabili e meno affetti da aggregazione. In presenza di DMF come solvente, si è proceduti invece a diluire in etanolo vista la sua incompatibilità con le cuvette impiegate. I valori di diametro idrodinamico discussi nel capitolo successivo sono tutti stimati a partire dalla distribuzione numerica, più sensibile a nanoparticelle di piccole dimensioni se in grande quantità, ma anche al rumore. Sono state scartate le misure in cui $PDI > 0.7$ o dove il laser non era a fuoco sul campione.

5.3 Diffrazione a Raggi X

La diffrazione a raggi X (*X Ray Diffraction*, XRD) è una tecnica in grado di identificare e determinare la struttura cristallografica di un campione solido cristallino tramite la diffusione elastica di fotoni X. Questi sono prodotti nel processo di rilassamento allo stato fondamentale di specie atomiche ionizzate a livello dei gusci più interni e hanno energia pari alla differenza tra quelle degli orbitali dell'elemento coinvolto [78]. In seguito ad interferenza costruttiva (somma di radiazioni in fase) e distruttiva (somma di radiazioni in antifase) dei raggi X, si viene a creare un *pattern* di diffrazione caratteristico per ogni solido cristallino [79]. Nell'interpretazione di Bragg, il fenomeno della diffrazione è trattato come una riflessione della radiazione X incidente monocromatica a parità di angolo θ sul reticolo cristallino del campione, considerato come formato da piani reticolari, indicizzati secondo gli indici di Miller hkl , posti a distanza fissa d l'uno dall'altro:

$$\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta_{hkl} \quad (\text{eq. 5.8})$$

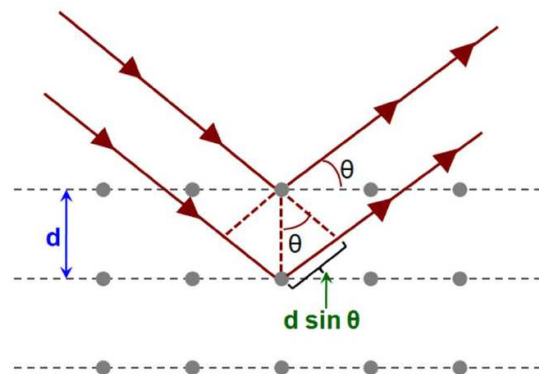


Figura 5. 2: Rappresentazione grafica della legge di Bragg dove i punti in grigio rappresentano gli atomi in corrispondenza dei piani reticolari [80].

Il processo è rappresentato schematicamente in Figura 5.2. I fotoni che interferiscono costruttivamente sono raccolti al rivelatore e riportati in un diffrattogramma in funzione del doppio dell'angolo di diffrazione. L'intensità dei picchi contiene informazioni sull'arrangiamento degli atomi nella cella cristallina e sul loro numero atomico. Tramite formula di Scherrer è possibile invece determinare le dimensioni dei cristalliti che compongono il campione, ovvero dei più piccoli domini di diffusione coerente presenti, secondo il principio per cui un allargamento del segnale è giustificato da una diminuzione delle dimensioni [79]:

$$D = \frac{K\lambda}{B\cos\theta} \quad (\text{eq. 5.9})$$

$K=0.9$ è il fattore di forma di Scherrer mentre B è la FWHM del picco di diffrazione in radianti. Dal momento che l'analisi dimensionale è influenzata maggiormente dai domini più grandi, i valori ottenuti dalla (eq. 5.9) permettono solo di stimare l'ordine di

grandezza dei cristalliti senza discriminare tra diametri molto simili fra loro. La dimensione dei cristalliti può essere considerata come il limite inferiore per il diametro delle nanoparticelle. I diffrattogrammi riportati nel presente elaborato sono stati registrati con un diffrattometro D8 Advance Plus in geometria Bragg-Brentano utilizzando come sorgente la radiazione K_{α} del rame ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$). I campioni essiccati sottovuoto ($\text{TiO}_2\text{A1}$) sono stati macinati in un mortaio di agata prima di essere trasferiti su un porta-campione *zero background* in silicio. Le sospensioni in etanolo invece sono state opportunamente depositate goccia a goccia su vetrini rimuovendo il solvente tramite piastra riscaldante.

L'elaborazione dei dati raccolti è stata volta a riconoscere i riflessi caratteristici e a stabilire l'abbondanza percentuale dell'anatasio e dell'argento. Tramite il programma DIFFRAC.EVA, Bruker, sono state identificate le fasi cristalline dei campioni, informazioni impiegate poi su DIFFRAC.TOPAS, Bruker, per determinare la dimensione dei cristalliti tramite metodo Rietveld [81]. Questo tipo di analisi è in grado di disaccoppiare riflessi di fasi cristalline sovrapposte in modo accurato, tramite metodo dei minimi quadrati applicato alla funzione differenza tra i profili cristallografici delle banche dati e quelli osservati. Il fondo viene sottratto tramite interpolazione con polinomio di Chebychev di ordine n (in particolar modo è stato impiegato $n=6$) assieme alla funzione di $1/X$ B kg, che permette di ridurre il numero di coefficienti $n+1$ richiesto e di tenere conto dell'innalzamento del fondo provocato dalla diffusione dell'aria nelle vicinanze del fascio primario. Terminata l'analisi Rietveld si ottengono le percentuali in massa delle fasi cristalline presenti, che possono essere migliorate specificando i piani reticolari ($h k l$) che hanno subito un accrescimento preferenziale rispetto agli altri. L'analisi XRD per il campione ottenuto dalla sintesi di core-shell a due stadi DS10, depositato su lastrina di silicio, è riportata come esempio in Figura 5.3.

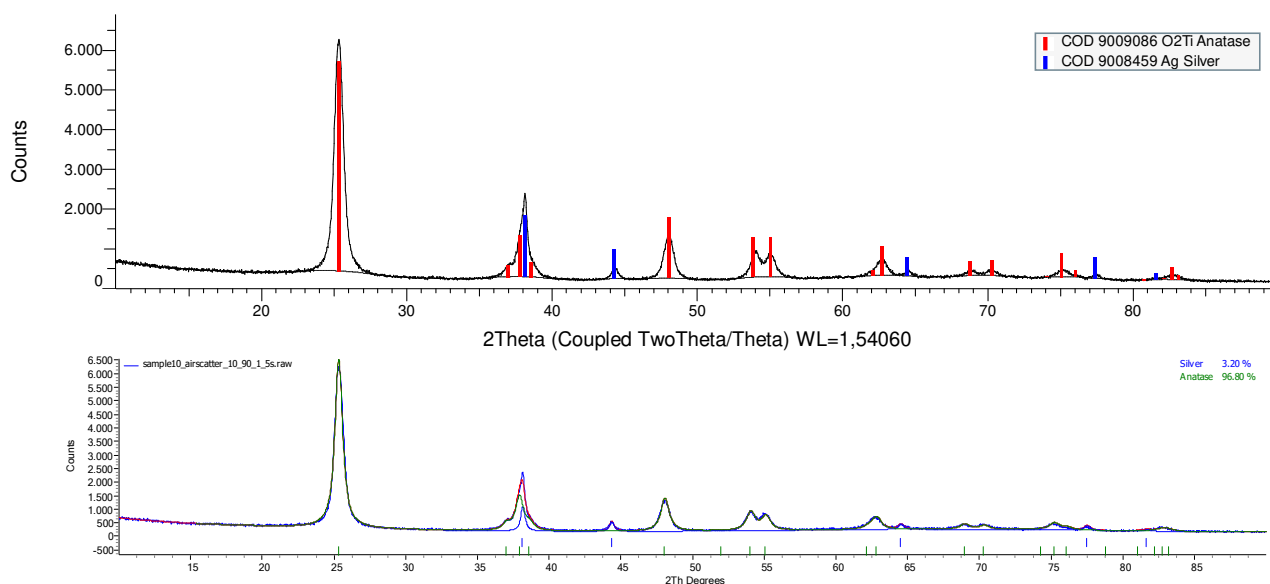


Figura 5. 3: In alto, identificazione delle fasi cristalline presenti nel diffrattogramma del campione della sintesi di core-shell a due stadi DS10 tramite DIFFRAC.EVA. In basso, separazione dei profili cristallografici tramite metodo Rietveld su DIFFRAC.TOPAS e abbondanza percentuale associata.

5.4 Microscopia Elettronica a Scansione ed EDX

Nella microscopia elettronica a scansione (*Transmission Electron Microscopy*, TEM), un fascio di elettroni accelerato e focalizzato da lenti elettrostatiche viene fatto collidere su un campione in condizioni di alto vuoto. La lunghezza d'onda degli elettroni incidenti può essere modulata tramite il potenziale di accelerazione, in quanto λ diminuisce a maggiori voltaggi [82]. Gli elettroni interagiscono in modo specifico con il materiale, principalmente tramite scattering elastico ($\propto Z^{4/3}$) per collisione con i nuclei e in minor parte per scattering anelastico ($\propto Z^{1/3}$) con gli elettroni di legame. Nuclei più pesanti attrarranno un maggior numero di elettroni, che si spingeranno più vicini ad essi e saranno maggiormente deviati dalla loro traiettoria iniziale.

Tramite TEM ad alta risoluzione (HRTEM) è possibile ottenere immagini in contrasto di fase in grado di risolvere singoli atomi o agglomerati e accedere alla loro struttura atomica [83]. È necessario avere una sorgente altamente coerente per il fascio di elettroni, con un sistema di lenti ben allineati e stabili, con poche aberrazioni e un rivelatore adeguato. L'immagine viene ottenuta per interferenza costruttiva tra gli elettroni diffusi considerando la loro natura ondulatoria. La sua qualità dipende dalla risoluzione (<0.1 nm), dal contrasto e dal rapporto segnale rumore (S/N). L'interpretazione dell'immagine, acquisita localmente, è facilitata dall'utilizzo di campioni molto sottili. Il contrasto è più elevato se gli elementi rivelati hanno un numero atomico Z molto diverso fra di loro, dove i più pesanti diffondono molti più elettroni rispetto a quelli più leggeri. In questo elaborato, si è deciso di utilizzare una scala colore per cui l'argento appare molto più scuro rispetto alla shell di titania. L'analisi HRTEM è stata eseguita depositando alcune gocce di sospensione sulla griglia di un TEM FEI Tecnai G2, disponibile presso il Dipartimento di Biologia, Padova.

Campioni solidi solubilizzati in etanolo sono stati indagati tramite un microscopio JEOL JEM-2100F (UHR) accoppiato ad un rivelatore per *energy dispersive x-ray spectroscopy* (EDX) Oxford UltimMax, presso il laboratorio CIC BiomaGUNE, San Sebastián. Tramite tecnica EDX, conosciuta anche come *energy dispersive spectroscopy* (EDS), è possibile ottenere informazioni chimiche sul campione [78]. I fotoni X prodotti per impatto dal fascio di elettroni sono raccolti da un rivelatore fotosensibile e vengono in genere riportati tramite istogrammi come numero di conteggi in funzione della loro energia in keV. Dalla posizione del picco e dalla sua area è possibile ottenere informazioni rispettivamente sull'elemento e la sua concentrazione. La presenza di radiazione di fondo è dovuta a raggi X prodotti da elettroni decelerati dal campo elettrostatico dei nuclei. Tramite EDX non è possibile distinguere specie ioniche da neutre, o elementi con $Z < 10$ e concentrazione minore di 10 ppm. La risoluzione spaziale varia da 10 nm a pochi μm . Nell'elaborato non saranno riportati EDX come istogrammi, bensì le rispettive mappe.

5.5 Strumentazione Raman

Gli spettri Raman sono stati misurati utilizzando due *set-up* micro-Raman in geometria di *back-scattering* collocati rispettivamente al terzo piano del Centro Interchimico e al primo piano del quadrilatero dell'ex-Dipartimento di Chimica Fisica. Per comodità di notazione, nel seguito ci si riferirà ad essi rispettivamente come Raman Didattico e Raman Triplo.

L'apparato Raman Didattico impiega un laser ad Ar⁺ (Spectra Physics), operante a 514 nm, accoppiato ad un microscopio (Olympus BX 40, Tokyo, Japan) equipaggiato con obiettivi 4x, 10x, 20x, 50x e 100x (Olympus SLMPL, Tokyo, Japan) [84]. Opportuni filtri *edge* e *notch* sono presenti rispettivamente per selezionare le transizioni Raman Stokes e rimuovere il contributo dello scattering elastico dallo spettro. La radiazione diffusa attraversa lo spettrografo (Triax-320 ISA) e viene rilevata tramite un sistema a conteggio di fotoni CCD (Spectrum One ISA Instruments) raffreddato ad azoto liquido.

L'apparato Raman Triplo, riportato in Figura 5.4, è equipaggiato con un laser in onda continua (*continuous wave, CW*) Ti:Zaffiro, modulabile nell'intervallo 675-1000 nm (MKS Instruments, Spectra Physics, 3900S, Santa Clara, CA, USA), pompato da un CW *Optical Pumped Semiconductor Laser* (Coherent, Verdi G7, Santa Clara, CA, USA) [22]. Il laser è accoppiato ad un microscopio (Olympus BX 40, Tokyo, Japan) e focalizzato sul campione con obiettivi 4x e 20x (Olympus SLMPL, Tokyo, Japan). La radiazione diffusa dal campione è raccolta nelle fenditure di uno spettrografo triplo (Jobin Yvon S3000, Horiba, Kyoto, Japan) costituito da un doppio monocromatore (Jobin Yvon, DHR 320, Horiba, Kyoto, Japan) con un filtro modulabile che permette di rimuovere la radiazione Rayleigh e uno spettrografo vero e proprio (Jobin Yvon, HR 640, Horiba, Kyoto, Japan). La rilevazione avviene tramite una CCD raffreddata ad azoto liquido (Jobin Yvon, Symphony 1024x256 pixels). Prima di ogni misura è stata eseguita una calibrazione misurando gli spettri di una lastrina di silicio ($\tilde{\nu}_{max} = 520 \text{ cm}^{-1}$) e/o una fiala contenente cicloesano ($\tilde{\nu}_{max} = 800 \text{ cm}^{-1}$), come riportato in Figura 5.5.

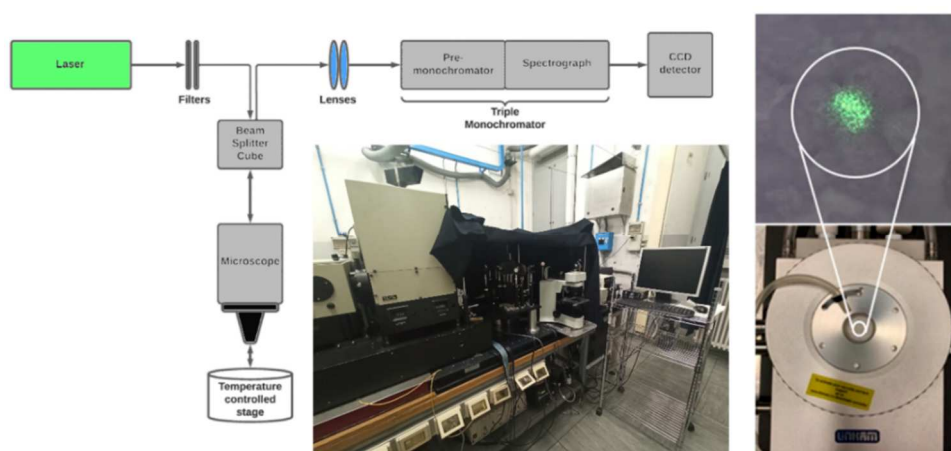


Figura 5. 4: Sulla sinistra micro-Raman del primo piano dell'ex Dipartimento di Chimica Fisica (Raman Triplo) e sua rappresentazione schematica, sulla destra il termostato impiegato con ingrandimento sullo spot del laser incidente sul campione al suo interno. Immagine adattata da [22].

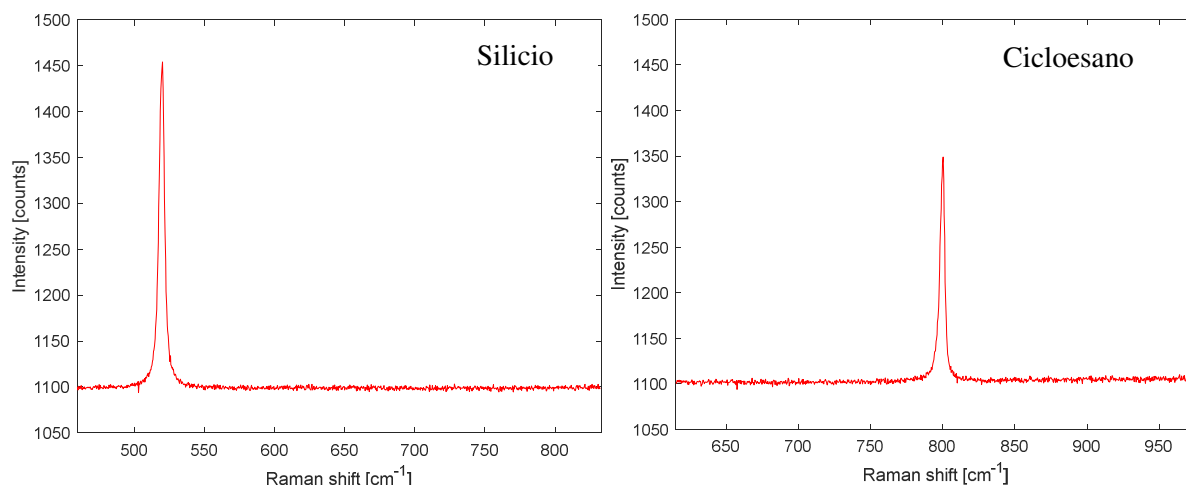


Figura 5. 5: Spettri Raman Stokes, rispettivamente di una lastrina di silicio e di una fiala contenente cicloesano, registrati al Raman Didattico eccitando a 800 nm, con una potenza di 11.0 mW, 10 acquisizioni al secondo.

Una prima elaborazione degli spettri registrati viene eseguita sottraendo la baseline quando presente un segnale di fondo, come riportato in Figura 5.6. Su uno spettro campione, sono stati selezionati un certo numero di punti per definire la linea di base, riportata in verde. Le ordinate di quest'ultima sono state sottratte per tutti gli spettri Stokes della serie, con un processo analogo per la parte anti-Stokes. Quindi l'intensità dei segnali rimanenti è stata determinata tramite interpolazione lorentziana.

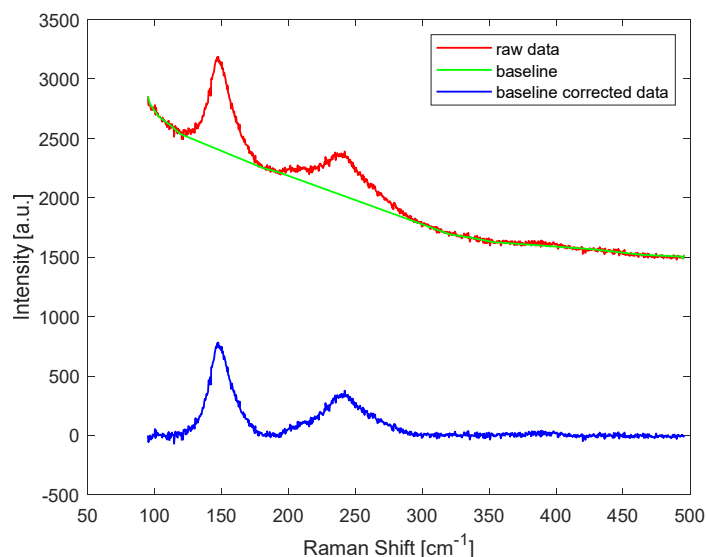


Figura 5. 6: Analisi tramite MATLAB dello spettro Raman Stokes per il campione ottenuto dalla sintesi OP4, termostato a 25°C. È stato registrato eccitando a 800 nm, con 5 acquisizioni per 5 secondi e $P_0=1.1$ mW. Dopo aver selezionato i punti della linea di base, riportata in verde, il fondo è stato sottratto dallo spettro rosso per ottenere quello in blu.

5.6 Protocollo per la nanotermometria

Le misure di nanotermometria sono state fatte con il Raman Triplo impiegando una cella termostata (Linkam, THMS600/720, Tadworth, UK) per controllare e variare la temperatura del campione in essa posto. Il riscaldamento e il raffreddamento avvengono con una velocità di 5 K/min e sono garantiti agendo rispettivamente sulla resistenza

elettrica interna al termostato e su un flusso di azoto liquido proveniente da una riserva esterna. Quest'ultima viene inoltre impiegata per rimuovere l'aria all'interno della cella e realizzare un'atmosfera inerte ogni qual volta viene posto un nuovo campione nel termostato. Per il raggiungimento e la stabilizzazione della temperatura impostata, si è deciso di attendere almeno 15 minuti. È possibile così raggiungere una sensibilità di 0.1 K variando la temperatura nell'intervallo tra -196 e 600°C. Per le nanotermometrie sono stati registrati gli spettri Stokes e anti-Stokes del campione ripetendo la misura tre volte per ogni lunghezza d'onda eccitatrice impiegata (530, 800, 850 e 900 nm), temperatura impostata (da 20 a 50°C) e potenza del laser sul campione P_0 modulata agendo sui filtri ottici OD (*Optical Density*) secondo la seguente relazione:

$$P_0 = P_{laser} f * 10^{-OD} \quad (\text{eq. 5.10})$$

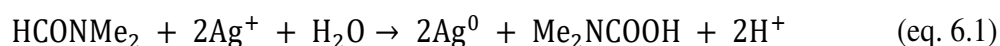
dove f è il fattore di taglio del microscopio, pari a 0.73 nel NIR e 0.8 nel visibile, mentre P_{laser} è la potenza in ingresso al microscopio in mW in assenza di filtri. Tramite la (eq. 5.10) è possibile eseguire misure di termometria confrontabili a parità di P_0 agendo sugli OD (da 4.0, filtro massimo, a 0), rendendosi indipendenti da fluttuazioni giornaliere della potenza. I dati sono stati raccolti con il software LabSpec di HORIBA e poi processati attraverso un opportuno programma di Matlab.

Capitolo 6

Risultati e Discussione

6.1 Sintesi di Nanoparticelle d'Argento

Nella sintesi di nanoparticelle d'argento AgDMF di Liz-Marzán et al. la specie HCONMe₂ (DMF) agisce da riducente nei confronti dell'argento (I) proveniente da AgNO₃ [74]. Il processo può essere descritto dalla (eq. 6.1), dove i potenziali di riduzione standard riferiti all'elettrodo standard a idrogeno (*Standard Hydrogen Electrode*, SHE) sono riportati nella (eq. 6.2):



$$\begin{aligned} E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} &= 0.7996 \text{ V} \\ E^\circ_{\text{Me}_2\text{NCOOH}/\text{Me}_2\text{NCOH}} &= -2.19 \text{ V} \end{aligned} \quad (\text{eq. 6.2})$$

Il potenziale di riduzione standard del DMF è stato stimato a partire da quello riportato in letteratura contro l'elettrodo al calomelano saturo (*Saturated Calomel Electrode*, SCE) [85]. L'acido carbammico formato decompone in genere ad anidride carbonica e dimetilammina, sebbene a temperatura ambiente sia favorito il processo inverso:



L'accrescimento delle AgNPs in DMF a temperatura ambiente, seguito per la sintesi AgDMF4 tramite spettroscopia UV/Vis, è riportato in Figura 6.1. Il processo è stato seguito ogni 15 minuti per un tempo complessivo di 2 ore, a cammino ottico costante imposto da quello della cuvetta impiegata. Non appena sintetizzate, ovvero a t=0, le nanoparticelle mostrano nello spettro la banda plasmonica dell'argento a 409 nm. Con il passare del tempo, si osserva la crescita di intensità del plasmon e anche un piccolo spostamento verso il blu nello spettro visibile (*blueshift*) del massimo di assorbimento, fino al valore di 407 nm. Ciò conferma che la formazione delle AgNPs in DMF è apprezzabile anche in condizioni standard (25°C, 1 bar) sebbene il processo non sia particolarmente veloce. I valori di lunghezza d'onda del massimo di assorbimento λ_{max} misurati durante il monitoraggio sono in accordo con quelli di letteratura (400-410 nm

[49] [51] [52] [57] [43]).

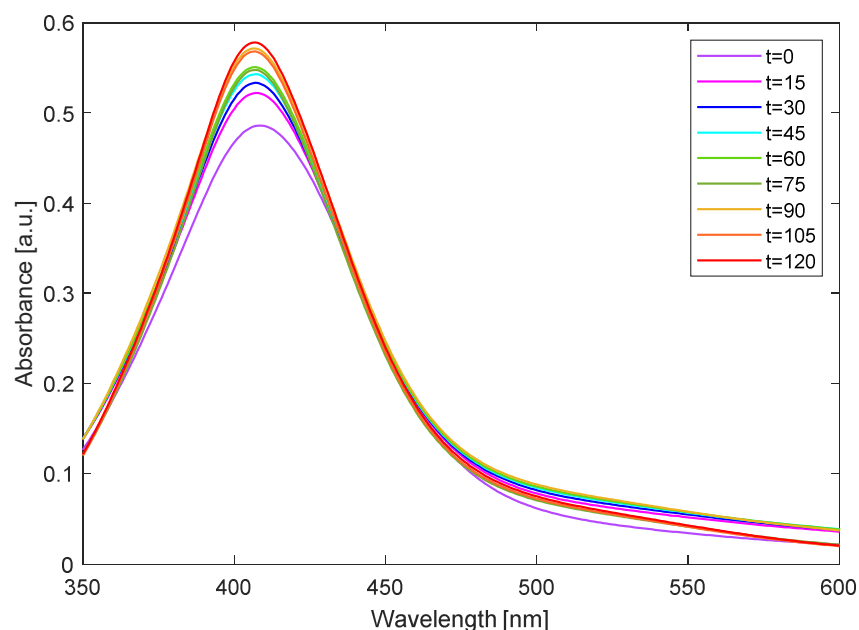


Figura 6. 1: Spettri UV/Vis registrati ogni 15 minuti per la sintesi AgDMF4 a partire da pochi istanti dopo la formazione delle prime AgNPs.

Non appena si procede ad aumentare la temperatura fino a riflusso, la banda plasmonica si allarga e si abbassa di intensità, come riportato nello spettro della sintesi AgDMF3 in Figura 6.2. Dopo 75 minuti dall'inizio del riflusso, inoltre, è presente un precipitato sul fondo del pallone. Le stesse osservazioni sono state riscontrate anche per le reazioni AgDMF1 e AgDMF2.

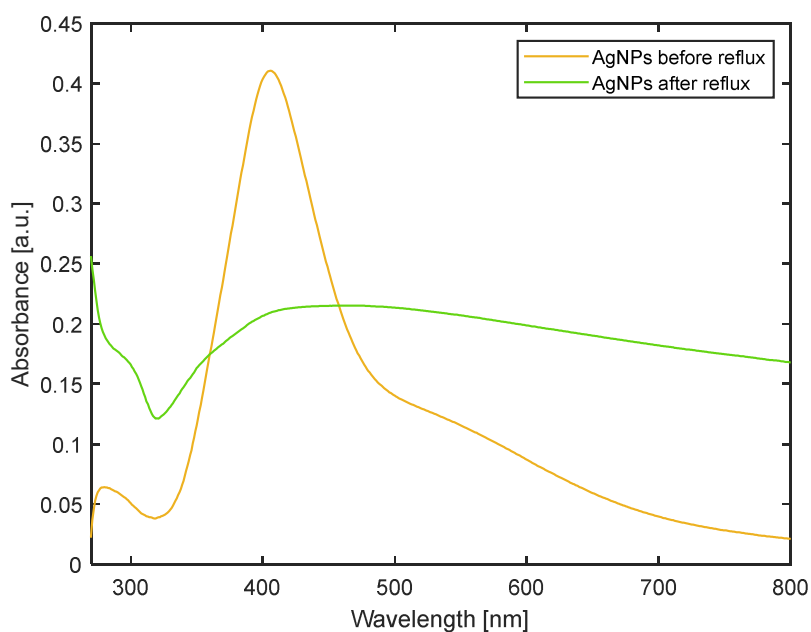
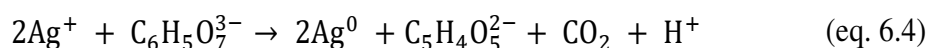


Figura 6. 2: Confronto tra gli spettri UV/Vis della sintesi AgDMF3 all'inizio e al termine della reazione.

L'appiattimento della banda plasmonica è giustificabile dall'aggregazione delle nanoparticelle in DMF in assenza di uno stabilizzante, dove il precipitato è probabilmente dovuto all'attrazione elettrostatica tra l'Ag⁺ adsorbito sulla superficie delle AgNPs e i silicati del reattore [74]. Per indagare il comportamento e la crescita delle nanoparticelle d'argento durante la sintesi di core-shell *one-pot* OP, è stata seguita tramite spettroscopia UV/Vis la reazione AgDMF5, realizzata alle stesse condizioni della OP5 senza precursore di titania e acetilacetone. In condizioni di diluizione in etanolo, quattro volte tanto la quantità di DMF, il massimo della banda plasmonica dell'argento non scompare nemmeno sotto riscaldamento e nessun precipitato viene a formarsi. La variazione della lunghezza d'onda del massimo di assorbimento osservata nel tempo non sembra, però, seguire un andamento ben preciso, come nel caso della AgDMF4.

Dal momento che dalle AgNPs sintetizzate in DMF non sono stabili per poter essere impiegate come termine di confronto per gli spettri Raman delle core-shell sintetizzate, si è deciso di utilizzare come riferimento le nanoparticelle ottenute tramite il metodo di Turkevich [71] [72]. In questo caso il citrato funge sia da riducente che da stabilizzante. Il processo può essere descritto dalla (eq. 6.4), dove il potenziale di riduzione standard riferito allo SHE per lo ione citrato è riportato nella (eq. 6.5) [86]:



$$E^\circ_{\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}/\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_5^{2-}} = -0.180 \text{ V} \quad (\text{eq. 6.5})$$

L'aggiunta del citrato di sodio alla soluzione di nitrato d'argento a riflusso è servita per accelerarne l'azione riducente.

Gli spettri UV/Vis registrati al termine della reazione e l'analisi DLS eseguita per le sintesi AgCit1 e AgCit2 sono mostrati in Figura 6.3, dove sono confrontati con le stesse misure svolte a distanza di circa due mesi dalla loro formazione. I valori di lunghezza d'onda del massimo di assorbimento e di diametro idrodinamico medio, invece, sono riportati in Tabella 6.1. Il giorno della loro sintesi, la banda plasmonica per la AgCit1 e la AgCit2 cade rispettivamente a 434 e 456 nm, dunque un valore di λ_{max} superiore a quanto trovato in letteratura (395-400 nm) [36] [72] e a quello delle stesse nanoparticelle in DMF. Dopo due mesi, il loro plasmonone risulta spostato verso il rosso (*redshift*) di 5 e 14 nm. Per quanto riguarda i DLS, i campioni analizzati hanno mostrato una buona monodispersione, senza presentare altre popolazioni di particelle a diametri elevati, con un intervallo di confidenza per il diametro idrodinamico medio stimato piuttosto ristretto. Nel tempo si è osservato un aumento di dimensioni delle AgNPs da 5.151 a 6.68 nm per la AgCit1 mentre da 10.5 a 13.4 nm per la AgCit2. La colorazione gialla delle sospensioni non è cambiata dopo due mesi. Le evidenze sperimentali confermano l'efficacia della stabilizzazione delle AgNPs da parte del citrato, grazie all'elevata carica negativa superficiale degli ioni citrato adsorbiti sulle nanoparticelle, che ne prevengono in tal modo l'aggregazione [87]. In

particolare modo, la AgCit1 si è rivelata essere più stabile della AgCit2.

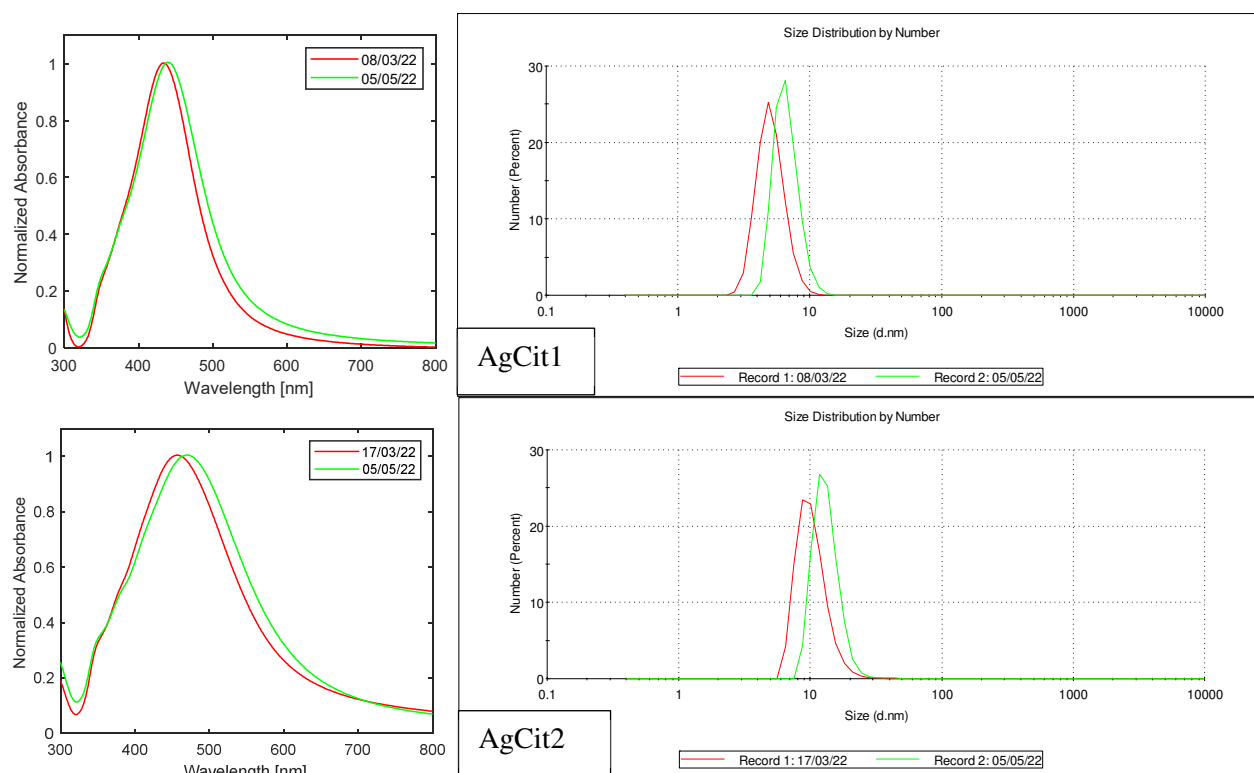


Figura 6. 3: Confronto tra gli spettri UV/Vis e i DLS per le nanoparticelle d'argento con citrato AgCit1 e AgCit2 il giorno della loro sintesi (rosso) e quelli a distanza di circa due mesi (verde).

Tabella 6. 1: Confronto tra le lunghezze d'onda del massimo di assorbimento e dei DLS registrati per le sintesi AgCit1 e AgCit2 a distanza di circa due mesi dalla loro formazione. I valori di PDI e diametro idrodinamico medio sono stati ottenuti mediando N misure ripetute con un intervallo di confidenza del 95% ($\alpha=5\%$).

AgCit1				
Campione	λ_{max} [nm]	N (singole misure mediate)	PDI	d medio [nm]
08/03/22 (appena sintetizzate)	434	6	0.481±0.019	5.151±0.059
05/05/22	439	3	0.467±0.089	6.68±0.89
AgCit2				
Campione	λ_{max} [nm]	N (singole misure mediate)	PDI	d medio [nm]
17/03/22 (appena sintetizzate)	456	3	0.395±0.097	10.5±4.2
05/05/22	470	3	0.267±0.015	13.4±3.4

Lo spettro Raman Stokes normalizzato del solido ottenuto tramite essiccazione sottovuoto per la sintesi AgCit2 è riportato in Figura 6.4, dove i suoi segnali sono stati confrontati con quelli misurati per il nitrato d'argento, il citrato di sodio e l'acqua, ovvero i reagenti e il solvente impiegati. L'ingrandimento sulla destra tra i 100 e i 400 cm^{-1} mostra il segnale principale della AgCit2, a 233 cm^{-1} . Se si confrontano i picchi Raman in questo intervallo, appare evidente come non siano presenti contributi dovuti al citrato di sodio e al nitrato d'argento. Potrebbe esservi solo un segnale di fondo dell'acqua sotto i 300 cm^{-1} . Il segnale a 233 cm^{-1} è dunque attribuibile solo alle AgNPs, in particolare allo *stretching*

Ag-O [88]. Da questa analisi è possibile concludere che le nanoparticelle d'argento sintetizzate tramite metodo Turkevich non hanno alcun contributo che possa oscurare quello principale dell'anatasio a 143 cm^{-1} , e dunque possono essere utilizzate come riferimento per i segnali del core.

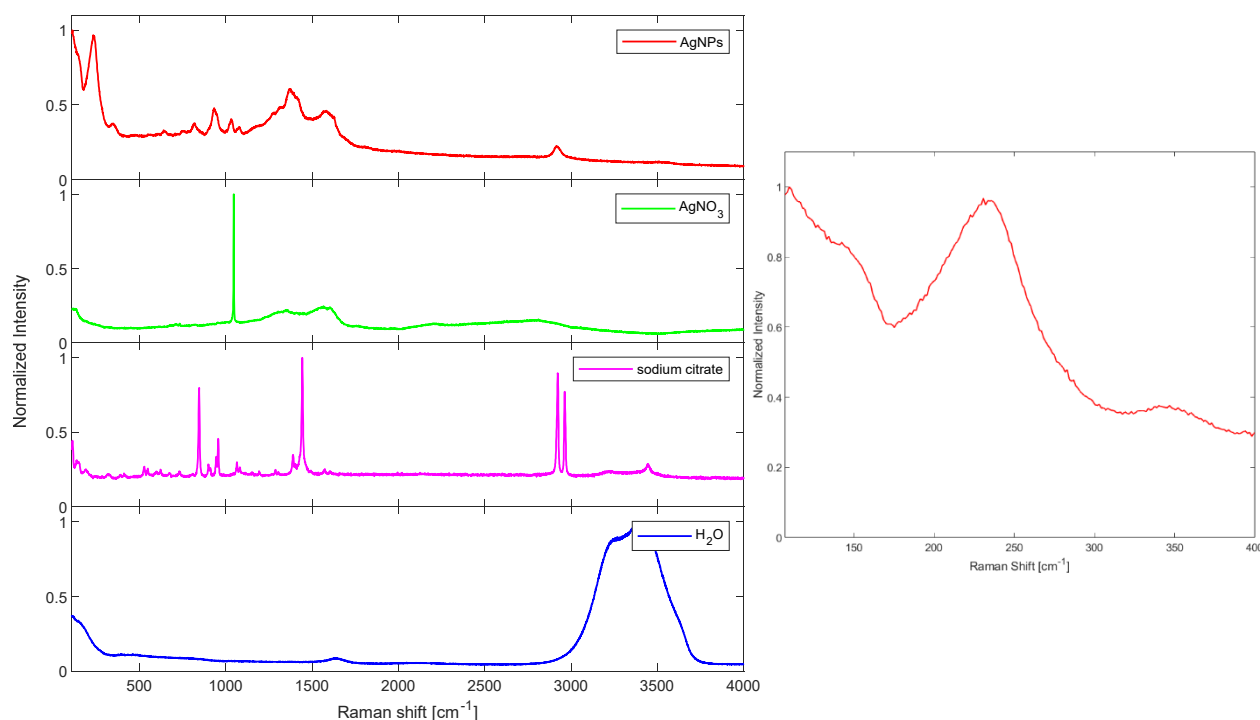


Figura 6. 4: A sinistra, confronto tra gli spettri Raman Stokes delle nanoparticelle d'argento in citrato AgCit2, del nitrato d'argento, del citrato di sodio e dell'acqua, registrati da 107 a 4000 cm^{-1} eccitando a 514 nm , 10 acquisizioni per 5 secondi. Un ingrandimento per la AgCit2 fino a 400 cm^{-1} è riportato a destra.

6.2 Sintesi di Nanoparticelle di Anatasio

Le nanoparticelle di anatasio sono state sintetizzate per avere dei campioni di confronto per l'assegnazione dei segnali Raman delle core-shell ottenute sia con il metodo *one-pot* che con il processo a due stadi. Per una trattazione più esaustiva sulle tipologie di sintesi di nanoparticelle di titania anatasio si rimanda alla letteratura [64] [14] [89]. La sintesi $\text{TiO}_2\text{A1}$ è stata eseguita modificando la procedura di Liz-Marzán et al. impiegando le stesse quantità e tempi di reazione. Nella miscela di reazione iniziale sono dunque presenti TOB in etanolo e acetilacetone. La presenza dell'agente chelante, impiegato per rallentare l'idrolisi dell'alcoossido, non sembra aver ostacolato la formazione delle nanoparticelle di TiO_2 , associata allo svilupparsi di una colorazione biancastra. Non è ancora noto il motivo per cui a riflusso sia stato necessario aumentare il quantitativo di acqua per il processo per un totale di 4 mL . Nella sintesi $\text{TiO}_2\text{A2}$, invece, l'acetilacetone è stato omesso dalla soluzione di partenza. Questo ha permesso di ottenere lo stesso risultato soltanto scaldando leggermente la miscela di reazione. In Figura 6.5 sono riportati gli spettri UV/Vis della sintesi $\text{TiO}_2\text{A2}$ prima e dopo la formazione delle nanoparticelle di titania amorfe. Come

evidenziato dallo spettro in blu, è stato necessario diluire molto i campioni per evitare condizioni di saturazione al di sotto di 360 nm a causa del forte assorbimento dell'alcoossido. In condizioni di diluizione, è possibile apprezzarne la λ_{\max} di 227 nm. Al termine del processo di idrolisi, l'assorbimento associato alle nanoparticelle di titania risulta essere di gran lunga inferiore. Il loro spettro presenta un massimo di assorbimento posto a 224 nm e l'innalzamento del fondo a causa dell'alto indice di rifrazione.

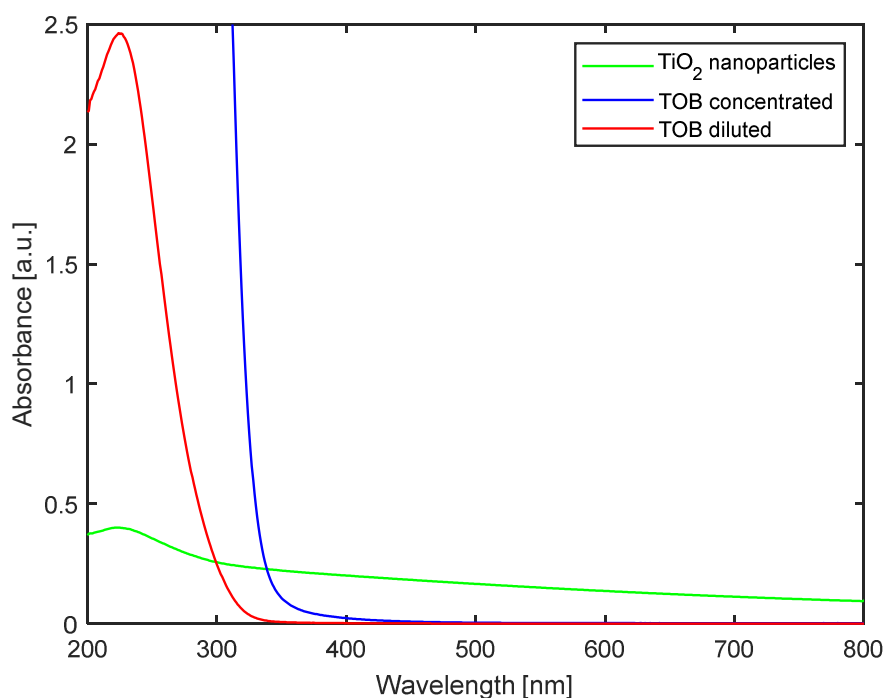


Figura 6. 5: Confronto tra gli spettri UV/Vis della miscela di reazione prima e dopo la formazione delle nanoparticelle di titania.

Gli spettri UV/Vis delle soluzioni in etanolo 5.75 mM rispettivamente di acetilacetone, di TOB e di entrambi sono stati registrati per indagare i contributi allo spettro presenti all'inizio delle reazioni di sintesi di core-shell. Questi sono riportati in Figura 6.6, assieme allo schema di coordinazione dell'acetilacetone al centro metallico, di letteratura [90]. Per il tetrabutossido di titanio in assenza del legante bidentato si osserva un solo segnale a 224 nm, in accordo con quanto visto in precedenza. L'acetilacetone, invece, presenta una banda a 272 nm, come atteso da letteratura, spostata di 2 nm verso il rosso in seguito ad aggiunta dell'alcoossido [91]. Come conseguenza di quest'ultima operazione l'assorbimento del TOB viene sostituito da quello meno intenso a 324 nm. La spiegazione è dovuta alla variazione della sfera di coordinazione del Ti(IV) nel precursore di titania [92]. All'inizio il metallo è presente sotto forma di gruppi TiO_4 , il cui assorbimento per l'unità isolata cade tra 240 e 260 nm. Per interazione dei gruppi acetilacetone con il centro metallico, si ha il passaggio all'esacoordinazione con formazione di gruppi TiO_6 , caratterizzati appunto da un contributo nello spettro intorno a 320-340 nm [93].

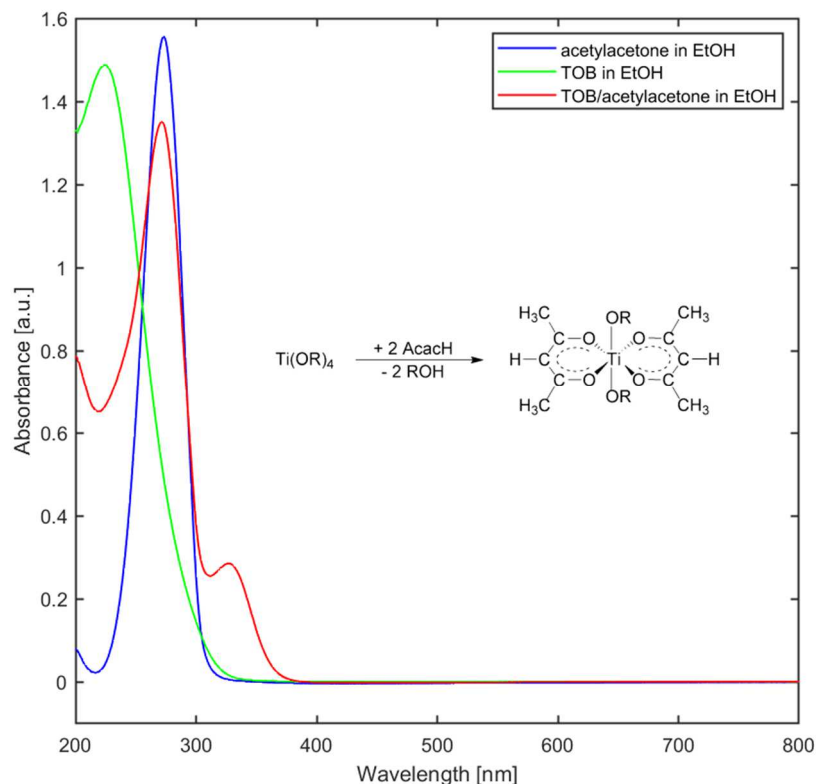


Figura 6. 6: Confronto tra gli spettri UV/Vis di acetilacetone, TOB e TOB/acetilacetone in etanolo, assieme al meccanismo di protezione dell'alcolossido dall'idrolisi, mutuato da [90].

Dal momento che non era presente DMF nella sospensione al termine della reazione, le operazioni di centrifugazione e lavaggio con etanolo svolte per la TiO₂A1 prima del trattamento solvotermale non sono state eseguite anche per la TiO₂A2. Entrambe le sospensioni sono state poste in bomba a 150°C per 24 h e in quantità tali da riempire per metà i liner. Le condizioni sono state mutate dalle sintesi in soluzione acquosa di nanoparticelle di anatasio di un precedente lavoro del gruppo di ricerca, sebbene il solvente in questo caso sia etanolo [14]. I parametri si sono rivelati adeguati e si sono ottenute discrete quantità di prodotto cristallino, che sono state poi macinate per ottenere una polvere. Il diffrattogramma ottenuto dall'analisi XRD per la TiO₂A1 è riportato in Figura 6.7, dove i riflessi sono stati indicizzati secondo il *Crystallography Open Database* (COD). La procedura di riconoscimento delle fasi cristalline presenti ha confermato la presenza di solo anatasio e non di rutilo o di altri polimorfi. L'analisi eseguita tramite metodo Rietveld ha permesso inoltre di determinare la dimensione dei cristalliti, pari a 8 nm. Lo spettro Raman Stokes di un cristallo della sintesi di TiO₂A1 è riportato in Figura 6.8. Sia per questa sintesi che per la TiO₂A2 si sono osservate solo le bande dell'anatasio, in accordo con la letteratura e con i risultati dell'XRD [16].

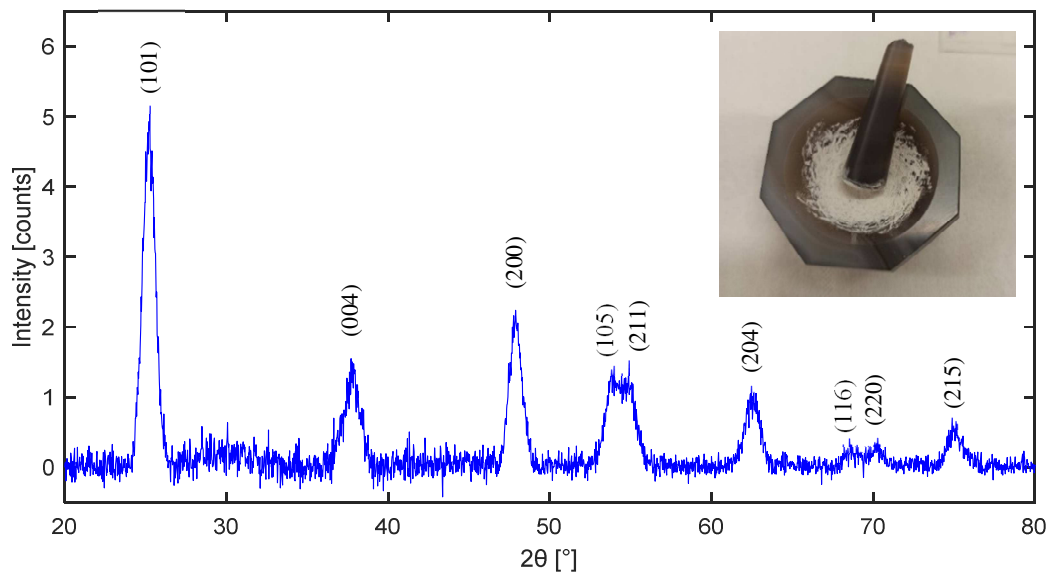


Figura 6. 7: Diffratogramma XRD delle nanoparticelle di titania TiO_2A1 registrato su polvere. I riflessi sono riconducibili alla fase cristallina anatasio.

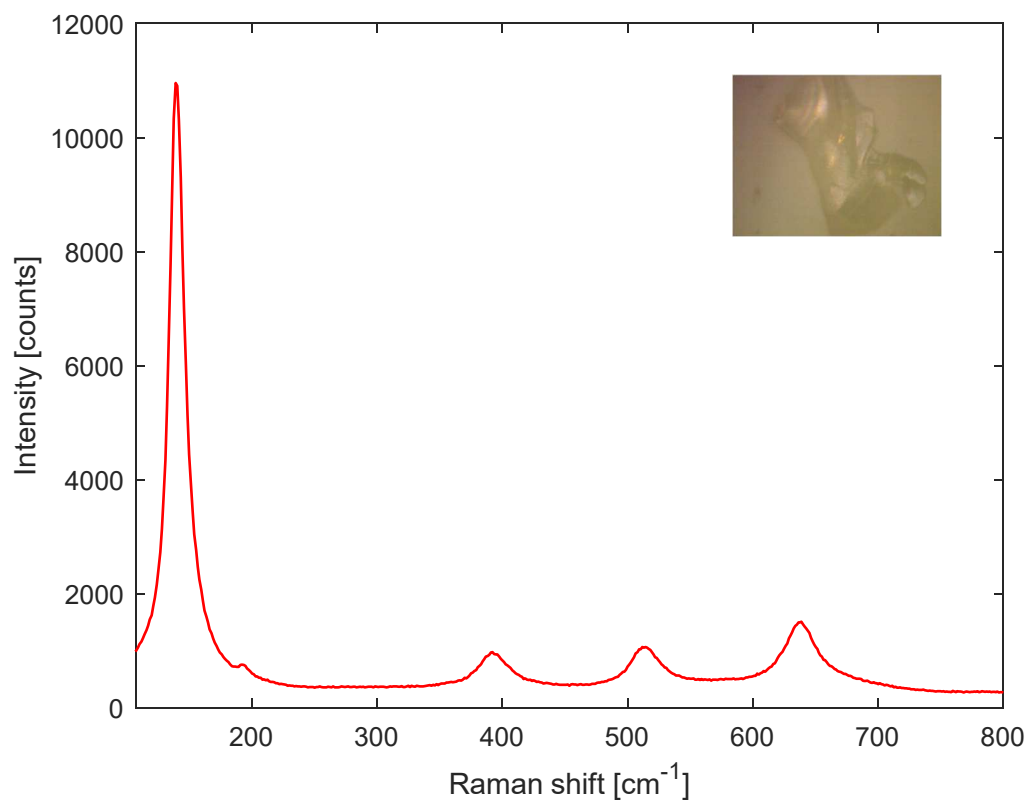


Figura 6. 8: Spettro Raman Stokes delle nanoparticelle di titania anatasio TiO_2A1 da 107 a 800 cm^{-1} , privo della correzione della linea di base. In alto a destra è riportata l'immagine di un cristallo presa al microscopio con ingrandimento 20x prima della macinazione del campione al Raman Didattico, eccitando a 514 nm, con 10 acquisizioni per 5 secondi.

6.3 Sintesi *One-Pot* di Ag@TiO₂

A partire dalla sintesi proposta di nanoparticelle d'argento in DMF, Liz-Marzán et al. hanno aggiunto uno stadio di rivestimento tramite idrolisi controllata di TOB in presenza di acetilacetone [51] [35]. Di fondamentale importanza risulta essere la sequenza di mescolamento delle soluzioni di precursori all'interno del pallone di reazione. Il tetrabutossido di titanio deve essere aggiunto tempestivamente alle AgNPs appena formate prima che abbiano tempo di aggregare. Inoltre, è preferibile ottenere la soluzione 1 per aggiunta di alcossido all'acetilacetone e non viceversa per diminuire la possibilità di idrolisi antecedenti all'inizio della sintesi. Le reazioni *one-pot* sono state eseguite a rapporti molari tra titania e argento variabili da 5.0:1 a 6.2:1. Nonostante questo, tutte le sintesi hanno mostrato lo stesso comportamento qualitativo quando monitorate tramite spettroscopia UV/Vis. A titolo di esempio, il decorso della reazione OP3 monitorato ogni 15 minuti è riportato in Figura 6.9, assieme allo spettro della soluzione 2 di AgNPs.

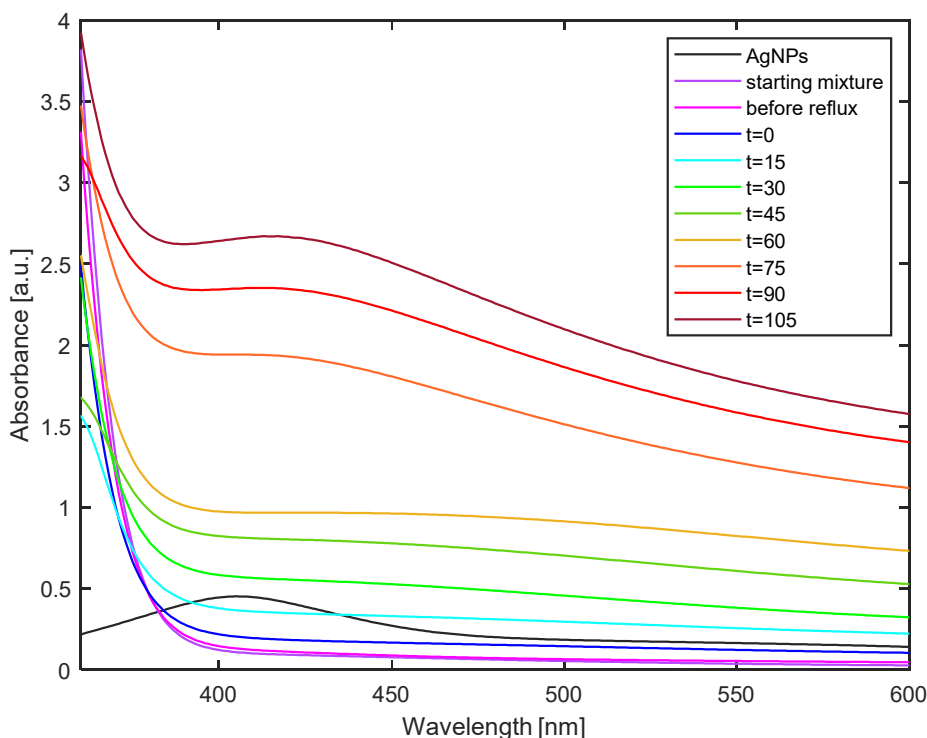


Figura 6. 9: Spettri UV/Vis registrati ogni 15 minuti prelevando piccole aliquote dalla sintesi OP3 di core-shell di Ag@TiO₂ *one-pot* senza diluizione durante il suo decorso. Per confronto è riportato lo spettro delle nanoparticelle d'argento in DMF sintetizzate nello stesso giorno.

Lo spettro della miscela subito dopo l'aggiunta sequenziale delle due soluzioni di precursore, riportato in viola in figura, non presenta alcuna banda plasmonica attribuibile alle nanoparticelle d'argento. Ciò è comprensibile considerando la forte diluizione imposta alla soluzione 2, il cui spettro è in nero, in seguito ad aggiunta di un quantitativo di etanolo quattro volte maggiore il volume di DMF. A lunghezze d'onda inferiori di 360 nm, invece, è presente un forte assorbimento dovuto alla soluzione di precursore di titania. Da quando la miscela di reazione viene portata a riflusso si osserva una banda a 417 nm

progressivamente più intensa. Se si confronta con lo spettro della soluzione 2, il cui massimo cade a 405 nm, si può concludere che la banda osservata sia dovuta al rivestimento del core da parte della titania. Il redshift di $\Delta\lambda=12$ nm trova spiegazione in letteratura dall'elevato indice di rifrazione della shell che si sarebbe venuta a formare rispetto a quello dell'ambiente di reazione. La risonanza plasmonica si attesta in genere nell'intervallo 416-480 nm [34] [36] [55].

Dal momento che a lunghezze d'onda inferiori di 360 nm non è possibile ottenere alcuna informazione utile, si è deciso di analizzare anche tramite spettroscopia UV/Vis i campioni diluiti della sintesi OP10, preparati ogni 20 minuti per l'analisi DLS. L'esito è presentato in Figura 6.10, assieme ad un ingrandimento tra 375 e 600 nm.

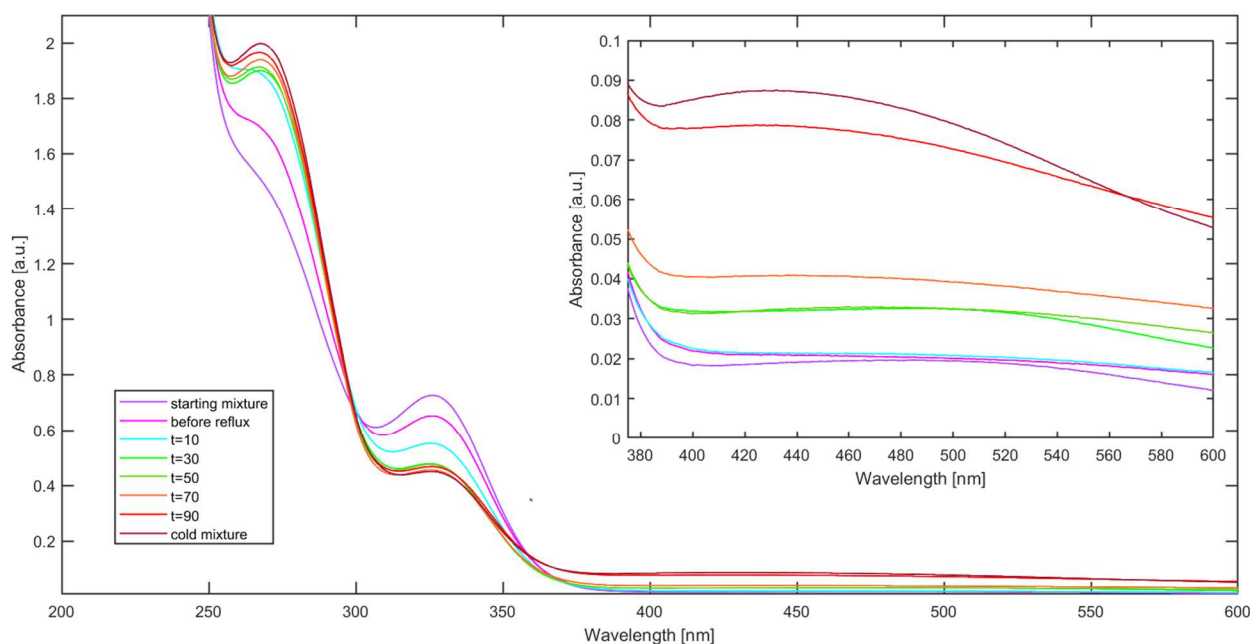


Figura 6. 10: Spettri UV/Vis registrati per i campioni diluiti della sintesi OP10 di core-shell di Ag@TiO₂ one-pot, con ingrandimento da 375 a 600 nm.

In condizioni di diluizione, è possibile apprezzare come il processo di crescita del segnale plasmonico sia del tutto analogo a quanto visto in precedenza, e continui anche al termine della reazione, fino al suo raffreddamento a temperatura ambiente. Alla sinistra del plasmonico, invece, sono visibili principalmente le due bande dell'acetilacetone e del TOB acetilacetato, rispettivamente a 269 e 327 nm. In concomitanza con la formazione della shell attorno alle AgNPs, la banda dell'acetilacetone cresce in intensità mentre cala quella del complesso di titanio (IV) acetilacetato. Questo sembra suggerire l'efficienza di rimozione dell'agente chelante da parte dell'acqua in condizioni di riflusso, che permette dunque un processo controllato di idrolisi. Una trattazione come quella per le sintesi OP3 e OP10 è facilmente estendibile alle altre reazioni *one-pot*, sebbene non sempre sia possibile individuare la lunghezza d'onda del massimo del plasmonico a causa della vicinanza del forte assorbimento dell'alcolossido acetilacetato. Non è stata purtroppo trovata una relazione tra l'intensità della banda plasmonica e il rapporto molare TiO₂:Ag impiegato.

Dal momento che la formazione della shell attorno al core di argento dovrebbe portare ad un incremento delle dimensioni, si è deciso di monitorare il processo di accrescimento delle core-shell tramite analisi DLS, come riportato in Figura 6.11 per la sintesi OP8 e in Tabella 6.2 anche per la OP7.

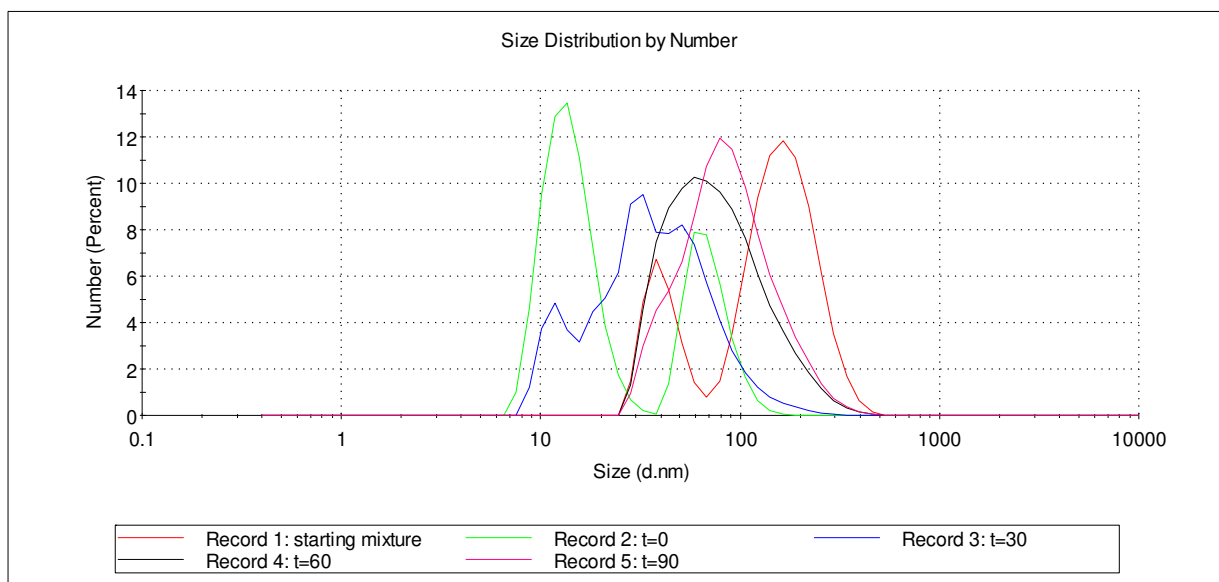


Figura 6. 11: Distribuzione numerica dei diametri idrodinamici ottenuti monitorando al DLS il decorso della reazione one-pot OP8. I valori sono stati ottenuti mediando N misure ripetute con un intervallo di confidenza del 95% ($\alpha=5\%$) Il tempo t fa riferimento ad istanti successivi durante il riflusso.

Tabella 6. 2: Risultati DLS per il monitoraggio del decorso delle reazioni OP7 e OP8. I valori sono stati ottenuti mediando N misure ripetute con un intervallo di confidenza del 95% ($\alpha=5\%$) Il tempo t fa riferimento ad istanti successivi durante il riflusso.

OP7					
Campione (N=singole misure mediate)	PDI	d medio [nm]	d picco 1 (%) [nm]	d picco 2 (%) [nm]	d picco 3 (%) [nm]
miscela iniziale (N=6)	0.354±0.083	233±71	53±11 (10.9%)	-	253±122 (89.0%)
t=0 (N=6)	0.38±0.13	191±46	-	191±107 (100.0%)	-
t=30 (N=6)	0.404±0.034	197±32	-	197±106 (100.0%)	-
t=60 (N=6)	0.302±0.049	152±66	54±12 (28.6%)	188±92 (71.4%)	-
t=90 (N=6)	0.374±0.059	175±65	51±11 (17.1%)	197±133 (82.9%)	-
OP8					
Campione (N=singole misure mediate)	PDI	d medio [nm]	d picco 1 (%) [nm]	d picco 2 (%) [nm]	d picco 3 (%) [nm]
miscela iniziale (N=4)	0.48±0.18	144±104	-	42±15 (23.6%)	175±103 (76.4%)
t=0 (N=6)	0.247±0.062	33±30	14.1±4.4 (66.5%)	70±19 (33.5%)	-
t=30 (N=6)	0.292±0.056	43±25	12.3±2.3 (15.0%)	30.0±9.0 (48.0%)	70±35 (37.0%)
t=60 (N=6)	0.227±0.015	88±35	-	-	87±58 (100.0%)
t=90 (N=6)	0.213±0.013	97±31	-	-	97±58 (100.0%)

Per la sintesi OP8, è possibile vedere graficamente come all'inizio della reazione non si abbia un campione monodisperso, bensì due popolazioni di nanoparticelle d'argento centrate a 42 e 175 nm. L'assenza di stabilizzanti delle AgNPs in DMF ha dunque favorito la loro aggregazione. Le due distribuzioni permangono di fatto durante la reazione, al termine del quale risultano come parte di un'unica popolazione che copre un intervallo dimensionale molto ampio. Al tempo $t=30$ sembrerebbe anche che vi siano tre popolazioni distinte. Se si considera solo l'andamento del diametro idrodinamico medio a riflusso, dunque ignorando le dimensioni iniziali di 144 nm, sembrerebbe che il DLS riesca a seguire il processo di crescita delle core-shell, da un valore iniziale di 33 nm a quello di 97 nm. I risultati non sono però sufficientemente affidabili a causa dell'aggregazione delle nanoparticelle nel tempo, della presenza di differenti popolazioni e in generale di un campione polidisperso. Considerazioni del tutto analoghe sono valide per la OP7, dove peraltro le dimensioni medie rimangono costantemente intorno ai 190 nm.

Il confronto delle distribuzioni dimensionali delle core-shell sintetizzate con quelle delle nanoparticelle d'argento in DMF prima della loro aggiunta nel pallone di reazione è riportato in Figura 6.12 per le reazioni OP4 e OP8. Le AgNPs sono riportate in rosso, mentre le core-shell in verde. I valori corrispettivi di diametro idrodinamico e la PDI sono invece presentati in Tabella 6.3.

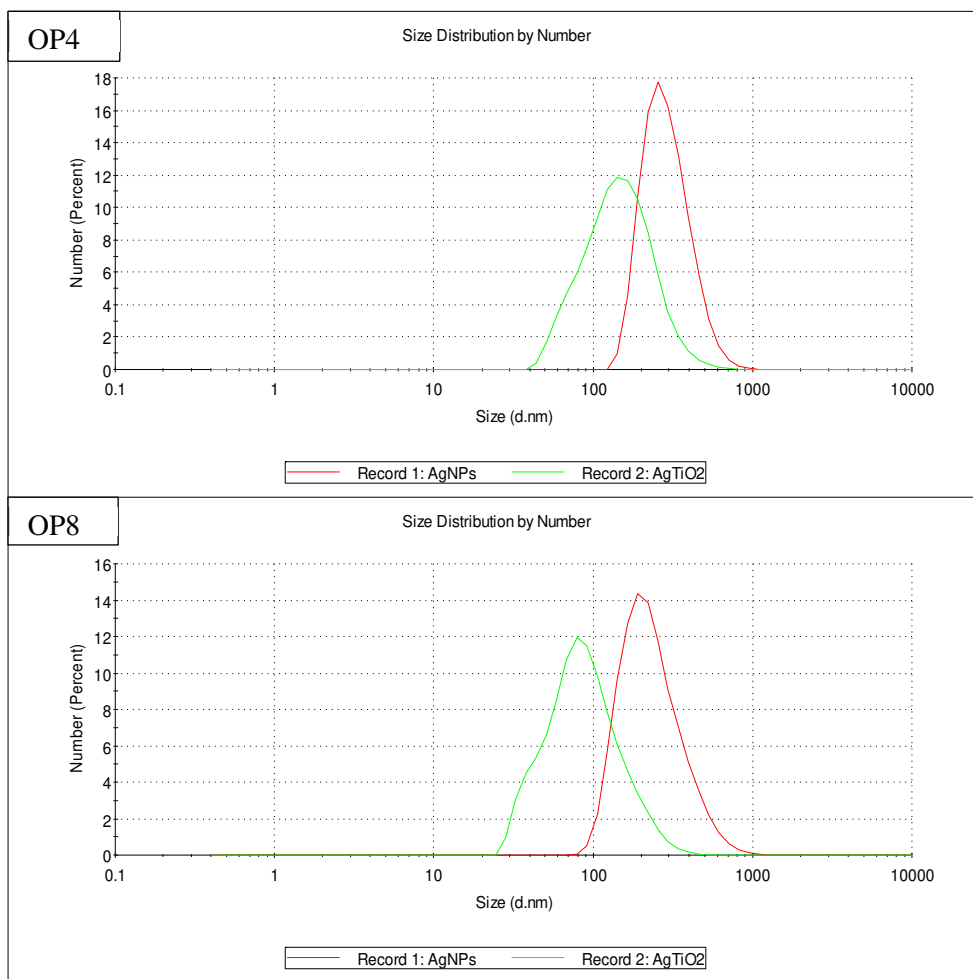


Figura 6. 12: Confronto tra le distribuzioni numeriche dei diametri idrodinamici ottenute al DLS per la soluzione 2 e le core-shell di Ag@TiO₂ one-pot OP4 e OP8 al termine della reazione.

Tabella 6.3: Confronto dei diametri idrodinamici stimati tramite analisi DLS della soluzione 2 e delle core-shell di Ag@TiO₂ one-pot OP4 e OP8 al termine della reazione. I valori sono stati ottenuti mediando N misure ripetute con un intervallo di confidenza del 95% ($\alpha=5\%$).

OP4		
Campione (N=singole misure mediate)	PDI	d medio [nm]
AgNPs (N=3)	0.39±0.16	299±52
Ag@TiO ₂ (N=3)	0.330±0.050	158±70
OP8		
Campione (N=singole misure mediate)	PDI	d medio [nm]
AgNPs (N=6)	0.317±0.058	247±57
Ag@TiO ₂ (N=6)	0.213±0.013	97±31

Anche in questo caso l'aggregazione del core non permette di avere risultati affidabili in quanto, in modo del tutto controintuitivo, sembrerebbe che la formazione della shell riduca le dimensioni delle particelle. Più verosimile come valore iniziale per le AgNPs è quello determinato in precedenza per le sintesi AgCit1 e AgCit2 nella sezione 6.1. Alla luce dei risultati raccolti non è stato dunque possibile giungere ad alcuna conclusione se non che non è stato possibile ottenere una distribuzione uniforme di Ag@TiO₂ centrata sotto i 100 nm vista la presenza di un core non stabilizzato e libero di aggregare in sospensione prima e durante la sintesi Sol-Gel. Se si considera come valore di riferimento per applicazioni biomediche 50-60 nm, le particelle così sintetizzate non riuscirebbero a penetrare la membrana cellulare in quanto troppo grandi [27].

Al fine di sottoporre le sospensioni ottenute dalla sintesi *one-pot* di letteratura a trattamento solvotermale, è stato necessario rimuovere il più possibile la DMF presente tramite centrifugazione con successivi lavaggi in etanolo. Lavorare ad un alto numero di giri è stato necessario per ottenere un supernatante il più possibile limpido e per far precipitare le core-shell presenti, in quanto con una distribuzione dimensionale non uniforme. L'esito di queste operazioni è stato analizzato tramite spettroscopia UV/Vis ed è riportato in Figura 6.13 per le sintesi OP2, OP4, OP9 e OP10. Per ognuna di esse lo spettro al termine della reazione, in rosso, è confrontato con quello ottenuto alla fine della procedura di purificazione, in blu. Appare subito evidente come la banda plasmonica vada radicalmente ad appiattirsi dopo le centrifughe e i lavaggi, assieme ad uno spostamento del massimo verso il blu. Si osserva anche un abbassamento del fondo e la scomparsa del forte assorbimento dell'alcolossido sotto i 250 nm. Nel complesso, il plasmone ricorda quello delle nanoparticelle d'argento aggregate in DMF di Figura 6.2. Al termine del processo di purificazione, tutte le sospensioni risultano mantenere la loro colorazione nera.

Per capire meglio cosa avviene durante la centrifugazione e i lavaggi delle core-shell, gli spettri registrati per la sintesi OP11 prima e dopo il processo di purificazione sono riportati in Figura 6.14. Se si considera lo spettro della sospensione al termine della reazione, analogo a quelli di Figura 6.13, la sua centrifugazione riduce fortemente il segnale dell'alcolossido acetilacetato, mostrando ancora l'assorbimento della titania sotto i 300 nm e quello dell'argento ricoperto dalla shell. Dopo un solo lavaggio con etanolo tutte le bande associate all'acetilacetone sono presenti solo nel supernatante mentre la

stessa banda plasmonica risulta spostata verso il blu di circa 20 nm. Il processo di purificazione si rivela quindi efficiente nel rimuovere la DMF e l'agente chelante presenti.

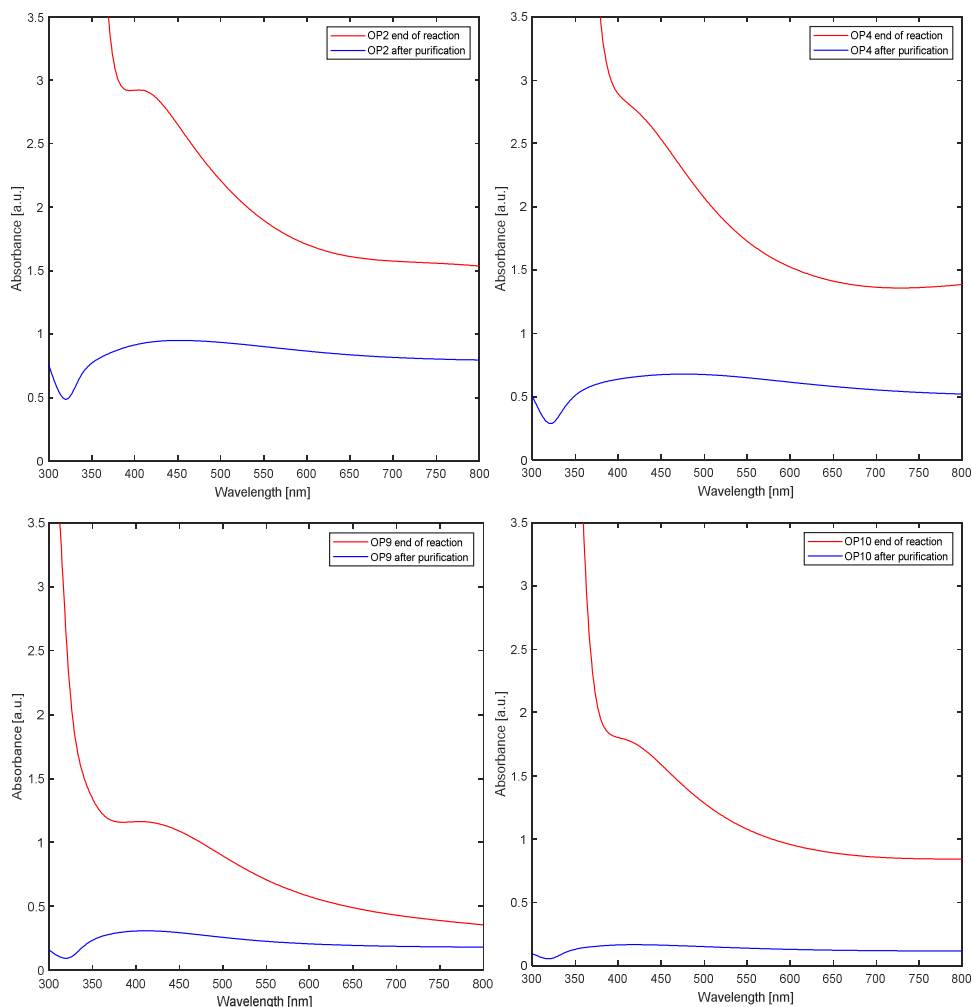


Figura 6. 13: Confronto tra gli spettri UV/Vis per le sintesi di core-shell OP2, OP4, OP9 e OP10 al termine della reazione, in rosso, e dopo la procedura di purificazione, in blu, ovvero centrifuga e lavaggi con etanolo.

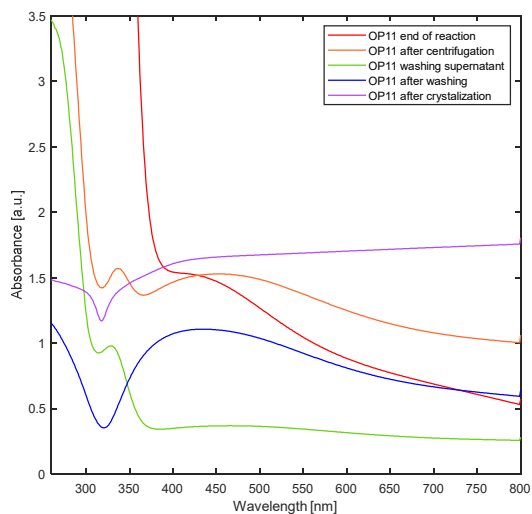


Figura 6. 14: Confronto tra gli spettri UV/Vis della sospensione OP11 al termine della reazione e dei processi di centrifugazione, di lavaggio con etanolo e cristallizzazione. Come riferimento è riportato anche lo spettro del supernatante raccolto dopo il lavaggio.

In Figura 6.14 è riportato anche lo spettro al termine del trattamento solvotermale per la sintesi OP11, dove è presente un segnale di fondo molto ampio che va a coprire il massimo di assorbimento plasmonico.

In seguito al trattamento solvotermale a 150°C per 24 h si sono osservati esiti piuttosto differenti, come riassunto in Tabella 6.4. In particolare, le sintesi OP4 e OP8 hanno mostrato una colorazione marrone sabbia chiaro, come raffigurato in Figura 6.15, mentre la OP11 marrone scuro. Altre ancora hanno mantenuto il loro aspetto precedente oppure sono diventate completamente trasparenti, non permettendo di raccogliere alcunché. Dove possibile si è cercato di ottenere un solido dalla sospensione raccolta tramite essiccazione sottovuoto, con l'unica eccezione della OP11 che è stata mantenuta in sospensione. Nel caso delle sintesi OP3, OP5, OP6 e OP7, la procedura di essiccazione ha portato a perdere il campione. Per questo non si è potuto registrare il loro spettro Raman, come specificato nelle loro celle dell'ultima colonna di Tabella 6.4.

Tabella 6. 4: Esito del trattamento solvotermale a 150°C per 24 h. delle sintesi di Ag@TiO₂ one-pot, stabilito in seguito all'analisi Raman. Per le sintesi OP3, OP5, OP6 e OP7 non è stato possibile registrare lo spettro Raman.

Sintesi	Volume sospensione [mL]	Volume bomba [mL]	Colore sospensione risultante	Presenza segnale anatasio
OP1	11.5	23	Nero	No
OP2	11.5	23	Nero	No
OP3	11.5	23	Incolore	Spettro non registrato
OP4	75	150	Marrone chiaro	Si
OP5	11.5	23	Nero	Spettro non registrato
OP6	11	23	Nero	Spettro non registrato
OP7	75	150	Nero marrone	Spettro non registrato
OP8	75	150	Marrone chiaro	Si
OP9	75	150	Incolore	No
OP10	75	150	Nero	No
OP11	75	150	Marrone	No



Figura 6. 15: Sintesi OP4 dopo il trattamento solvotermale a 150°C per 24 h e dopo sua essiccazione sottovuoto.

Gli spettri Raman Stokes da 107 a 500 cm⁻¹ per alcuni dei campioni raccolti sono riportati in Figura 6.16, assieme alle immagini raccolte al microscopio con ingrandimento 4x.

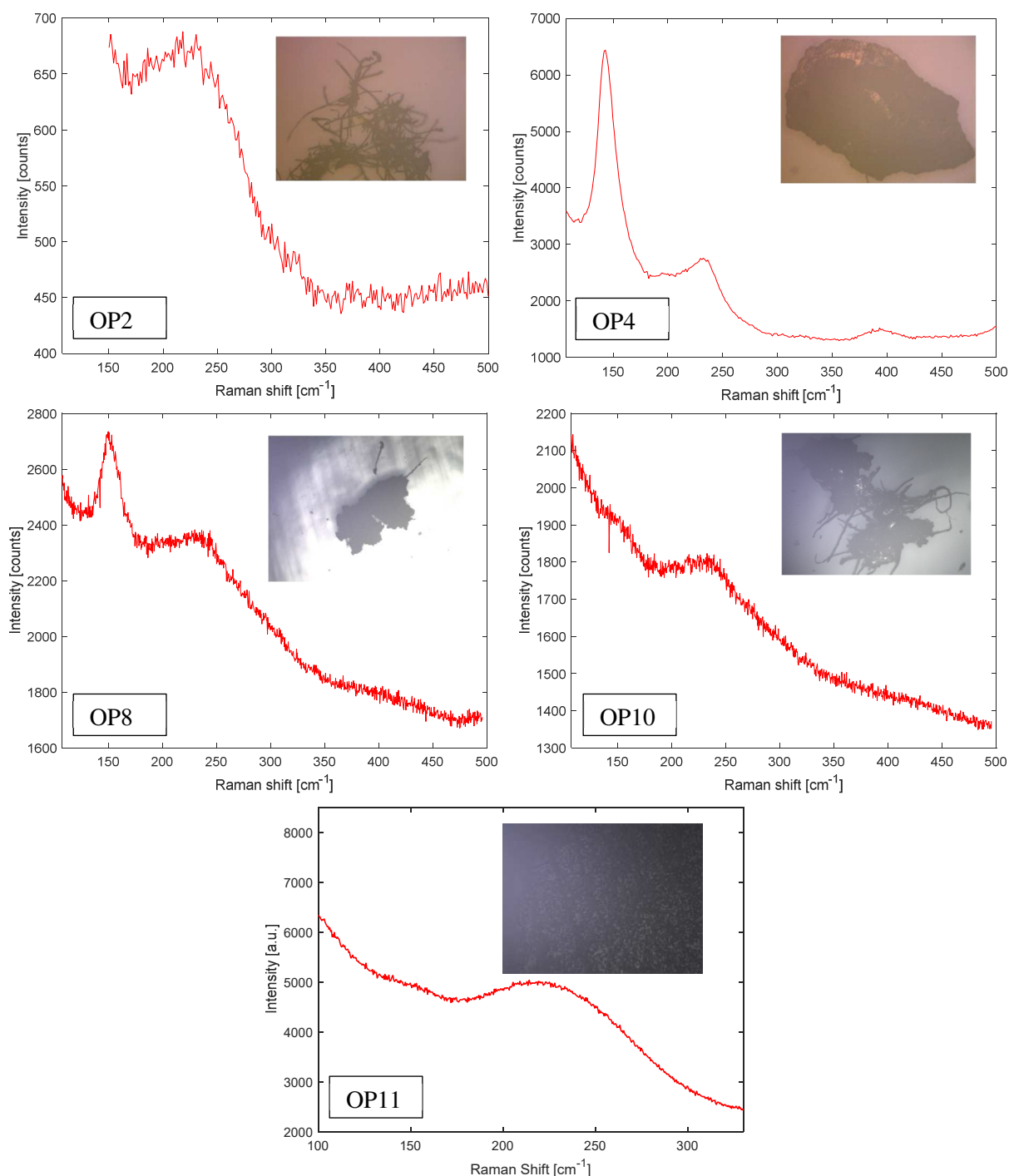


Figura 6. 16: Immagini dei campioni ottenuti dalla sintesi di core-shell di Ag@TiO_2 in seguito a trattamento solvotermale assieme ai loro spettri Raman Stokes, privi di correzione della linea di base, da 107 a 500 cm^{-1} . OP2 e OP4 sono stati registrati al Raman Didattico, eccitando a 514 nm, con 10 acquisizioni per 5 secondi. Le foto sono state ottenute con un ingrandimento 20x per il visibile. OP8, OP10 e OP11 sono stati registrati al Raman Triplo, eccitando a 800 nm, con 5 acquisizioni per 5 secondi. Le foto sono state ottenute con un 20x per IR.

Come appare evidente, i trattamenti solvotermali non hanno portato ad un risultato univoco e qualche campione sembra aver perso la propria struttura originale, assumendo l'aspetto di una matassa di piccoli filamenti, presenti in minima parte anche assieme ai cristalli più compatti. Per la OP11, invece, l'immagine è riferita alla sospensione depositata goccia a goccia su lastrina di silice.

Da letteratura, ci si attende che per nanoparticelle core-shell siano presenti sia il segnale del core che quello della shell [94]. Per questo motivo si sono confrontati gli spettri con quelli ottenuti per le nanoparticelle di anatasio TiO₂A1 e quelle d'argento AgCit2. L'operazione eseguita per la sintesi OP4 è mostrata graficamente in Figura 6.17, mentre l'assegnazione delle bande presenti tra 107 e 800 cm⁻¹ è riportata in Tabella 6.5.

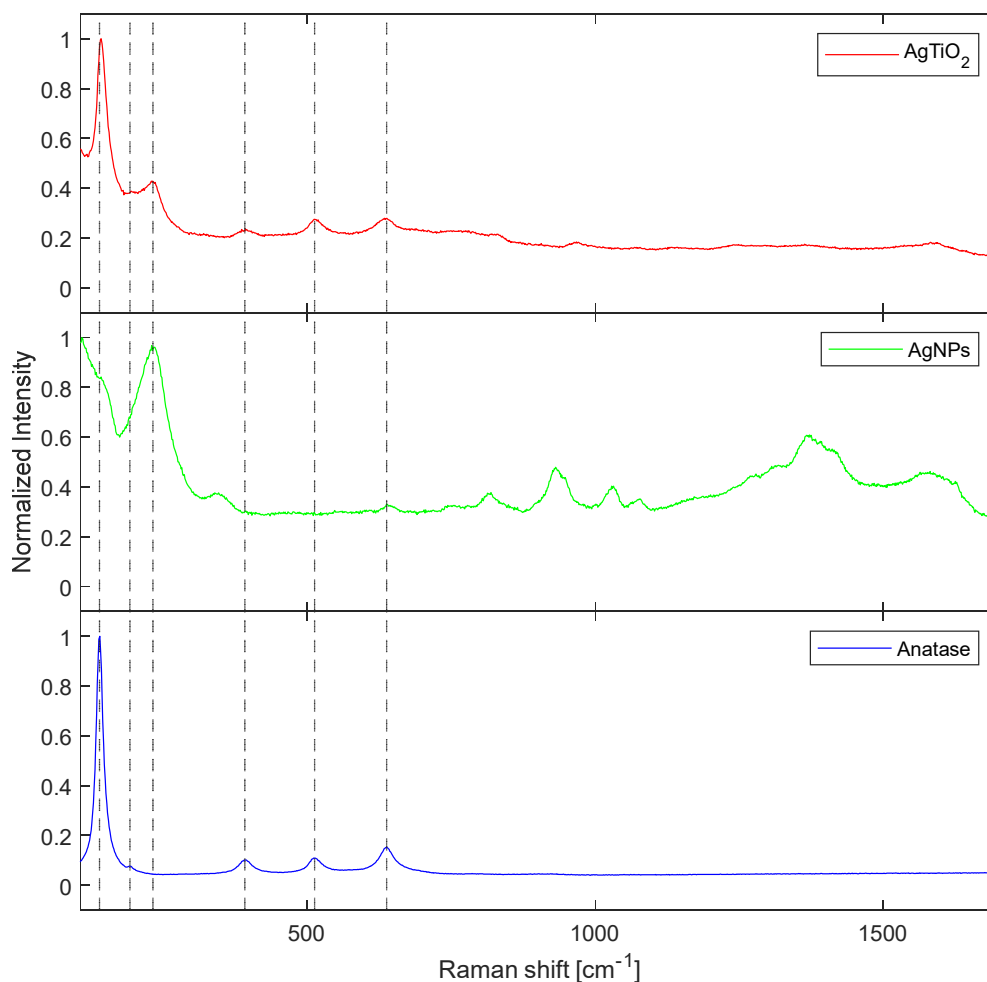


Figura 6. 17: Confronto tra gli spettri Raman Stokes normalizzati della sintesi Ag@TiO₂ one-pot OP4, delle nanoparticelle d'argento in citrato AgCit2 e delle nanoparticelle di anatasio TiO₂A1 tra 107 e 1700 cm⁻¹. Sono stati registrati al Raman Didattico con eccitatrice a 514 nm, 10 acquisizioni per 5 secondi.

Tabella 6. 5: Assegnazione dei principali segnali Raman Stokes per la sintesi Ag@TiO₂ one-pot OP4 tramite confronto con quelli delle nanoparticelle d'argento in citrato AgCit2 e delle nanoparticelle di anatasio TiO₂A1. Tra parentesi è specificata l'intensità, secondo la seguente legenda: (w) debole, (m) media, (s) forte intensità.

Ag@TiO ₂ OP4 [cm ⁻¹]	AgNPs AgCit2 [cm ⁻¹]	Anatasio TiO ₂ A1 [cm ⁻¹]
143 (s)	-	140 (s)
195 (w)	-	193 (w)
233 (s)	233 (m)	-
393 (m)	-	392 (m)
513 (m)	-	513 (m)
635 (m)	-	638 (m)

Come è possibile constatare, sono presenti sia i segnali dell'argento che dell'ossido di titanio nella fase cristallina anatasio. Per avere la sicurezza che l'anatasio fosse presente in tutto il campione, diverse posizioni dei cinque cristalli seccati per la OP4 sono state analizzate mostrando ovunque i segnali attesi del core e della shell, tralasciando l'intensità relativa dei segnali. Il trattamento solvotermale ha dunque avuto successo, almeno per le sintesi OP4 e OP8. Si tratta però di un caso limitato, in quanto per tutte le altre sintesi nessuna banda a 143 cm^{-1} per l'anatasio è stata rilevata. In particolare, per le OP2, OP10 e OP11 è stato trovato solo argento, per la OP9 non è stato visto nulla, mentre per la OP1 si sono trovati moltissimi segnali, di numero e intensità dipendenti dalla posizione esaminata del campione, di cui nessuno riconducibile ad anatasio o argento. Conferme tramite analisi XRD non sono state possibili per le prime dieci sintesi in quanto il campione, se raccolto, era troppo poco per essere macinato. Razionalizzando i colori osservati per le sospensioni al termine del trattamento solvotermale, solo quelle che hanno manifestato una colorazione marrone sabbia contengono anatasio. Se invece sono risultate nere o marrone scuro è molto probabile che siano solo AgNPs.

Le caratterizzazioni finora discusse non garantiscono la presenza di una shell cristallina attorno alle nanoparticelle d'argento per le sintesi OP4 e OP8, in quanto gli stessi segnali Raman potrebbero essere dovuti a nanoparticelle cresciute indipendentemente ma spazialmente vicine. La conferma definitiva, almeno per la prima delle due *one-pot* seguita da trattamento solvotermale, è giunta dall'analisi HRTEM accoppiata ad EDX. Tre diverse regioni della griglia del TEM dove è stata depositata la sospensione sono state analizzate e riportate in *dark field* in Figura 6.18. Evidente è la disomogeneità del campione, che presenta particelle molto diverse fra loro in termini di dimensioni, la più grande di 100 nm mentre la più piccola intorno ai 30 nm di diametro.

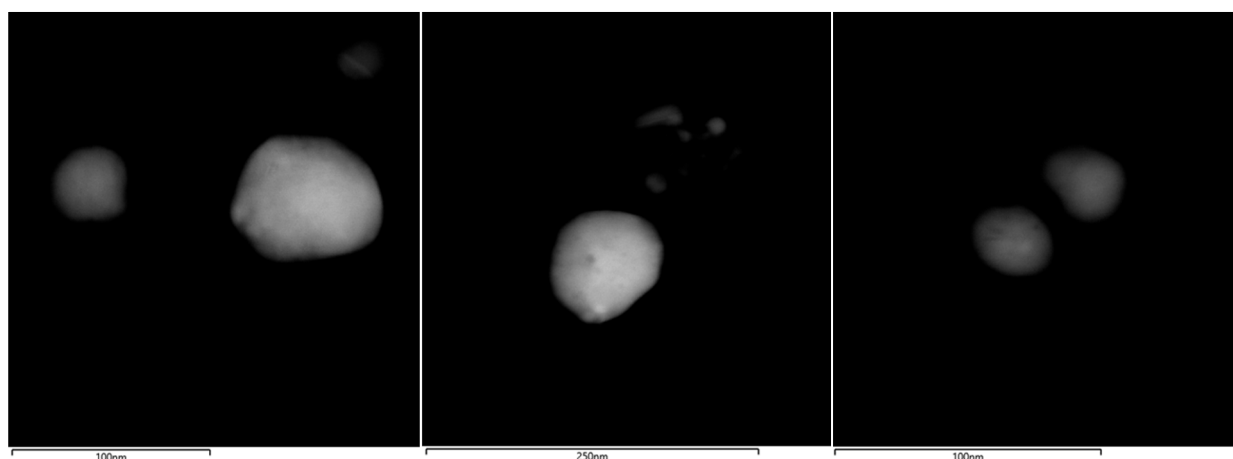


Figura 6. 18: Immagini HRTEM in dark field di tre differenti posizioni del campione ottenuto dalla sintesi *one-pot* OP4.

Gli EDX in Figura 6.19 rivelano invece che la titania anatasio forma una specie di rivestimento diffuso attorno alle AgNPs, indice appunto della formazione delle nanoparticelle core-shell tramite metodo *one-pot*.

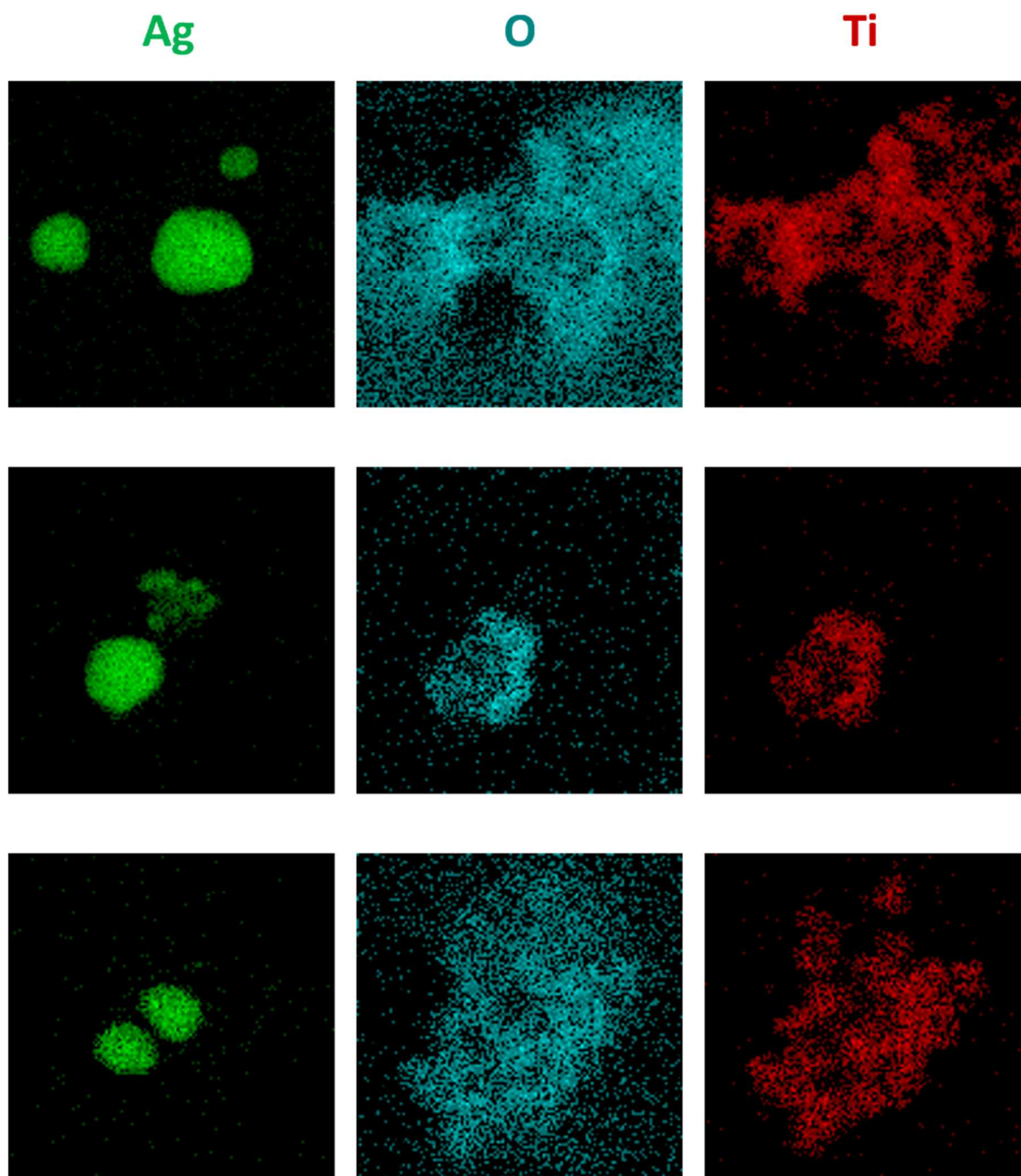


Figura 6. 19: Mappe EDX per le tre regioni esplorate tramite HRTEM rispettivamente dell'argento (verde), dell'ossigeno (azzurro) e della titania (rosso).

6.4 Riepilogo della Sintesi *One-Pot* di Ag@TiO₂

Lo scopo della sintesi *one-pot* discussa nella sezione 6.3 è stato quello di ottenere delle nanoparticelle core-shell di Ag@TiO₂ cristalline, tramite loro formazione all'interno dello stesso ambiente di reazione seguita da trattamento solvotermale per la conversione ad anatasio. A partire dalle soluzioni di precursore del core di AgNPs e della shell di anatasio sono state sintetizzate anche le rispettive nanoparticelle, per utilizzarle come confronto.

Per il core di nanoparticelle d'argento AgDMF il processo di riduzione dell'AgNO₃ da parte del DMF si è rivelato efficiente anche a temperatura ambiente, con la crescita nel

tempo della banda plasmonica dell'argento intorno a 400 nm nello spettro UV/Vis. Non appena si è portata a riflusso la sospensione, il segnale è calato di intensità e si è allargato a causa dell'aggregazione delle AgNPs, in buona parte precipitate sul fondo del pallone. Le condizioni di diluizione in etanolo della sintesi *one-pot* in assenza del TOB hanno permesso di rendere il processo di aggregazione meno importante ma comunque presente, come dimostrato dalle dimensioni sulle centinaia di nanometri ottenute tramite DLS. La tempestiva aggiunta della soluzione di precursore di titania alle AgNPs appena formate è stata fondamentale per fermarne il prima possibile l'aggregazione, tramite il loro rivestimento. La formazione della shell amorfa a riflusso per le sintesi OP è stata confermata all'UV/Vis dal *redshift* del plasmone di circa 10 nm rispetto a quello del core non ricoperto, dovuto all'elevato indice di rifrazione della titania [54]. Il processo di rivestimento è stato monitorato con successo all'UV/Vis dove si è osservata la crescita di intensità della banda plasmonica nel tempo, anche al termine della reazione.

La ridotta stabilità delle AgNPs in DMF in assenza di stabilizzante ha portato a sintetizzare le nanoparticelle d'argento AgCit come termine di confronto per le core-shell. La stabilizzazione elettrostatica da parte dello ione citrato ha permesso di ottenere dall'analisi DLS particelle con diametro idrodinamico piuttosto ridotto, tra i 5 e i 10 nm, poco affette da aggregazione come visto dal ridotto aumento di dimensioni a distanza di circa due mesi. Lo spettro Raman Stokes della AgCit2 ha mostrato segnali attribuibili solo alle AgNPs e non ai reagenti utilizzati. L'ampiezza della banda più intensa, a 233 cm^{-1} , è tale da non coprire l'eventuale presenza del picco caratteristico dell'anatasio, a 143 cm^{-1} .

Entrambe le sintesi TiO₂A hanno portato ad ottenere nanoparticelle di titania amorfe, come confermato dalla colorazione biancastra della sospensione e dalla loro banda sotto i 300 nm nello spettro UV/Vis, con il caratteristico innalzamento del segnale di fondo. Le condizioni scelte per il trattamento solvotermale, 150°C a 24 h, si sono rivelate ottimali al fine di formare la sola fase cristallina anatasio, come confermato dall'analisi XRD per la TiO₂A1 e dagli spettri Raman sui campioni in polvere. È stato inoltre verificato che l'effetto stabilizzante dell'acetilacetone, nelle concentrazioni impiegate nella *one-pot*, non è troppo forte da inibire l'idrolisi del precursore di titania nell'ambiente di reazione, dopo aggiunta controllata di acqua.

Per quanto riguarda le sospensioni OP amorfe ottenute, prima di porle in bomba solvotermale è stato necessario togliere la DMF, tramite centrifugazione e lavaggio con etanolo. Le operazioni di purificazione si sono rivelate efficaci, portando anche alla rimozione dell'acetilacetone libero residuo. Nonostante ciò, non hanno permesso di ottenere risultati riproducibili al termine del trattamento solvotermale. Gli unici campioni in cui è stato osservato il segnale Raman della shell di anatasio, unitamente a quello del core d'argento, sono stati infatti quelli delle sintesi OP4 e OP8, dove è avvenuta anche la variazione di colore della sospensione da nero a marrone chiaro sabbia dopo cristallizzazione. Per la OP4 l'analisi EDX accoppiata al TEM ad alta risoluzione ha stabilito con certezza la formazione di uno strato diffuso di anatasio attorno alle AgNPs. La procedura *one-pot* ha dunque permesso di ottenere con successo delle nanoparticelle core-shell, sebbene in piccole quantità e caratterizzate da un'ampia distribuzione

dimensionale, dai 30 a 100 nm di diametro. Tali dimensioni sono dovute alla prevalenza di grandi aggregati di nanoparticelle d'argento che vengono ricoperti da anatasio e costituiscono quindi un ostacolo se si considera il possibile uso di queste sospensioni per la terapia fototermica, in quanto non riuscirebbero in media a penetrare la membrana cellulare [27].

6.5 Sintesi a Due Stadi di Ag@TiO₂

La procedura *one-pot* discussa nelle sezioni precedenti ha permesso di ottenere nanoparticelle core-shell senza alcun controllo sulla loro dimensione e sulla riproducibilità della sintesi stessa. Per ovviare a questo problema si è sviluppato un nuovo processo a due stadi a partire dalla sintesi di AgNPs per riduzione e stabilizzazione con citrato, discussa nella sezione 6.1. Da quanto emerso dalle precedenti analisi DLS in Tabella 6.1, la sintesi di Turkevich ha permesso di ottenere nanoparticelle di piccole dimensioni e con una distribuzione pressoché monodispersa. Se queste venissero ricoperte per aggiunta di una soluzione di TOB in etanolo, il diametro complessivo dovrebbe permettere loro di poter comunque penetrare la membrana cellulare, a patto che la shell non sia troppo spessa. In letteratura è già stato impiegato il citrato come riducente sebbene questo sia stato aggiunto alla miscela di reazione assieme al precursore di titania, TTEAIP in isopropanolo nello specifico [44]. In questo caso il citrato non ha costituito un impedimento alla formazione della shell, sebbene quest'ultimo meccanismo non sia ancora chiaro. Si è deciso, dunque, di sviluppare un processo a due stadi e non *one-pot* per avere miglior controllo sulle dimensioni, impiegando la soluzione 2 delle sintesi OP in assenza di acetilacetone. L'agente chelante è stato rimosso in quanto i volumi impiegati erano molto piccoli e si voleva evitare un'eccessiva stabilizzazione del butossido.

In Tabella 6.6 sono mostrati i rapporti molari impiegati nelle sintesi a due stadi DS tra la sospensione di nanoparticelle d'argento con citrato e le soluzioni di TOB. Questi corrispondono a precisi rapporti molari tra l'acqua e l'etanolo presenti all'interno della bomba durante il trattamento solvotermale a 150°C.

Tabella 6. 6: Rapporti molari TiO₂:Ag e frazioni molari di H₂O ed etanolo all'interno della bomba solvotermale.

Sintesi	Rapporto molare TiO ₂ :Ag	Volume H ₂ O [mL]	Volume EtOH [mL]	Frazione molare H ₂ O	Frazione molare EtOH	Colorazione termine trattamento
DS1	36:1	0.1	10	0.03	0.97	Biancastro
DS2	18:1	0.2	10	0.06	0.94	Biancastro
DS9	17:1	0.2	10	0.06	0.94	Arancione
DS3	12:1	0.3	10	0.09	0.91	Biancastro
DS5	9.0:1	0.4	10	0.11	0.89	Arancione
DS4	8.9:1	0.4	10	0.11	0.89	Arancione
DS10	6.1:1	0.55	10	0.15	0.85	Arancione scuro
DS6	6.0:1	0.6	10	0.16	0.84	Arancione scuro
DS7	5.6:1	0.65	10	0.17	0.83	Arancione scuro
DS8	5.2:1	0.7	10	0.19	0.81	Arancione scuro

Per investigare l'effetto del rapporto molare $\text{TiO}_2:\text{Ag}$ sulla reazione, questo è stato opportunamente modificato da sintesi a sintesi lavorando nella finestra di frazioni molari $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ in cui la pressione autogena risulta pressoché costante, ovvero intorno a 9.5 bar, come mostrato in Figura 6.20 [95]. È stato quindi possibile studiare rapporti con contenuto decrescente in precursore di titania, da 36:1 a 5.2:1.

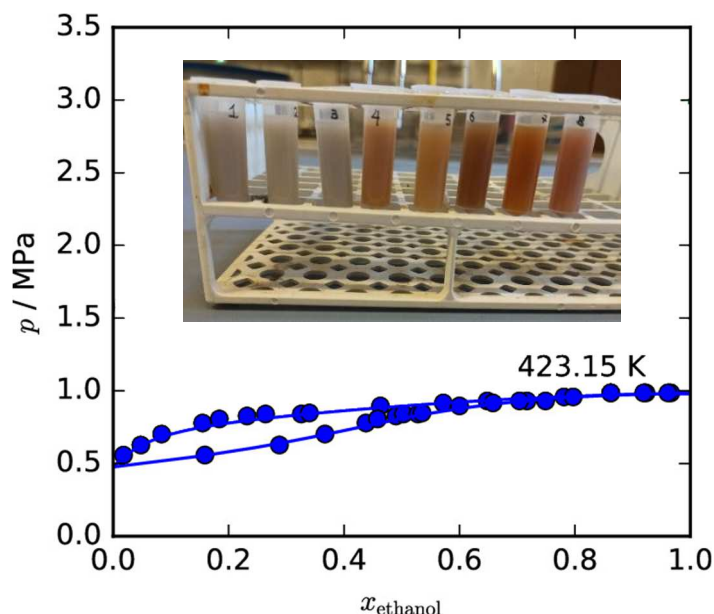


Figura 6. 20: Digramma frazione molare pressione per una miscela di acqua ed etanolo a 423.15 K (150°C), adattata da [95]. In alto, da sinistra a destra, colorazioni delle sospensioni dalla DS1 alla DS8 al termine del trattamento solvotermale.

Dalla dispersione dei precipitati ottenuti al termine del trattamento solvotermale si sono raccolte sospensioni di colore dipendente dal rapporto molare impiegato, come riassunto nell'ultima colonna di Tabella 6.6. Come si può osservare per le sintesi dalla DS1 alla DS8 in Figura 6.20, al diminuire del contenuto di titania si passa da un biancastro ad un arancione scuro, dovuto alla maggiore presenza di argento. Sebbene per la DS4 e la DS9 si abbia ottenuto una colorazione arancione, apparentemente in contrasto con quanto atteso dai rapporti molari, dopo diluizione per analisi UV/Vis sono risultate anche loro biancastre. Ci si sarebbe atteso che la DS5 avesse lo stesso comportamento della DS4 sotto diluizione ma questo non è successo, forse per un quantitativo di argento nella DS4 minore di quello stechiometrico.

Sebbene tutte le sospensioni siano state centrifugate al termine del trattamento solvotermale, nel caso delle prime quattro sintesi era già stata eseguita una centrifuga per ridurre il volume iniziale della sospensione di AgNPs da 200 a 50 mL. A tal proposito, si è lavorato ad un basso numero di giri (2500 rpm, 30 min) per evitare di rimuovere il citrato posto a stabilizzazione delle nanoparticelle.

Gli spettri registrati per le sospensioni centrifugate dalla DS5 alla DS8 sono riportati a titolo di esempio in Figura 6.21. I profili osservati sono molto simili a quelli già riscontrati per le sintesi di core-shell *one-pot* OP prima di centrifugare. In questo caso al contributo del TOB si sostituisce quello sotto i 350 nm della titania, il cui assorbimento si estende verso il rosso nello spettro visibile. Intorno ai 450 nm emerge invece la banda attribuibile

alla risonanza plasmonica delle AgNPs ricoperte. Appare poi evidente come, all'aumentare del quantitativo d'argento, dunque spostandosi dal rapporto molare 9.0:1 a quello 5.2:1, la banda plasmonica cresce di intensità, mostrando poi un *redshift* per la DS8. Negli spettri delle sintesi DS1 e la DS3 qui non riportati, il contributo dell'argento è troppo ridotto e, se presente, il plasmone è nascosto dalla titania.

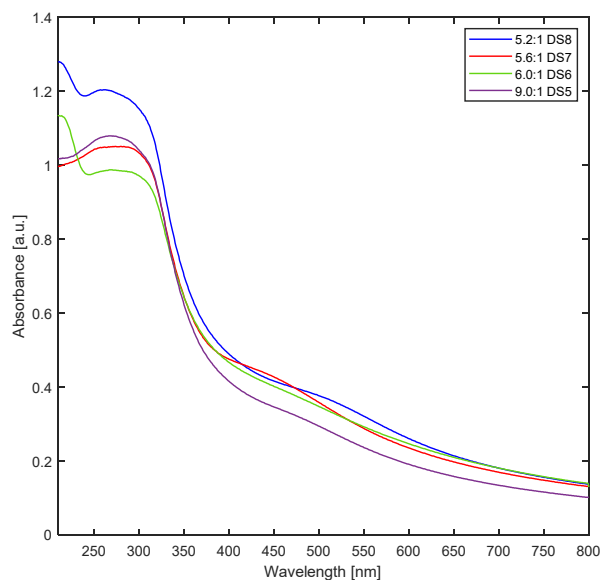


Figura 6. 21: Confronto tra gli spettri UV/Vis delle sintesi a due stadi DS5, DS6, DS7 e DS8, ovvero con rapporto molare $TiO_2:Ag$ crescente.

Alcune delle sospensioni ottenute sono state depositate su silicio per analisi XRD. I loro diffrattogrammi, normalizzati rispetto al riflesso principale dell'anatasio (1 0 1) posto a 25.3° , sono mostrati in Figura 6.22.

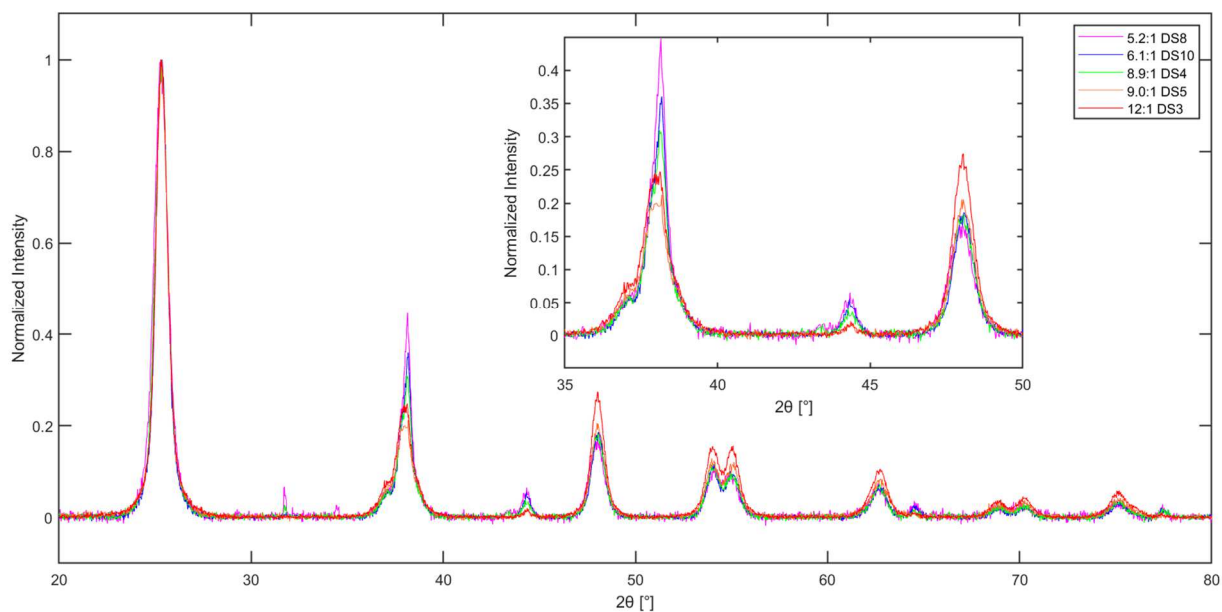


Figura 6. 22: Confronto tra i diffrattogrammi normalizzati rispetto al riflesso principale dell'anatasio (1 0 1) per le sintesi DS3 (rosso), DS5 (arancione), DS4 (verde), DS10 (blu) e DS8 (viola). Nell'ingrandimento è presentata la regione tra 35° e 50° .

Dall'ingrandimento riportato tra 35° e 50°, si può notare come all'aumentare del contenuto di argento i riflessi intorno a 38° e 43° diventino più intensi mentre quello a 48° diminuisca di intensità, come buona parte degli altri segnali del diffrattogramma. L'elaborazione dei *pattern* di diffrazione ha permesso di riconoscere le fasi cristalline presenti nei campioni, ovvero argento e titania cristallina, sotto forma di solo anatasio. A differenza delle sintesi *one-pot*, dunque, è possibile stabilire con certezza che non è stata persa titania dopo la centrifugazione e che tutti i trattamenti solvotermali hanno avuto successo. Come esempio della separazione dei riflessi delle due fasi il diffrattogramma per la sintesi DS5 è riportato in Figura 6.23.

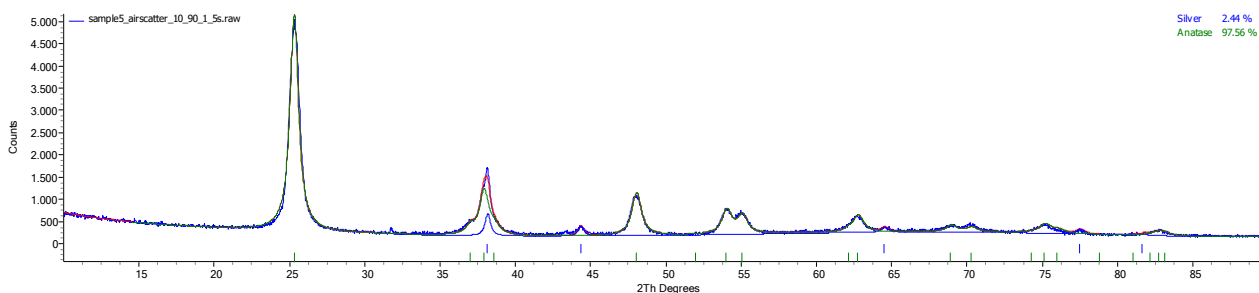


Figura 6. 25: Separazione dei profili cristallografici tramite metodo Rietveld su DIFFRAC.TOPAS e abbondanza percentuale associata per la sintesi di core-shell a due stadi DS5.

I riflessi principali per l'anatasio sono associati ai piani reticolari (1 0 1) a 25.3°, (2 0 0) a 48.0°, (1 0 5) a 54.0°, (2 1 1) a 55.0° e (2 0 4) a 62.8°. Per l'argento, invece, si hanno i riflessi (1 1 1) a 38.2°, (2 0 0) a 44.3°, (2 2 0) a 64.5°, (3 1 1) a 77.5° e (2 2 2) a 81.6°. Proprio questi segnali sono quelli che in Figura 6.22 vedono la loro intensità aumentare al diminuire del rapporto molare TiO₂:Ag, a discapito di quelli della titania cristallina. I picchi per la DS8 non attribuibili alle fasi del core o della shell sono dovuti a contaminazioni di zincite presente in bomba prima dell'uso, rilevati in maggiore quantità anche nella DS6 e nella DS7. La sovrapposizione tra i riflessi dell'anatasio (0 0 4) e (1 1 2), rispettivamente a 37.9° e 38.6°, con quello (1 1 1) dell'argento hanno reso necessario l'utilizzo del metodo Rietveld per stabilire con miglior accuratezza le dimensioni dei cristalliti.

Tabella 6. 7 Concentrazioni m/m percentuali trovate dall'analisi Rietveld applicata ai diffrattogrammi raccolti, confrontate con quelle stechiometriche, e corrispondenti dimensioni dei cristalliti.

Sintesi	Rapporto molare TiO ₂ :Ag	% m/m TiO ₂ stechiometrica [%]	% m/m TiO ₂ da XRD [%]	% m/m Ag stechiometrica [%]	% m/m Ag da XRD [%]	d TiO ₂ [nm]	d Ag [nm]
DS3	12:1	89.8	99.4	10.2	0.6	9	26
DS5	9.0:1	87.0	97.6	13.0	2.4	9	16
DS4	8.9:1	86.9	99.1	13.1	0.9	9	14
DS10	6.1:1	81.8	97.1	18.2	2.9	10	19
DS6	6.0:1	81.7	95.8	18.3	4.2	9	15
DS7	5.6:1	80.5	97.1	19.5	2.9	8	14
DS8	5.2:1	79.3	96.3	20.7	3.7	8	17

È stato inoltre possibile stabilire la concentrazione in massa %m/m delle fasi cristalline presenti nei campioni, come riassunto in Tabella 6.7. Le concentrazioni %m/m stechiometriche sono state ottenute calcolando le masse di AgNPs e di nanoparticelle di titania attese assumendo una conversione quantitativa al 100% delle moli di nitrato d'argento e TOB impiegate. Quindi le masse trovate sono state rapportate alla massa somma. Sulla base di quanto calcolato è atteso che, passando dal rapporto $\text{TiO}_2:\text{Ag}$ 12:1 a quello 5.2:1, la concentrazione di titania diminuisca dall'89.8% al 79.3% mentre quella di argento aumenti dal 10.2% al 20.7%. Dall'analisi Rietveld si è invece ottenuta una variazione dal 99.4% al 96.3% per l'anatasio e dal 0.6% al 3.7% per le AgNPs. Sembra dunque che buona parte dell'argento non si trovi più all'interno delle sospensioni, essendo in percentuale molto scarso. Al diminuire del rapporto molare $\text{TiO}_2:\text{Ag}$, inoltre, non si ha un aumento perfettamente lineare della percentuale di argento, pertanto non sembra essere stato perso in modo sistematico. Le concentrazioni %m/m ottenute risultano però in contrasto con l'andamento evidenziato in Figura 6.22, dal momento che nella DS4 non si osserva alcuna inversione di tendenza, ovvero una crescita dei riflessi dell'anatasio a discapito di quelli dell'argento. Dunque, almeno graficamente, i rapporti molari sembrano rispettati. Anche i diffrattogrammi delle sintesi DS6 e nella DS7, contaminati da zincite e non riportati in Figura 6.22, mostrano un contributo di titania maggiore rispetto alla DS5, in ogni caso non rispecchiante le concentrazioni di Tabella 6.7.

Per quanto riguarda le dimensioni dei cristalliti, per l'anatasio si sono ottenuti diametri piuttosto contenuti, tra 8 e 10 nm, in modo del tutto simile a quanto ricavato dall'analisi XRD per la sintesi TiAO_2 1 (8 nm). Per l'argento, invece, si hanno cristalliti di 15-25 nm.

Le sospensioni di core-shell ottenute tramite sintesi a due stadi DS sono state analizzate tramite spettroscopia Raman depositandole su lastrine di silice, comparando il segnale del centrifugato con quello del rispettivo supernatante per individuare eventuali perdite di campione. Gli spettri Raman Stokes per specifiche posizioni delle sintesi DS6 e DS9 sono riportati a titolo di esempio in Figura 6.24.

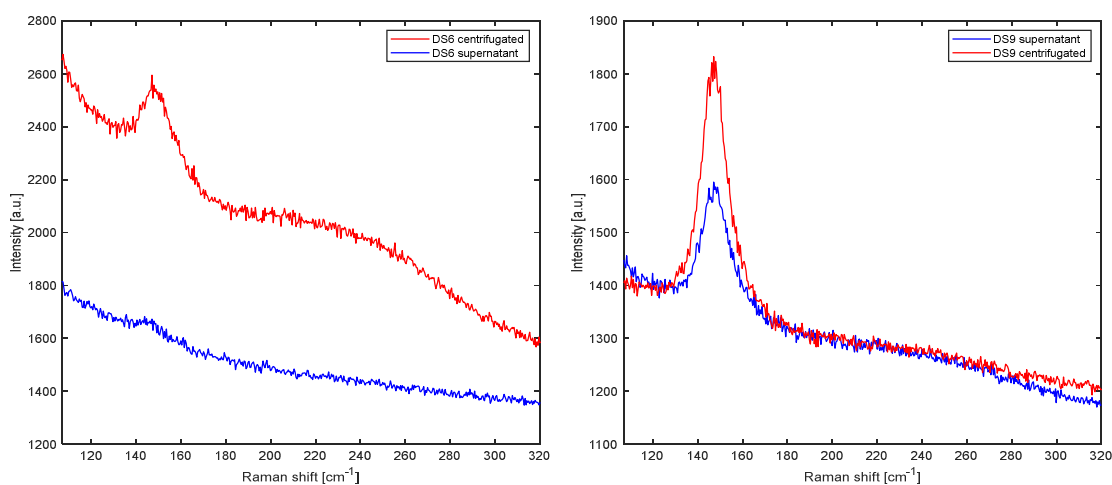


Figura 6. 24: Confronto tra gli spettri Raman Stokes per il centrifugato e il supernatante delle sintesi di core-shell a due stadi DS6 e DS9, privi di correzione della linea di base, da 107 a 320 cm^{-1} . Si è lavorato al Raman Triplo eccitando a 785 nm, con 10 acquisizioni per 5 secondi.

Per entrambe il segnale dell'anatasio delle acque madri risulta inferiore rispetto a quello della sospensione raccolta. Si può notare inoltre come per la DS6 la banda dell'argento sia presente solo nel centrifugato mentre sia osservata nella DS9 sia per il supernatante che per la sospensione raccolta, sotto forma di un segnale molto debole e ampio. I risultati sono presentati schematicamente in Tabella 6.8 assieme a quelli delle altre sospensioni depositate.

Tabella 6. 8: Segnali Raman trovati nel centrifugato e nel supernatante per le sintesi a due stadi depositate su silice e analizzati a 785 nm di eccitatrice al Raman Triplo.

Sintesi	Presenza segnale Ag centrifugato	Presenza segnale anatasio centrifugato	Presenza segnale Ag supernatante	Presenza segnale anatasio supernatante
DS1	No	Si	No	No
DS2	No	Si	No	No
DS3	Si	Si	No	No
DS4	No	Si	No	Si
DS5	No	Si	No	Si
DS6	Si	Si	No	Si
DS7	Si	Si	No	Si
DS8	No	Si	No	No
DS9	Si	Si	Si	Si
DS10	Si	Si	No	No

In tutte si sono trovati segnali dovuti all'anatasio, mentre la banda dell'argento intorno a 233 cm^{-1} è stata osservata solo in specifiche posizioni di alcuni campioni, come appunto le sintesi DS3, DS6, DS7, DS9 e DS10. Questo è sostanzialmente dovuto alla disomogeneità dei campioni analizzati. Per la DS6, con rapporto molare 6.0:1, il segnale dell'argento è tra i più intensi che sono stati trovati. Per quanto riguarda i supernatanti raccolti dopo le centrifughe, in specifiche posizioni di alcuni di essi si è trovato anatasio e solo in una posizione del supernatante della DS9 si è notata una banda bassa e larga attribuibile all'argento. Il diverso comportamento Raman al variare del punto considerato è dovuto probabilmente alla disomogeneità del campione depositato su silice.

Gli spettri Raman Stokes e anti-Stokes, con correzione della *baseline*, per alcune delle sintesi DS sono riportate in Figura 6.25 normalizzate rispetto alla banda dell'anatasio a 143 cm^{-1} . Ancora più marcata è la presenza della banda dell'argento nella sospensione DS6 e DS10, rispettivamente con rapporto molare $\text{TiO}_2:\text{Ag}$ 6.0:1 e 6.1:0. Per la DS7, ovvero 5.6:1, il segnale è poco intenso.

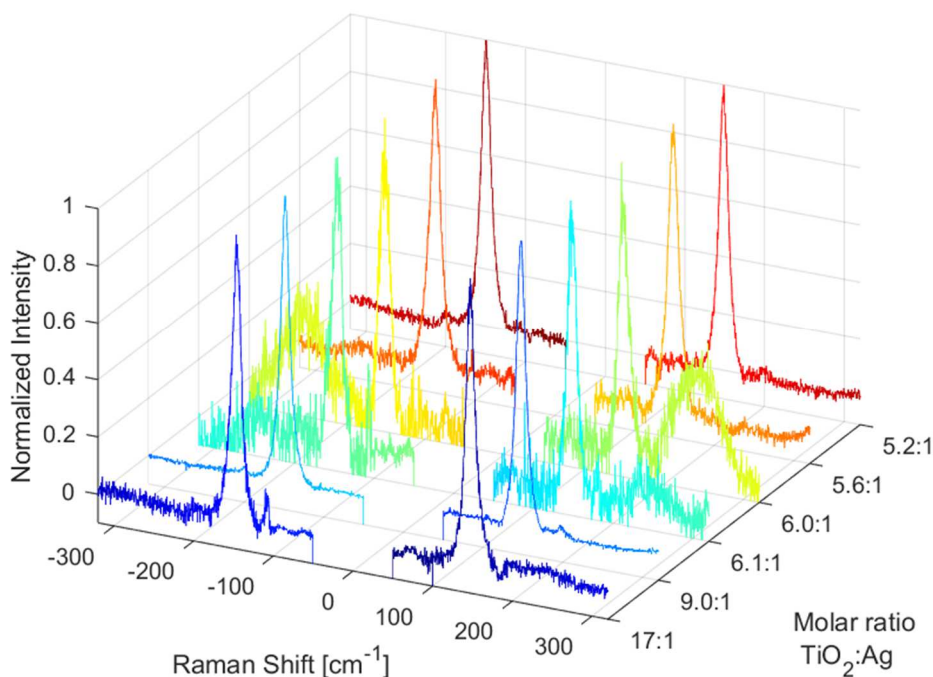


Figura 6. 25: Spettri Raman normalizzati rispetto al segnale dell'anatasio rispettivamente, a rapporti molari decrescenti, per le sintesi DS9, DS5, DS10, DS6, DS7 e DS8. Gli spettri sono stati registrati al Raman Triplo con eccitatrice a 785 nm.

Le immagini ottenute al TEM per le sintesi DS4, DS6 e DS8 sono riportate in Figura 6.26. Come si può vedere, in tutte e tre sono presenti delle particelle scure, identificate con le AgNPs, e delle particelle più chiare, ovvero titania anatasio. In particolare, la distribuzione di particelle nei TEM delle sintesi DS6 e DS8 è simile, con le nanoparticelle d'argento disperse in un mare di titania. Nonostante la centrifugazione eseguita per la sospensione d'argento della DS4 prima dell'aggiunta dell'alcolossido, gli agglomerati di AgNPs sembrerebbero essere presenti in tutti e tre i campioni, specialmente nella DS8.

In generale, le nanoparticelle d'argento presentano una distribuzione dimensionale migliore rispetto a quella della sintesi OP, con dimensioni di circa 10-20 nm. In specifiche posizioni si possono vedere anche aggregati che raggiungono fino a 50 nm di diametro. Vi è dunque un buon controllo dimensionale ma non sulla loro aggregazione. Le AgNPs più piccole sono comunque confrontabili con i diametri dei cristalliti trovati dall'analisi XRD in Tabella 6.7. Per quanto riguarda le nanoparticelle d'anatasio, risultano di circa 10-20 nm di grandezza, quindi confrontabili con i relativi cristalliti. Sembrano però essere cresciute indipendentemente da quelle d'argento, a cui si sovrapporrebbero in corrispondenza delle zone grigie più scure. È dunque probabile che la titania non abbia formato una shell attorno alle AgNPs, sebbene senza EDX sia difficile da stabilire con certezza assoluta. Dunque, i segnali Raman e i riflessi dell'XRD sarebbero spiegabili dalla mescolanza tra le nanoparticelle di anatasio e quelle d'argento e non dalla formazione di vere e proprie core-shell.

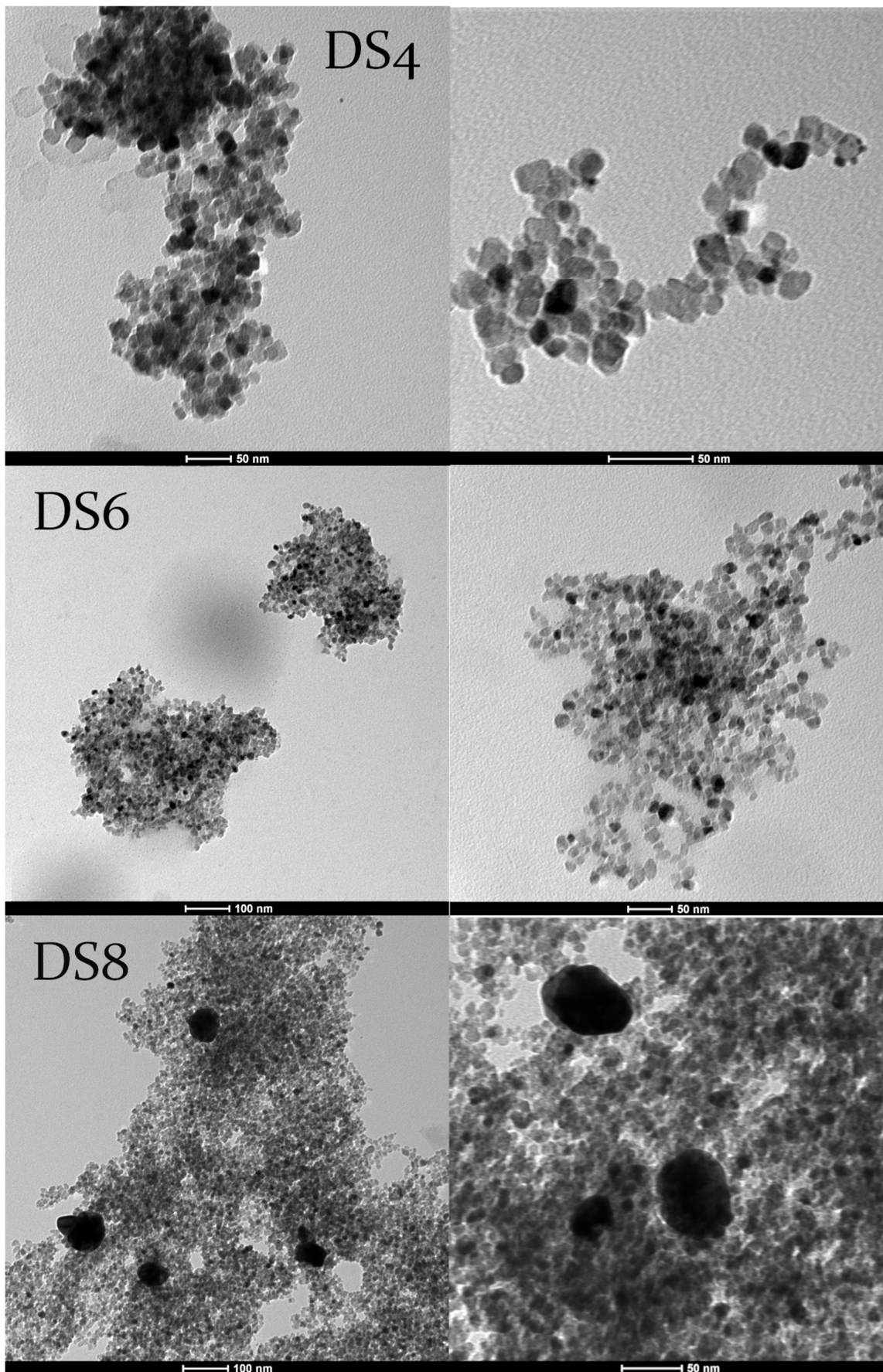


Figura 6. 26: Immagini HRTEM per le sintesi DS4, DS6 e DS8, dunque con quantità crescente di argento. Per ognuna di esse è riportata sulla destra un'immagine a magnificazione maggiore.

6.6 Riepilogo della Sintesi a Due Stadi di Ag@TiO₂

La sintesi a due stadi di core-shell di Ag@TiO₂ è stata sviluppata in modo da avere un maggior controllo sulle dimensioni del core, riproducibilità di sintesi e per eliminare la DMF dalla reazione, in quanto solvente pericoloso e non *green*. A tal proposito si è proceduto a rivestire di titania le nanoparticelle d'argento in sospensione acquosa, ottenute in modo del tutto analogo alle reazioni AgCit. L'effetto dell'uso di diversi rapporti molari TiO₂:Ag, variati da 36:1 a 5.2:1, è stato indagato, mantenendo costante il volume di soluzione di precursore di titania impiegato e la pressione autogena all'interno del *liner*. I processi di formazione della shell e di cristallizzazione della stessa sono stati organizzati per avvenire durante il trattamento solvotermale, nelle stesse condizioni delle *one-pot*. Salvo per l'assenza di acetilacetone, gli spettri UV/Vis delle sospensioni centrifugate al termine della sintesi hanno mostrato un profilo del tutto analogo a quello delle OP amorphe, a tutti i diversi rapporti molari TiO₂:Ag impiegati. Inoltre, all'aumentare del quantitativo di argento dalla sintesi DS4 alla DS8, si è osservata la crescita in intensità della banda plasmonica. A differenza delle sintesi *one-pot*, negli spettri Raman di tutte le sospensioni raccolte sono state trovate le bande dell'anatasio. Nonostante il segnale per le AgNPs a 233 cm⁻¹ sia stato individuato solo nelle sospensioni DS3, DS6, DS7, DS9 e DS10, i suoi riflessi caratteristici all'XRD sono presenti per tutte le sintesi, in misura maggiore a quantitativo di argento crescente. Le dimensioni stimate tramite metodo Rietveld per i cristalliti dell'anatasio e dell'argento, rispettivamente intorno ai 9 e ai 20 nm, corrispondono a quelle delle più piccole nanoparticelle riportate nelle immagini TEM ad alta risoluzione. La sintesi a due stadi sembrerebbe dunque promettente per ottenere core di piccole dimensioni ricoperti, in grado di penetrare la membrana cellulare per la terapia fototermica (<60 nm) [27]. Al momento i riscontri dall'analisi HRTEM per le DS4, DS6 e DS8 sembrano indicare l'assenza di core-shell, sebbene prove più definitive, come EDX, siano necessarie. Il processo a due stadi risulta comunque attraente da sviluppare in quanto permette di:

- sostituire il riducente non green DMF con il citrato, lavorando in soluzione acquosa;
- rimuovere lo stadio di purificazione al termine della formazione della shell nella sintesi *one-pot*, in quanto non vi è necessità di eliminare la DMF residuo;
- avere una distribuzione dimensionale stretta per le nanoparticelle d'argento che andranno a costituire il core, centrata sui 20 nm di diametro;
- far avvenire lo stadio di rivestimento e di cristallizzazione della shell in un unico stadio, con percentuale di successo dei trattamenti solvotermali superiore rispetto al metodo *one-pot*.

6.7 Nanotermometria

In lavori precedenti del gruppo di ricerca la titania anatasio è stata già sperimentata per nanotermometria Raman. In particolar modo, si è visto che il segnale migliore in termini di sensibilità è quello a 143 cm⁻¹, impiegando come indicatore termometrico il rapporto

tra le intensità dei segnali anti-Stokes e Stokes di (eq. 2.17) [22]. Misure nanotermometriche per differenti campioni di anatasio sintetizzati con diverse metodologie sono già state presentate in letteratura e hanno confermato la bontà di questi termometri [14] [89]. Nel seguito saranno discusse le nanotermometrie Raman eseguite per i campioni delle sintesi di core-shell *one-pot* OP4 e OP8, di cui si aveva a disposizione del campione solido, sebbene così scarso che non è stato possibile macinarlo per ottenere una polvere omogenea. I risultati ottenuti saranno poi confrontati con quelli delle nanotermometrie eseguite per le nanoparticelle di anatasio TiO₂A sintetizzate.

Nella sintesi OP4 si sono ottenuti cinque cristalli, di cui si è proceduto inizialmente ad individuare quello con il contributo Raman dell'argento minoritario a parità di intensità del segnale dell'anatasio, come mostrato in Figura 6.27 utilizzando la lunghezza d'onda di eccitazione a 514 nm.

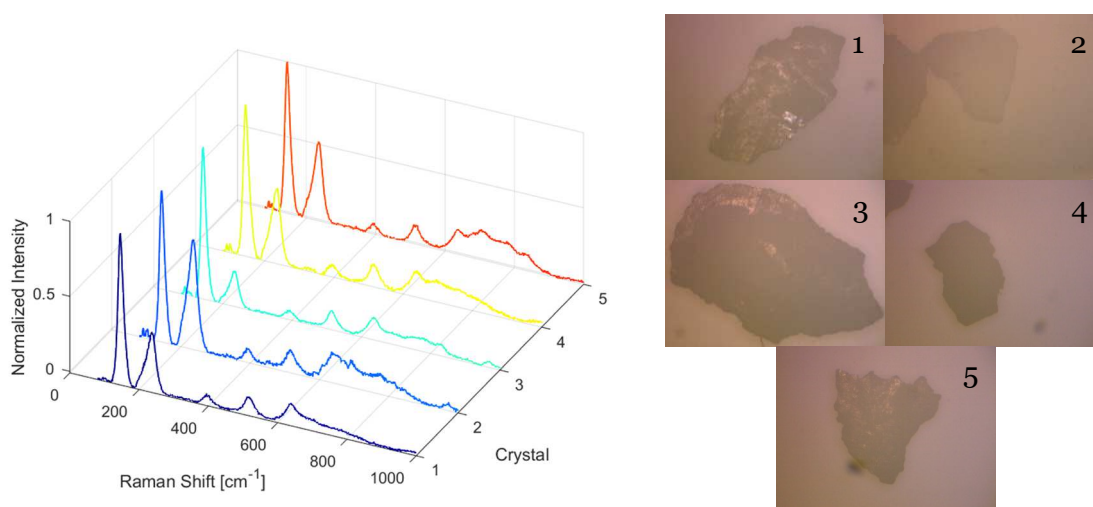


Figura 6. 27: A sinistra, spettri Raman Stokes normalizzati rispetto al segnale dell'anatasio a 143 cm^{-1} dei cinque cristalli della sintesi OP4 registrati da 80 a 1000 cm^{-1} , eccitando al Raman Didattico a 514 nm, con 10 acquisizioni per 5 secondi. A destra, immagini dei cinque cristalli prese al microscopio con ingrandimento 4x.

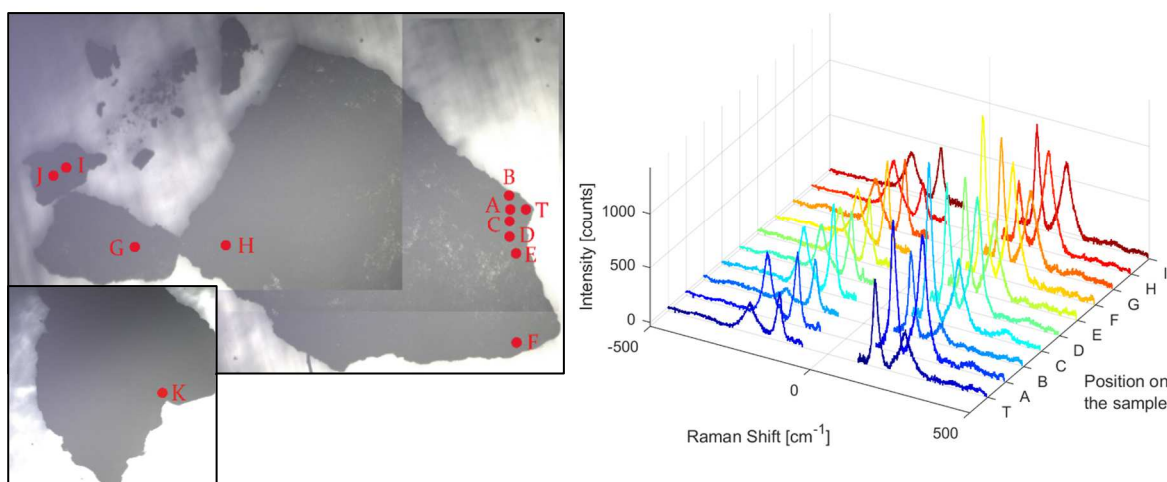


Figura 6. 28: A sinistra, immagine presa al microscopio con ingrandimento 4x per il cristallo 3 della sintesi OP4. La posizione K, in corrispondenza della sovrapposizione tra i cristalli 4 e 5, è riportata in basso a sinistra. A destra, spettri Raman delle posizioni campionate al suo interno, registrati al Raman Triplo da -500 a 500 cm^{-1} , eccitando a 800 nm, con 5 acquisizioni per 5 secondi e potenza sul campione da 1.0 a 1.3 mW.

Il cristallo migliore risulta essere il numero 3 di Figura 6.27, il più grande tra i cinque. Esso è stato mappato utilizzando 800 nm come eccitatrice per individuare le posizioni più adeguate ad eseguire le termometrie nel vicino IR, alle lunghezze d'onda di 800, 850 e 900 nm. I risultati della mappatura sono riportati nella Figura 6.28, dove sono riportati gli spettri Raman raccolti nelle posizioni evidenziate nella foto del cristallo sulla sinistra (indicate con le lettere A-J, T). In basso a sinistra è riportata anche la posizione indicata con la lettera K, in corrispondenza di una sovrapposizione spaziale tra i cristalli 4 e 5 di Figura 6.27. In questo punto è stata eseguita la nanotermometria a 530 nm.

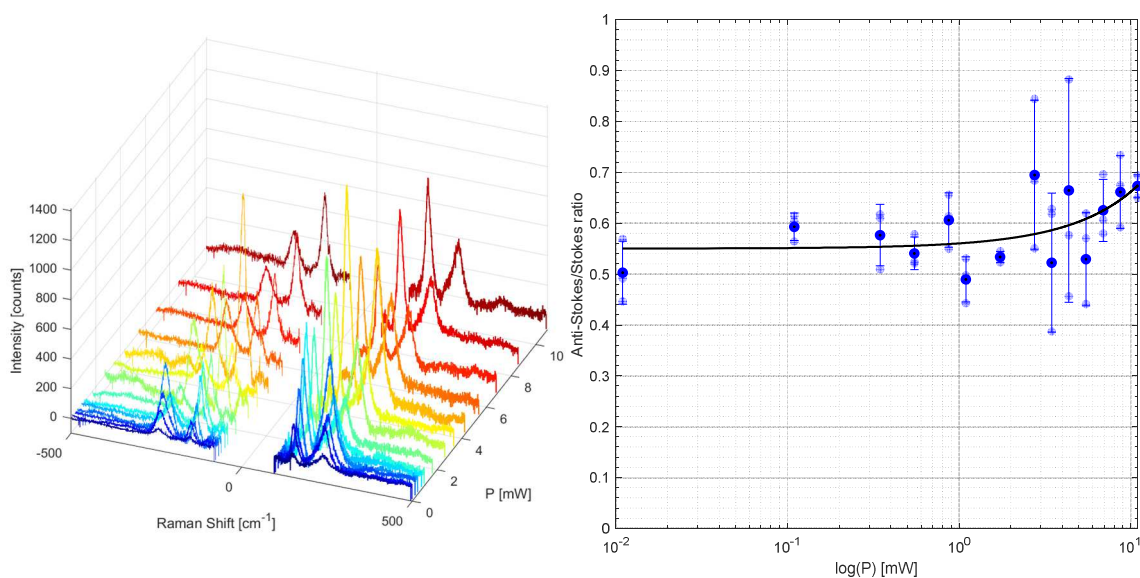


Figura 6. 29: A sinistra, gli spettri Raman a potenze crescenti sul cristallo 3 della OP4 in posizione T. A destra, l'interpolazione polinomiale dei valori di indicatore termometrico contro la potenza. Le figure fanno riferimento a misure al Raman Triplo con eccitatrice a 800 nm, 5 acquisizioni per 5 secondi.

Prima di procedere con le misure di temperatura ad una specifica lunghezza d'onda eccitatrice, si è eseguita una scansione a differenti potenze P_0 sul campione disattenuando progressivamente il laser passando da OD 4.0 a OD 0.0. Questa operazione è stata svolta per verificare in quale intervallo di potenza è opportuno lavorare al fine di evitare l'effetto di riscaldamento del laser. Gli spettri Raman Stokes e anti-Stokes registrati ad una determinata potenza sono mostrati nella parte sinistra della Figura 6.29, mentre nella parte destra i valori dei rapporti delle intensità anti-Stokes su Stokes (utilizzati come indicatore termometrico Q) sono riportati in funzione del logaritmo di P_0 . La discreta ampiezza delle barre di errore riportate in corrispondenza dei punti è causata dalla disomogeneità del campione. Tramite interpolazione polinomiale dei valori di Q si è trovato che fino ai 3 mW di potenza esiste una relazione lineare tra l'indicatore termometrico e la P_0 impiegata. Al di sopra, invece, si ha una crescita simil-esponenziale dovuta al riscaldamento del campione da parte del laser. Lo stesso andamento in potenza è stato osservato per le altre lunghezze d'onda di eccitazione impiegate. Si è dunque proceduto a lavorare nel regime di linearità, mantenendo il laser al di sotto di 3 mW di potenza e cercando di mantenerla il più simile possibile per tutti i campioni alle lunghezze d'onda impiegate.

Prima di riportare i risultati di tutte le nanotermometrie eseguite, viene discussa a titolo

di esempio quella registrata per il campione della sintesi OP4 eccitando a 800 nm, riportata graficamente in Figura 6.30. La posizione utilizzata per le misure è quella indicata dalla lettera T nella foto del cristallo 3 in Figura 6.27.

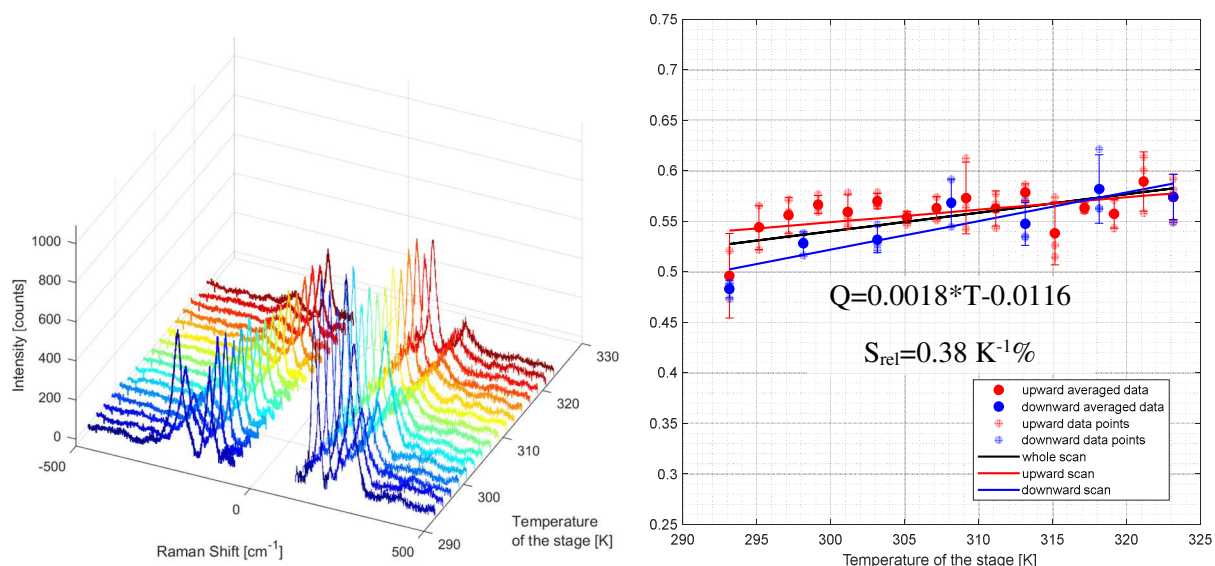


Figura 6. 30: A sinistra, gli spettri Raman registrati a temperature crescenti sul cristallo 3 della OP4 in posizione T. A destra, nanothermometria da 20 a 50°C eccitando a 800 nm, 5 acquisizioni per 5 secondi e potenza sul campione di 1.02 mW

Sulla sinistra sono raccolti gli spettri Raman Stokes e anti-Stokes raccolti a temperature variabili tra 20 e 50°C, registrati ogni 2°C all’aumentare della temperatura. Il rapporto tra le rispettive intensità dei segnali anti-Stokes e Stokes, raccolti all’aumentare della temperatura del termostato, è rappresentato dai punti in rosso sulla destra. Quelli in blu, invece, sono riferiti ad una scansione in discesa dove si è diminuita la temperatura ogni 5°C. Ad ogni temperatura impostata dal termostato si sono registrate tre coppie di spettri Stokes e anti-Stokes, da cui sono stati calcolati rispettivamente tre valori di indicatore termometrico Q, rappresentati dai punti dalla colorazione rossa o blu tenue. Dalla media dei tre rapporti ottenuti ad una determinata temperatura si sono ottenuti i valori dei punti più marcati, a cui sono associate le rispettive barre di errore. Si può notare come gli errori trovati siano confrontabili con quelli delle nanothermometrie eseguite in un precedente lavoro del gruppo di ricerca sulle nanoparticelle di titania [22].

Come giustificato nella sezione 3.2, i valori di indicatore termometrico ottenuti dal rapporto dell’intensità dei picchi anti-Stokes su Stokes dell’anatasio sono stati interpolati da una retta, dalla cui pendenza è stato possibile ottenere i valori di sensibilità assoluta e relativa. I punti marcati in Figura 6.30 sono stati quindi interpolati rispettivamente con una retta rossa, blu e nera, relativi alla scansione di temperatura in salita, in discesa e a quella globale. La pendenza, ovvero la sensibilità, della retta rossa e blu in questo caso è leggermente diversa a causa del differente numero di punti a disposizione. Le informazioni più importanti, in ogni caso, sono ottenute dalla retta riferita alla scansione globale, la cui sensibilità assoluta è pari a 0.0018 K^{-1} . È positiva, come atteso per il fatto che la popolazione del livello vibrazionale eccitato da cui si osserva la transizione in anti-Stokes

a -143 cm^{-1} aumenta all'incremento della temperatura secondo la statistica di Boltzmann, come espresso dalla (eq. 2.11). Per confrontare misure su campioni differenti è opportuno basarsi sulla sensibilità relativa S_{rel} , espressa in questo caso in $\text{K}^{-1}\%$. Per la nanotermometria nella posizione T appena discussa, la S_{rel} è risultata di $0.38 \text{ K}^{-1}\%$, il valore più elevato ottenuto lavorando a 800 nm di eccitatrice.

I risultati delle nanotermometrie eseguite sul campione OP4, nelle varie posizioni con lunghezza di eccitazione λ_{exc} nel visibile (a 530 nm) o nel NIR (a $800, 850$ e 900 nm) sono riportati schematicamente in Tabella 6.9. Per ogni posizione impiegata, è specificata la potenza sul campione e il modo in cui si sono eseguite le scansioni di temperatura tra 20 e 50°C , aumentando o diminuendo la temperatura o entrambe le modalità, ogni 5 o 2 gradi. Quindi sono mostrati i valori di sensibilità, intercetta e sensibilità relativa per le scansioni parziali e globali. In caso di unica scansione, come per la posizione A a 850 nm , le celle riferite a quella globale sono state lasciate vuote.

Si può notare come tutte le pendenze sono risultate positive, in accordo con quanto discusso in precedenza. Inoltre, all'aumentare del numero di punti considerati per il calcolo della pendenza globale, la sensibilità relativa migliora. Lavorando a 530 nm in posizione K si è ottenuto un valore molto simile a quello delle nanotermometrie a 800 nm , ovvero $0.33 \text{ K}^{-1}\%$. S_{rel} poi cala drasticamente passando ad 850 nm e poi a 900 nm di lunghezza d'onda di eccitazione.

Tabella 6. 9: Riassunto delle nanotermometrie Raman eseguite sul campione OP4 a differenti lunghezze d'onda di eccitatrice, a diverse posizioni e potenze sul campione.

Lunghezza d'onda eccitazione λ_{exc} [nm]	Posizione sul campione	Potenza laser [mW]	Direzione scansione	Intervallo scansione	Sensibilità assoluta (pendenza) [K^{-1}]	Intercetta	S_{rel} [$\text{K}^{-1}\%$]	Sensibilità assoluta (pendenza globale) [K^{-1}]	Intercetta globale	S_{rel} globale [$\text{K}^{-1}\%$]	
530	K	1.44	Salita	2	0.0014	0.098	0.29	0.0015	0.053	0.33	
			Discesa	5	0.0009	0.25	0.18				
800	T	1.02	Salita	2	0.0012	0.18	0.25	0.0018	0.012	0.38	
			Discesa	5	0.0028	-0.33	0.59				
	F	1.39	Discesa	5	0.0003	0.47	0.05	0.0003	0.48	0.08	
			Salita	5	0.0007	0.36	0.13				
	I	1.46	Salita	2	0.0018	0.13	0.30	0.0021	0.054	0.34	
			Discesa	5	0.0021	0.041	0.34				
850		1.74	Salita	5	0.0011	0.096	0.26	0.0008	0.21	0.18	
			Discesa	5	0.0006	0.25	0.15				
	J	1.57	Salita	2	0.0014	0.017	0.35	0.0010	0.13	0.27	
			Discesa	5	0.0005	0.27	0.14				
	A			Salita	5	0.0004	0.26	0.11	-	-	-
	900	I	2.31	Salita	5	0.0012	0.24	0.20	0.0007	0.43	0.13
Discesa				5	0.0006	0.45	0.12				
		2.78	Salita	2	0.0010	0.30	0.18	0.0009	0.32	0.17	
			Discesa	5	0.0009	0.31	0.16				

Quanto osservato per il campione della sintesi OP4 è stato confermato dalla nanotermometria a 800 nm eseguita per la OP8, le cui informazioni sono presentate in Tabella 6.10 assieme a quelle delle nanotermometrie per le sintesi $\text{TiO}_2\text{A1}$ e $\text{TiO}_2\text{A2}$.

Anche per la OP8 i punti sono molto dispersi e la sensibilità relativa si assesta a $0.32 \text{ K}^{-1}\%$, mentre quella assoluta a 0.0015 K^{-1} . I valori risultano dunque molto vicini a quelli della OP4. I risultati ottenuti dalle scansioni in temperatura delle nanoparticelle di anatasio sintetizzate si sono rivelati in accordo con la letteratura [89], con una sensibilità relativa molto vicina al valore teorico di $0.22 \text{ K}^{-1}\%$, calcolato a partire da (eq. 1.11) applicata alla (eq. 2.17).

Tabella 6. 10: Riassunto delle nanotermometrie Raman eseguite sul campione OP8 a 800 nm e sui campioni di nanoparticelle di anatasio sintetizzate TiO2A1 e TiO2A2 rispettivamente a 800 nm e 530 nm.

Lunghezza d'onda eccitazione λ_{exc} [nm]	Campione	Potenza del laser [mW]	Direzione scansione	Intervallo scansione	Sensibilità assoluta (pendenza) [K^{-1}]	Intercetta	S_{rel} [$\text{K}^{-1}\%$]	Sensibilità assoluta (pendenza globale) [K^{-1}]	Intercetta globale	S_{rel} globale [$\text{K}^{-1}\%$]
530	TiO ₂ A2	1.52	Salita	2	0.0009	0.26	0.17	-	-	-
800	TiO ₂ A1	1.39	Salita	2	0.0011	0.31	0.18	0.0014	0.23	0.22
			Discesa	5	0.0019	0.045	0.32			
	OP8	1.61	Salita	2	0.0007	0.41	0.12	0.0015	0.15	0.32
			Discesa	5	0.0033	-0.45	0.74			

Per tutte le nanotermometrie discusse finora è stata calcolata tramite (eq. 1.12) la risoluzione termica ΔT_{min} , che deriva dal rapporto tra la dispersione dei valori di rapporto di intensità anti-Stokes su Stokes determinati e la sensibilità calcolata. Con solo tre misure si ottengono valori molto dispersi che vanno da pochi kelvin a decine di kelvin. I valori migliori sono stati ottenuti sul campione OP4: alla lunghezza d'onda di 800 nm esso è pari a 3 K mentre a 530 nm è 5 K. Alle stesse lunghezze d'onda il campione di sola titania mostra una risoluzione termica di 6 e 5 K, rispettivamente. In questo caso i valori ottenuti sono leggermente superiori a quelli riportati in letteratura [22] [89] e derivano dal fatto che, non avendo un campione omogeneo, non è stato possibile ottenere misure ripetute in più regioni del campione che porterebbero a migliorare la risoluzione termica.

Per capire se la presenza del core di argento porti ad un miglioramento delle prestazioni del nanotermometro, nella Figura 6.31 si sono confrontate le rette interpolanti i dati di quattro termometrie per ciascuna lunghezza d'onda delle core-shell OP4 e delle due termometrie per le nanoparticelle di titania. Per chiarezza sono mostrate solo le barre di errore corrispondenti ai punti con minore e maggiore incertezza per ciascuna serie di misure. Per le lunghezze d'onda impiegate per entrambi i campioni, i valori di S ed S_{rel} sono comparati in Tabella 6.11.

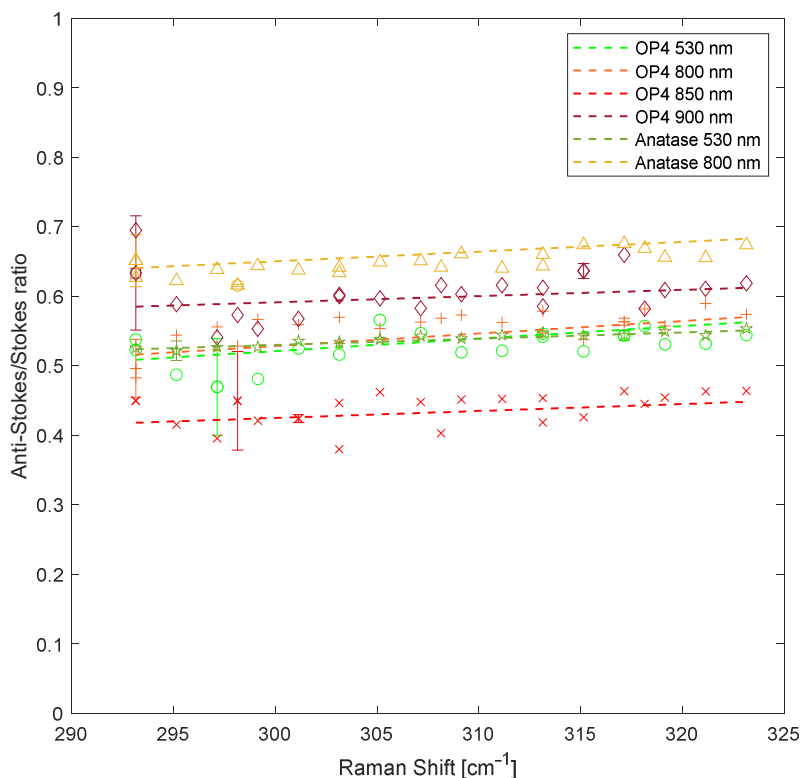


Figura 6. 31: Confronto tra le rette interpolanti i dati di nanotermometria per la OP4 alle 4 lunghezze d'onda di eccitazione impiegate e quelle per le sintesi TiO₂A1 e TiO₂A2 rispettivamente a 800nm e 530 nm. Per semplicità di lettura sono riportate solo la barra di errore più grande e quella più piccola per ciascuna serie di punti.

Tabella 6. 11: Confronto tra i valori di sensibilità assoluta e relativa per le sintesi OP4 e di nanoparticelle d'anatasio a 530 nm e 800 nm.

Campione	S a 530 nm [K ⁻¹]	S _{rel} a 530 nm [K ⁻¹ %]	S a 800 nm [K ⁻¹]	S _{rel} a 800 nm [K ⁻¹ %]
OP4	0.0015	0.33	0.0018	0.38
Anatasio NPs	0.0009	0.17	0.0014	0.22

Si può notare come le rette interpolanti i dati delle sintesi TiO₂A1 e TiO₂A2 siano meno pendenti, dunque con una sensibilità assoluta inferiore, rispetto a quelle della OP4. Ciò è confermato dai valori di sensibilità relativa che per le Ag@TiO₂ sono di poco superiori a quelli per l'anatasio e del valore teorico di 0.22 K⁻¹%. Sembrerebbe dunque che, pur lontani dalla risonanza plasmonica dell'argento, il nanocomposito porti ad una migliore sensibilità rispetto alle nanoparticelle di anatasio. Si prevede che la possibilità di ottenere una polvere omogenea di questo nanomateriale permetta probabilmente di osservare un ulteriore miglioramento delle sue proprietà nanotermometriche. Ciò che è possibile affermare con sicurezza al momento è che l'anatasio incorporato nel nanocomposito sintetizzato può essere impiegato come nanotermometro Raman per determinare la temperatura locale.

Conclusioni

Per la comprensione dei processi di trasporto termico alla nanoscala e di surriscaldamento locale in microdispositivi, per applicazioni in optoelettronica, in fluidica e in fotonica, di fondamentale importanza è la determinazione della temperatura locale. In particolare, nel settore della nanomedicina l'impiego di termometri nanometrici permette di localizzare le regioni con temperatura locale superiore alla norma e di discriminare tra cellule sane e cancerogene, essendo queste ultime caratterizzate da un'attività metabolica piuttosto intensa. Nanotermometri biocompatibili, opportunamente sintetizzati, sono interessanti anche per applicazioni nella terapia fototermica, come *nanoheater*, in quanto possono rilasciare una quantità di calore controllata in regioni localizzate: un *nanoheater* posto all'interno dell'ambiente cellulare, può quindi provocare la morte di cellule malate per ipertermia. Lavorando inoltre con radiazioni eccitatrici nel NIR, meno aggressive nei confronti dei tessuti, si ottiene una capacità penetrativa maggiore.

Tra le tante tecniche termometriche sviluppate negli anni, quella basata sulla spettroscopia Raman risulta essere adeguata viste la facilità d'uso in ambiente fisiologico per via dei deboli segnali Raman dell'acqua, la buona risoluzione spaziale e l'ampio intervallo di lunghezze d'onda d'eccitazione utilizzabile.

In un precedente lavoro del gruppo di ricerca, è già stato testato l'uso per nanotermometria Raman di nanoparticelle di anatasio commerciali, caratterizzate da un'elevata sezione d'urto di *scattering* Raman e da un segnale intenso a bassi Raman Shift [22] [89]. La biocompatibilità di questo materiale, unita alla sua bassa tossicità ed alla sua elevata stabilità chimica, lo rende il candidato ideale per applicazioni nella nanotermometria e potenzialmente utile anche in terapia fototermica. Dato che per rimuovere selettivamente le cellule cancerogene, senza danneggiare quelle sane limitrofe, è importante che la sonda nanotermometrica si trovi molto vicino al *nanoheater*, nanoparticelle core-shell di Ag@TiO₂ sono state proposte come materiali termometrici e fototermici, in quanto il nanotermometro, l'anatasio, è disposto attorno alle nanoparticelle d'argento, che fungono da *nanoheater*.

Nel presente lavoro di tesi è stata indagata la possibilità di determinare la temperatura locale alla nanoscala tramite l'utilizzo di questi nanotermometri innovativi, ovvero le core-shell di Ag@TiO₂, opportunamente sintetizzati. Per la loro sintesi sono state seguite due metodologie *bottom-up* di tipo sol-gel.

Il primo metodo utilizzato è stata una sintesi *one-pot* dove le nanoparticelle d'argento in DMF vengono sintetizzate e ricoperte tramite idrolisi controllata di tetrabutossido di titanio nello stesso ambiente di reazione [51]. Il TiO₂ amorfo formato viene a trasformarsi

in anatasio a seguito di trattamento solvotermale. La sintesi ha portato alla formazione di nanocompositi in cui le AgNPs sono ricoperte da uno strato diffuso di anatasio. I campioni ottenuti si sono rivelati dei buoni nanotermometri Raman con sensibilità superiori a quella delle semplici nanoparticelle di anatasio, sintetizzate in modo simile. In particolare, essi hanno mostrato la massima efficienza lavorando a 800 nm di lunghezza d'onda di eccitazione. Purtroppo, la necessità di una procedura di purificazione da effettuare prima del trattamento solvotermale, per rimuovere la DMF, riducente non *green* e pericoloso per l'uomo, ha portato ad ottenere anatasio solo in poche sintesi. Inoltre, l'assenza di stabilizzanti per il core, prima della formazione della shell, non ha permesso di avere un elevato controllo sulle dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate, ottenendo sistemi di 100 nm di diametro. Al fine di essere impiegati per la terapia fototermica, dunque, questi nanomateriali hanno una capacità ridotta di penetrazione in determinate barriere cellulari. Di conseguenza diventa opportuno utilizzare metodi di sintesi alternativi che permettano di controllarne e al contempo ridurre le dimensioni.

Nella seconda sintesi è quindi stato impiegato un metodo sintetico a due stadi utilizzando come core delle nanoparticelle d'argento in sospensione acquosa, stabilizzate dallo ione citrato. È stato in questo modo possibile eliminare la DMF e di conseguenza la procedura di purificazione antecedente al trattamento solvotermale. La sintesi a due stadi ha permesso di ottenere delle sospensioni di nanoparticelle di anatasio e di argento di 10-20 nm di diametro. Solo in poche regioni dei campioni sono visibili anche agglomerati di AgNPs di dimensioni maggiori, di circa 50 nm di diametro. Il controllo dimensionale raggiunto è risultato buono e superiore a quello della sintesi *one-pot*. Sebbene non siano state ancora ottenute vere e proprie core-shell, ma dei nanocompositi misti di argento e titania, i risultati di questa sintesi sono incoraggianti in quanto, le dimensioni di questi nanomateriali sono piccole a sufficienza da penetrare le membrane cellulari [27] e il segnale Raman ottenuto a temperatura ambiente è di elevata intensità.

Per sviluppi futuri di applicazione di questi nanocompositi per la terapia fototermica, misure di nanotermometria in sospensione acquosa dovranno essere sicuramente eseguite. Problematica sotto questo punto di vista è la tendenza della titania ad aggregare in acqua e a precipitare. A tal proposito si può operare in due modi: (1) disperdere in acqua un campione solido opportunamente funzionalizzato, derivante ad esempio dalla sintesi *one-pot* modificata, oppure (2) ottenere direttamente una sospensione stabile, come quella della sintesi a due stadi. Di aiuto potrebbe essere anche l'impiego di un rivestimento di acido stearico modificato superficialmente con acido 2,3-dimercattosuccinico, che si è rivelato efficace per rendere nanoparticelle di titania idrofiliche e idrosolubili [96]. Utilizzando queste soluzioni si otterrebbe così la possibilità di permeazione cellulare della TiO_2 e di accumulo dell'agente fototermico in loco.

Altri aspetti interessanti da investigare sono l'efficacia dell'applicazione plasmonica delle AgNPs nei confronti dell'anatasio e l'entità del suo eventuale riscaldamento locale indotto. L'eccitazione dei nanocompositi in prossimità o in corrispondenza della risonanza plasmonica dell'argento (intorno ai 400 nm) dovrà quindi essere testata per indagare le possibili amplificazioni SERS della sensibilità o della risoluzione termica del

nanotermometro. Infine, dovrà essere quantificata la variazione di temperatura indotta dalla presenza delle nanoparticelle d'argento in funzione della potenza del laser in condizioni di risonanza (nel visibile) e non (nel vicino IR) per simulare i processi di riscaldamento locale che indurrebbero la morte delle cellule malate nella terapia fototermica.

Appendice

A. Acronimi e Abbreviazioni

AFM	<i>Atomic Force Microscope</i> (Microscopio a Forza Atomica)
ACF	<i>Autocorrelation Function</i> (Funzione di Autocorrelazione)
AgNPs	Nanoparticelle d'argento
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CIPM	Comitato Internazionale dei Pesi e delle Misure
CM	<i>Chemical Mechanism</i> (Amplificazione Chimica)
COD	<i>Crystallography Open Database</i>
CTAB	<i>Cetiltrimethylammonium Bromide</i> (Bromuro di Cetiltrimetilammonio)
CTAC	<i>Cetiltrimethylammonium Chloride</i> (Cloruro di Cetiltrimetilammonio)
CW	<i>Continuous Wave</i> (Onda Continua)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Diffusione Dinamica della Luce)
DMF	<i>N,N-Dimethylformamide</i> (N,N-Dimetilformammide)
EDX	<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
EDS	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
EF	<i>Enhancement Factor</i> (Fattore di Amplificazione)
EG	<i>Ethylen Glicole</i> (Glicole Etilenico)
EM	<i>Electromagnetic Mechanism</i> (Amplificazione Elettromagnetica)
FWHM	<i>Full Width Half Maximum</i> (Larghezza a Metà Altezza)
HRTEM	<i>High Resolution Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopia Elettronica a Scansione ad Alta Risoluzione)
IR	<i>Infrared</i> (Infrarosso)
ITS-90	<i>International Temperature Scale of 1990</i> (Scala Internazionale della Temperatura del 1990)
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i> (Risonanza Plasmonica di Superficie Localizzata)

MEF	<i>Metal Enhanced Fluorescence</i> (Fluorescenza Amplificata da Metalli)
NIR	<i>Near Infrared</i> (Vicino Infrarosso)
NPs	<i>Nanoparticles</i> (Nanoparticelle)
NRS	<i>Normal Raman Scattering</i> (Diffusione Raman Normale)
OD	<i>Optical Density</i> (Assorbanza)
OLEA	<i>Oleic Acid</i> (Acido Oleico)
PAA	<i>Polyacrylic Acid</i> (Acido Poliaccrilico)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reazione a Catena della Polimerasi)
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i> (Spettroscopia a correlazione di Fotoni)
PDI	<i>Polydispersion Index</i> (Indice di Polidispersione)
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i> (Terapia Fotodinamica)
PTAs	<i>Photothermal Agents</i> (Agenti Fototermici)
PTT	<i>Photothermal Therapy</i> (Terapia Fototermica)
PVP	<i>Polyvinylpirrolidone</i> (Polivinilpirrolidone)
RCF	<i>Raw Correlation Function</i> (Funzione di Correlazione Grezza)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Specie Reattive dell'Ossigeno)
RRS	<i>Resonant Raman Scattering</i> (Diffusione Raman Risonante)
SCE	<i>Saturated Calomel Electrode</i> (Elettrodo al Calomelano Saturo)
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i> (Microscopio Elettronico a Scansione)
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> (Spettroscopia Raman Amplificata da Superfici)
SHE	<i>Standard Hydrogen Electrode</i> (Elettrodo Standard a Idrogeno)
SThM	<i>Scanning Thermal Microscopy</i> (Microscopia Termica a Scansione)
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopia Elettronica a Scansione)
TOB	Tetrabutossido di Titanio
TTIP	<i>Titanium Tetraisopropoxide</i> (Tetraisopropossido di Titanio)
TTEAIP	<i>Titanium Triethanolamineisopropoxide</i> (Isopropossido di Titanio Trietanolaminato)
UV	<i>Ultraviolet</i> (Ultravioletto)
UV/Vis	<i>Ultraviolet/Visible</i> (Ultravioletto/Visibile)
XRD	<i>X Ray Diffraction</i> (Diffrazione a Raggi X)

B. Costanti

$h=6.626 \cdot 10^{-34}$ Js	Costante di Planck
$k_B=1.380 \cdot 10^{-23}$ J/K	Costante di Boltzmann
$\epsilon_0=8.9 \cdot 10^{-12}$ C ² /(N*m ²)	Permittività nel vuoto
$\pi=3.142$	

C. Frasi di Pericolo (H)

H225	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H226	Liquido e vapori infiammabili.
H272	Può aggravare un incendio; comburente.
H290	Può essere corrosivo per i metalli.
H302	Nocivo se ingerito.
H311+H331	Tossico per contatto con la pelle. Tossico se inalato
H312+H332	Nocivo per contatto con la pelle. Nocivo se inalato.
H314	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
H315	Provoca irritazione cutanea.
H318	Provoca gravi lesioni oculari.
H319	Provoca grave irritazione oculare.
H331	Tossico se inalato.
H335	Può irritare le vie respiratorie.
H336	Può provocare sonnolenza o vertigini.
H360D	Può nuocere al feto.
H400	Molto tossico per gli organismi acquatici.
H410	Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

D. Consigli di Prudenza (P)

P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare.
P233	Tenere il recipiente ben chiuso.
P240	Mettere a terra e a massa il contenitore e il dispositivo ricevente.
P241	Utilizzare impianti [elettrici/di ventilazione/d'illuminazione/...] a prova di

	esplosione.
P242	Utilizzare utensili antiscintillamento.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P273	Non disperdere nell'ambiente.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.
P301+P312+P330	IN CASO DI INGESTIONE: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/.../in caso di malessere. Sciacquare la bocca.
P302+P352+P312	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/.../ in caso di malessere. Lavare abbondantemente con acqua.
P303+P361+P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): Togliere gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
P304+P340	IN CASO DI INALAZIONE trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
P304+P340+P311	IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/...
P304+P340+P312	IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/...
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI. Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P308+P313	In caso di esposizione o di temuta esposizione, consultare un medico.
P310	Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P332+P313	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

Riferimenti Bibliografici

- [1] L. D. Carlos and F. Palacio, *Thermometry at the Nanoscale: Techniques and Selected Applications*, Royal Society of Chemistry, 2016.
- [2] C. D. S. Brites, P. P. Lima, N. J. O. Silva, A. Millán, V. S. Amaral e F. Palacio, «Thermometry at the nanoscale,» *Nanoscale*, vol. 4, pp. 4799-4829, 2012.
- [3] M. Hartmann, «Minimal length scales for the existence of local temperature,» *Contemporary Physics*, vol. 47, n. 2, pp. 98-102, 2006.
- [4] M. Quintanilla e L. M. Liz-Marzán, «Guiding Rules for Selecting a Nanothermometer,» *Nano Today*, 2018.
- [5] P. R. N. Childs, J. R. Greenwood e C. A. Long, «Review of temperature measurement,» *Review of Scientific Instruments*, vol. 71, n. 8, pp. 2959-2978, 2000.
- [6] H. Preston-Thomas, «The International Temperature Scale of 1990 (ITS-90),» *Metrologia*, vol. 27, pp. 3-10, 1990.
- [7] D. Newell e E. Tiesinga, *The International System of Units (SI)*, Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology, 2019.
- [8] J. Zhou, B. del Rosal, D. Jacque, U. S. e D. Jin, «Advances and challenges for fluorescence nanothermometry,» *Natural Methods*, n. 17, pp. 967-980, 2020.
- [9] K. Havens e E. Sharp, *Thermal Imaging Techniques to Survey and Monitor Animals in the Wild: A Methodology*, Elsevier Inc., 2016.
- [10] J. Christofferson, K. Maize, Y. Ezzahri, J. Shabani, X. Wang e A. Shakouri, «Microscale and Nanoscale Thermal Characterization Techniques,» *Journal of Electronic Packaging*, n. 130, 2008.
- [11] R. R. Jones, D. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson e V. Valev, «Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers,» *Nanoscale Research Letters*, n. 14, 2019.
- [12] D. Wolverson, «Raman spectroscopy,» in *Characterization of Semiconductor Heterostructures and Nanostructures*, Elsevier B.V., 2008, pp. 249-288.
- [13] V. Zani, «Design and Investigation of Raman based Nanothermometers,» Padova, 2019.
- [14] T. Pretto, «Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle di anatasio per la nanotermometria Raman,» Padova, 2022.
- [15] D. Long, *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules.*, John Wiley & Sons Ltd, 2002.
- [16] D. Tuschel, «Raman Spectroscopy and Polymorphism,» *Spectroscopy*, vol. 34, n. 3, pp. 10-21, 2019.
- [17] L. Lin, X. Bi, Y. Gu, F. Wang e J. Ye, «Surface-enhanced Raman scattering nanotags for bioimaging,» *Journal of Applied Physics*, n. 129, 2021.
- [18] T. Dey, «Microplastic pollutant detection by Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): a mini-review,» *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 2022.
- [19] T. E. Beechem e J. E. Serrano, «Raman Thermometry of Microdevices: Choosing a Method to Minimize Error,» *Spectroscopy*, vol. 26, n. 11, pp. 36-44, 2011.
- [20] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. Dasari e M. Feld, «Surface-enhanced Raman scattering and biophysics,» *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 14, n. 18, 2002.
- [21] R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati e L. Fabris, «A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering,» *Biosensors*, vol. 9, n. 57, 2019.

- [22] V. Zani, D. Pedron, R. Pilot e R. Signorini, «Contactless Temperature Sensing at the Microscale Based on Titanium Dioxide Raman Thermometry,» *biosensors*, vol. 11, n. 102, 2021.
- [23] B. Kip e R. Meier, «Determination of the Local Temperature at a Sample during Raman Experiments Using Stokes and Anti-Stokes Raman Bands,» *Applied Spectroscopy*, vol. 44, n. 4, pp. 707-711, 1990.
- [24] P. Gao, H. Wang e Y. Cheng, «Strategies for efficient photothermal therapy at mild temperatures: Progresses and challenges,» *Chinese Chemical Letters*, n. 33, pp. 575-586, 2022.
- [25] M. a. N. Technologies, *Nanomaterials for Magnetic and Optical Hyperthermia Applications*, Fratila, R.M.; De La Fuente, J. M., 2019.
- [26] T. Bai e N. Gu, «Micro/Nanoscale Thermometry for Cellular Thermal Sensing,» *Small*, vol. 12, n. 34, pp. 4590-4610, 2016.
- [27] L. Shang, K. Nienhaus e G. U. Nienhaus, «Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters,» *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 12, n. 5, 2014.
- [28] M. B. Gawande, A. Goswami, T. Asefa, H. B. A. V. Guo, D. L. Peng, R. Zboril e R. S. Varma, «Core-shell nanoparticles: synthesis and applications in catalysis and electrocatalysis,» *Chemical Society Reviews*, vol. 44, n. 21, p. 7431-7920, 2015.
- [29] R. G. Chaudhuri e S. Paria, «Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications,» *Chemical Reviews*, vol. 112, p. 2373-2433, 2012.
- [30] E. Omanović-Miklićanin, A. Badnjević, A. Kazlagić e M. Hajlovac, «Nanocomposites: a brief review,» *Health and Technology*, n. 10, pp. 51-59, 2020.
- [31] H. Li, Y. He, Z. Liu, B. Jiang e Y. Huang, «Rapid synthesis of broadband Ag@TiO₂ core-shell nanoparticles for solar energy conversion,» *Solar Energy Materials & Solar Cells*, n. 166, pp. 52-60, 2017.
- [32] Z. Dang, S. You, J. Zha, H. Song e S. Li, «Effect of shell-layer thickness on dielectric properties in Ag@TiO₂ core@shell nanoparticles filled ferroelectric poly(vinylidene fluoride) composites,» *Physica Status Solidi A*, vol. 207, n. 3, p. 739-742, 2010.
- [33] J. Yguerabide e E. Yguerabide, «Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications,» *Analytical Biochemistry*, n. 262, p. 137-156, 1998.
- [34] K. Dhanalekshimi, K. Meena e I. Ramesh, «Synthesis and Characterization of Ag@TiO₂ Core-Shell Nanoparticles and Study of its Antibacterial Activity,» *International Journal of Nanotechnology and Application*, 2013.
- [35] R. Tom, A. Nair, N. Singh e M. Aslam, «Freely Dispersible Au@TiO₂, Au@ZrO₂, Ag@TiO₂, and Ag@ZrO₂ Core-Shell Nanoparticles: One-Step Synthesis, Characterization, Spectroscopy, and Optical Limiting Properties,» *Langmuir*, n. 19, pp. 3439-3445, 2003.
- [36] I. Tunc, M. Bruns, H. Gliemann, M. Grunzea e P. Koelsch, «Bandgap determination and charge separation in Ag@TiO₂ core shell nanoparticle films,» *Surface and Interface Analysis*, n. 42, pp. 835-841, 2010.
- [37] X. Nie, S. Zhuo, G. Maeng e K. Sohlberg, «Doping of TiO₂ Polymorphs for Altered Optical and Photocatalytic Properties,» *International Journal of Photoenergy*, 2009.
- [38] D. Banerjee e S. Das, «Study of the role of metal core on the thermal behavior of Ag@TiO₂ core-shell nanoparticles,» *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, n. 300, p. 99-105, 2014.
- [39] H. Liu, Y. Hsu, H. Su, R. Huang, F. Hou, G. Tu e W. Liu, «A Comparative Study of Amorphous, Anatase, Rutile, and Mixed Phase TiO₂ Films by Mist Chemical Vapor Deposition and Ultraviolet Photodetectors Applications,» *IEEE Sensor Journal*, vol. 18, n. 10, pp. 4022-4029, 2018.
- [40] A. Khanna e V. Shetty, «Solar light induced photocatalytic degradation of Reactive Blue 220 (RB-220) dye with highly efficient Ag@TiO₂ core-shell nanoparticles: A comparison with UV photocatalysis,» *Solar Energy*, n. 99, pp. 67-76, 2014.
- [41] D. Nithyadevi, P. Kumar, D. Mangalaraj, N. Ponpandian, C. Viswanathan e P. Meena, «Improved microbial growth inhibition activity of bio-surfactant induced Ag-TiO₂core shell nanoparticles,» *Applied Surface Science*, n. 327, pp. 504-516, 2015.
- [42] D. Tuschel, «Raman Thermometry: Understanding the Mathematics to Better Design Raman

- Measurements,» *Spectroscopy*, vol. 34, n. 12, pp. 8-13, 2019.
- [43] H. Chuang e D. Chen, «Fabrication and photocatalytic activities in visible and UV light regions of Ag@TiO₂ and NiAg@TiO₂ nanoparticles,» *Nanotechnology*, n. 20, 2009.
- [44] M. Abdulla-Al-Mamun, Y. Kusumoto, T. Zannat e M. Islam, «Synergistic cell-killing by photocatalytic and plasmonic photothermal effects of Ag@TiO₂ core-shell composite nanoclusters against human epithelial carcinoma (HeLa) cells,» *Applied Catalysis A: General*, n. 398, pp. 134-142, 2011.
- [45] A. Demirörs, A. van Blaaderen e A. Imhof, «A General Method to Coat Colloidal Particles with Titania,» *Langmuir*, vol. 26, n. 12, pp. 9297-9303, 2010.
- [46] X. Yang, H. Fu, K. Wong, X. Jiang e A. Yu, «Hybrid Ag@TiO₂ core-shell nanostructures with highly enhanced photocatalytic performance,» *Nanotechnology*, n. 24, 2013.
- [47] D. Afanasyev, N. Ibrayev, T. Serikov e A. Zeinidenov, «Effect of the Titanium Dioxide Shell on the Plasmon Properties of Silver Nanoparticles,» *Russian Journal of Physical Chemistry A*, vol. 90, n. 4, p. 833-837, 2016.
- [48] B. Bartosewicz, M. Michalska-Domańska, M. Liszewska, D. Zasada e B. Jankiewicz, «Synthesis and characterization of noble metal-titania core-shell nanostructures with tunable shell thickness,» *Beilstein Journal of Nanotechnology*, n. 8, pp. 2083-2093, 2017.
- [49] L. Zhang, D. Xia e Q. Shen, «Synthesis and characterization of Ag@TiO₂ core-shell nanoparticles and TiO₂ nanobubbles,» *Journal of Nanoparticle Research*, n. 8, pp. 23-28, 2006.
- [50] P. Wang, D. Wang, T. Xie, H. Li, M. Yang e X. Wei, «Preparation of monodisperse Ag/Anatase TiO₂ core-shell nanoparticles,» *Materials Chemistry and Physics*, n. 109, pp. 108-183, 2008.
- [51] I. Pastoriza-Santos, D. Koktysh, A. Mamedov, M. Giersig, N. Kotov e L. Liz-Marzán, «One-Pot Synthesis of Ag@TiO₂ Core-Shell Nanoparticles and Their Layer-by-Layer Assembly,» *Langmuir*, n. 16, pp. 2731-2735, 2000.
- [52] P. Nbelayim, G. Kawamura, M. Abdel-Galeil, W. Tan, X. Wei, H. Muto e A. Matsuda, «Effects of multi-sized and -shaped Ag@TiO₂ nanoparticles on the performance of plasmonic dye-sensitized solar cells,» *Journal of the Ceramic Society of Japan*, vol. 126, n. 3, pp. 139-151, 2018.
- [53] H. Li, Y. He, Z. Liu, B. Jiang e Y. Huang, «A flexible thin-film membrane with broadband Ag@TiO₂ nanoparticle for high-efficiency solar evaporation enhancement,» *Energy*, n. 139, pp. 210-219, 2017.
- [54] T. Hirakawa e P. Kamat, «Photoinduced Electron Storage and Surface Plasmon Modulation in Ag@TiO₂ Clusters,» *Langmuir*, vol. 20, n. 14, pp. 5645-5647, 2004.
- [55] T. Hirakawa e P. Kamat, «Charge Separation and Catalytic Activity of Ag@TiO₂ Core-Shell Composite Clusters under UV-Irradiation,» *Journal of the American Chemical Society*, n. 127, pp. 3928-3934, 2005.
- [56] A. Khanna e K. Shetty, «Solar photocatalysis for treatment of Acid Yellow-17 (AY-17) dye contaminated water using Ag@TiO₂ core-shell structured nanoparticles,» *Environmental Science and Pollution Research*, n. 20, p. 5692-5707, 2013.
- [57] H. Sakai, T. Kanda, H. Shibata, T. Ohkubo e M. Abe, «Preparation of Highly Dispersed Core/Shell-type Titania Nanocapsules Containing a Single Ag Nanoparticle,» *Journal of the American Chemical Society*, n. 128, pp. 4944-4945, 2006.
- [58] W. Wang, J. Zhang, F. Chen, D. He e M. Anpo, «Preparation and photocatalytic properties of Fe³⁺-doped Ag@TiO₂ core-shell nanoparticles,» *Journal of Colloid and Interface Science*, n. 323, p. 182-186, 2008.
- [59] S. Angkaew e P. Limsuwan, «Preparation of silver-titanium dioxide core-shell (Ag@TiO₂) nanoparticles: Effect of Ti-Ag mole ratio,» *Procedia Engineering*, n. 32, p. 649 - 655, 2012.
- [60] Y. Lin, W. Qiqiang, Z. Xiaoming, W. Zhouping, X. Wenshui e D. Yuming, «Synthesis of Ag/TiO₂ Core/Shell Nanoparticles with Antibacterial Properties,» *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 32, n. 8, pp. 2607-2610, 2011.
- [61] F. Forato, S. Talebzadeh, N. Rousseau, J. Mevellec, B. Bujoli, D. Knight, C. Queffélec e B. Humbert, «Functionalized core-shell Ag@TiO₂ nanoparticles for enhanced Raman spectroscopy : a sensitive detection method for Cu(II) ions,» *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019.

- [62] J. Qi, X. Dang, P. Hammond e A. Belcher, «Highly Efficient Plasmon-Enhanced Dye-Sensitized Solar Cells through Metal@Oxide Core-Shell Nanostructure,» *American Chemical Society Nano*, vol. 5, n. 9, pp. 7108-7116, 2011.
- [63] A. Kumbhar e G. Chumanov, «Synthesis and Characterization of Titania-Coated Silver Nanoparticles,» *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 4, n. 3, pp. 299-303, 2004.
- [64] D. Hong, L. M. Lyu, K. Koga, Y. Shimoyama e Y. Kon, «Plasmonic Ag@TiO₂ Core-Shell Nanoparticles for Enhanced CO₂ Photoconversion to CH₄,» *ACS Sustainable Chemistry&Engineering*, vol. 7, n. 18955–18964, 2019.
- [65] Y. Rao, D. Banerjee, A. Datta, S. Das, R. Guin e A. Saha, «Gamma irradiation route to synthesis of highly re-dispersible natural polymer capped silver nanoparticles,» *Radiation Physics and Chemistry*, n. 79, pp. 1240-1246, 2010.
- [66] M. Ebrahimi, A. Zakery, M. Karimipour e M. Molaei, «Nonlinear optical properties and optical limiting measurements of graphene oxide e Ag@TiO₂ compounds,» *Optical Materials*, n. 57, pp. 146-152, 2016.
- [67] M. Karimipour, M. Ebrahimi, Z. Abafat e M. Molaei, «Synthesis of Ag@TiO₂ core-shells using a rapid microwave irradiation and study of their nonlinear optical properties,» *Optical Materials*, n. 57, pp. 257-263, 2016.
- [68] A. Pal, S. Shah e S. Devi, «Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using ethanol as a reducing agent,» *Materials Chemistry and Physics*, n. 114, pp. 530-532, 2009.
- [69] D. Zhang, X. Song, R. Zhang, M. Zhang e F. Liu, «Preparation and Characterization of Ag@TiO₂ Core-Shell Nanoparticles in Water-in-Oil Emulsions,» *European Journal of Inorganic Chemistry*, pp. 1643-1648, 2005.
- [70] S. Vaidya, A. Patra e A. Ganguli, «Core-shell nanostructures and nanocomposites of Ag@TiO₂: effect of capping agent and shell thickness on the optical properties,» *Journal of Nanoparticle Research*, n. 12, p. 1033–1044, 2010.
- [71] J. Turkevich, P. Stevenson e J. Hillier, «A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold,» *Discussions of the Faraday Society*, vol. 11, pp. 55-75, 1951.
- [72] P. Lee e D. Meisel, «Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols,» *Journal of Physical Chemistry*, n. 86, pp. 3391-3395, 1982.
- [73] I. Pastoriza-Santos e L. Liz-Marzán, «Formation and Stabilization of Silver Nanoparticles through Reduction by N,N-Dimethylformamide,» *Langmuir*, n. 15, pp. 948-951, 1999.
- [74] I. Pastoriza-Santos e L. M. Liz-Marzán, «Reduction of silver nanoparticles in DMF. Formation of monolayers and stable colloids,» *Pure Applied Chemistry*, vol. 72, n. 1-2, pp. 83-90, 2000.
- [75] M. Picollo, M. Aceto e T. Vitorino, «UV-Vis spectroscopy,» *Physical Sciences Reviews*, 2018.
- [76] J. Stetefeld, S. A. McKenna e T. Patel, «Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences,» *Biophysical Reviews*, vol. 8, n. 4, pp. 409-427, 2016.
- [77] Malvern Solutions: Advanced technology made simple, «ZETASIZER NANO Series».
- [78] M. Scimeca, S. Bischetti, H. K. Lamsira, R. Bonfiglio e E. Bonanno, «Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis,» *European Journal of Histochemistry*, vol. 62, n. 1, 2018.
- [79] E. S. Ameh, «A review of basic crystallography and x-ray diffraction applications,» *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 105, n. 3, pp. 3289-3302, 2019.
- [80] S. Baskaran, «Structure and Regulation of Yeast Glycogen Synthase,» Berkeley, 2010.
- [81] M. Tamer, «Quantitative Phase Analysis Based on Rietveld Structure Refinement for Carbonate Rocks,» *Journal of Modern Physics*, vol. 4, n. 8, 2013.
- [82] L. E. Franken, K. Grünewald, E. J. Boekema e M. C. A. Stuart, «A Technical Introduction to Transmission Electron Microscopy for Soft-Matter: Imaging, Possibilities, Choices, and Technical Developments,» *Small*, n. 16, 2020.
- [83] W. Wan, J. Su, X. D. Zou e T. Willhammar, «Transmission electron microscopy as an important tool for characterization of zeolite structures,» *Inorganic Chemistry Frontiers*, n. 5, pp. 2836-2855, 2018.

- [84] E. Meneghin, D. Pedron e E. Collini, «Spectroscopy data for the time and frequency characterization of vibrational coherences in bacteriochlorophyll a,» *Data in brief*, n. 23, 2019.
- [85] A. Esteves, E. Ferreira e M. Medeiros, «Selective radical cyclisation of propargyl bromoethers to tetrahydrofuran derivatives via electrogenerated nickel(I) tetramethylcyclam,» *Tetrahedron*, vol. 63, n. 14, pp. 3006-3009, 2007.
- [86] A. Van Hoonacker e P. Englebienne, «Revisiting Silver Nanoparticle Chemical Synthesis and Stability by Optical Spectroscopy,» *Current Nanoscience*, n. 2, pp. 359-371, 2006.
- [87] J. Dahl, B. Maddux e J. Hutchison, «Toward Greener Nanosynthesis,» *Chemical Reviews*, n. 107, pp. 2228-2269, 2007.
- [88] N. Joshi, N. Jain, A. Pathak, J. Singh, R. Prasad e C. Upadhyaya, «Biosynthesis of silver nanoparticles using *Carissa carandas* berries and its potential antibacterial activities,» *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, n. 86, pp. 682-689, 2018.
- [89] T. Pretto, M. Franca, V. Zani, S. Gross, D. Pedron, R. Pilot e R. Signorini, «Anatase Nanoparticles for Raman Nanothermometry,» 2023.
- [90] R. Pasquarelli, D. Ginley e R. O'Hayrea, «Solution processing of transparent conductors: from flask to film,» *Chemical Society Reviews*, n. 40, p. 5406-5441, 2011.
- [91] M. Lin, H. Jiao, X. Wei e X. Yang, «Two Zn(II) Coordination Polymers: Luminescent Sensing Property and Treatment Activity on Uterine Leiomyomas by Reducing TGF- β Releasing and mmp-3 and mmp-7 Expression,» *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, n. 31, p. 2831-2841, 2021.
- [92] S. Yordanov e A. I. R. Bachvarova-Nedelcheva, «Influence of ethylene glycol on the hydrolysis-condensation behavior of Ti(IV) butoxide,» *Bulgarian Chemical Communications*, vol. 49, pp. 265-270, 2017.
- [93] W. Lee, J. Yeop, J. Heo, Y. J. Yoon, S. Park, J. Jeong, Y. Shin, J. Kim, N. An, D. Kim, J. Park e J. Kim, «High colloidal stability ZnO nanoparticles independent on solvent polarity and their application in polymer solar cells,» *Scientific Report*, 2020.
- [94] A. Rokade, S. Rondiya, A. Date, V. Sharma, M. Prasad, H. Pathan e S. Jadkar, «Electrochemical synthesis of core-shell ZnO/CdS nanostructure for photocatalytic water splitting application,» *Energy Procedia*, n. 110, pp. 121-127, 2017.
- [95] I. Bell, E. Mickoleit, C. Hsieh, S. Lin, J. Vrabec, C. Breitenkopf e A. Jäger, «A Benchmark Open-Source Implementation of COSMO-SAC,» *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 16, n. 4, pp. 2635-2646, 2020.
- [96] R. Mohan, J. Drbohlavova e J. Hubalek, «Water-dispersible TiO₂ nanoparticles via a biphasic solvothermal reaction method,» *Nanoscale Research Letters*, vol. 8, n. 503, 2013.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare innanzitutto la professoressa Raffaella Signorini per avermi accolto all'interno del gruppo di ricerca *Laser Spectroscopy and Nanophotonics* (LaSpeN) e avermi guidato con pazienza alla scoperta della spettroscopia Raman. Il suo aiuto si è rivelato essere più volte fondamentale sia per le caratterizzazioni delle sintesi che durante la revisione della tesi. Ringrazio inoltre la professoressa Silvia Gross per aver messo a disposizione i suoi laboratori senza cui non sarebbe stato possibile portare a termine le sintesi eseguite. Ringrazio il professore Danilo Pedron per aver messo a disposizione la strumentazione Raman al terzo piano del Centro Interchimico e il termostato. Ringrazio il professore Gian Andrea Rizzi che ha dato preziosi consigli e spunti per l'interpretazione dei dati sperimentali. Un sentito ringraziamento a tutte le persone dei gruppi di ricerca LaSpeN, AK Colloidi e non solo che ho avuto modo di conoscere durante il mio internato di tesi, in particolare alle dottorande Veronica Zani e Marina Franca che mi hanno guidato e aiutato con pazienza, trasmettendomi la loro passione per la ricerca.

Un doveroso ringraziamento alla mia famiglia e ai miei parenti che mi hanno sempre sostenuto, sia nei momenti di gioia che di difficoltà. Grazie di cuore a tutti gli amici che ho incontrato finora e che hanno condiviso con me una parte importante del loro percorso. Un grazie speciale soprattutto, non in ordine di importanza, a Cinzia, Christian, Tommaso, Nicola, Stefano, Anna, Sharon, Nicolò, Niccolò, Danny, Ihssane, Matteo, Michele, Christian, Cristiano, Daniele, Denise, Veritas e Alessandro. Senza di voi non sarei riuscito ad arrivare a questo importante traguardo. Grazie, infine, al Coro Anch'Io, una seconda famiglia che è stata per me luogo di rifugio e di tranquillità dopo giornate stancanti.