

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



**Sintesi chimica e biogenica di nanoparticelle di argento e oro e studio della relativa citotossicità.**

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

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

Controrelatore: Prof. Emanuele Papini  
Dipartimento di Biologia (DiBio)

Laureanda: Martina Leoncini

Anno Accademico 2022/2023







# SOMMARIO

<b>LISTA DEGLI ACRONIMI</b>	<b>3</b>
<b>1. Introduzione e obiettivi della Tesi</b>	<b>5</b>
1.1. Articolazione della Tesi	8
<b>2. Nanoparticelle d'argento e d'oro</b>	<b>9</b>
2.1. Proprietà chimico-fisiche	9
2.2. Applicazioni	14
<b>3. Approcci di sintesi</b>	<b>21</b>
3.1. Riduzione chimica	23
3.2. Riduzione per via biogenica	26
3.2.1. Uso del tè nero come agente riducente	26
<b>4. Valutazione della citotossicità</b>	<b>29</b>
4.1. Descrizione delle cellule utilizzate	30
4.2. Saggi di citotossicità in colture 2D	31
4.2.1. Alterazione della morfologia	32
4.2.2. Saggio di proliferazione cellulare MTS	33
<b>5. Risultati e discussione</b>	<b>35</b>
5.1. Nanoparticelle d'argento	35
5.1.1. Riduzione chimica	36
5.1.2. Riduzione biogenica	43
5.1.3. Confronto delle nanoparticelle ottenute	55
5.2. Nanoparticelle d'oro	59
5.2.1. Riduzione chimica	59
5.2.2. Riduzione biogenica	64
5.2.3. Confronto delle nanoparticelle ottenute	71
5.3. Citotossicità delle nanoparticelle	76

5.3.1.	Nanoparticelle d'argento	76
5.3.1.1.	Risultati e discussione	76
5.3.1.2.	Confronto fra sintesi per via chimica e biogenica	79
5.3.2.	Nanoparticelle d'oro	80
5.3.2.1.	Risultati e discussione	80
5.3.2.2.	Confronto fra sintesi per via chimica e biogenica	83
<b>6.</b>	<b>Caratterizzazione delle nanoparticelle</b>	<b>85</b>
6.1.	Spettroscopia UV-Vis	85
6.2.	Diffusione dinamica della luce (DLS)	86
6.3.	Potenziale $\zeta$	87
6.4.	Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	87
<b>7.</b>	<b>Procedure sperimentali</b>	<b>89</b>
7.1.	Reagenti e materiali	89
7.2.	Sintesi nanoparticelle d'argento	90
7.2.1.	Sintesi Lee-Meisel	90
7.2.2.	Sintesi biogenica	90
7.3.	Sintesi nanoparticelle d'oro	91
7.3.1.	Sintesi Turkevich	91
7.3.2.	Sintesi biogenica	92
7.4.	Analisi citotossicità delle nanoparticelle	92
<b>8.</b>	<b>Conclusioni e prospettive future</b>	<b>95</b>
8.1.	Prospettive future	97
<b>9.</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>99</b>
	<b>Ringraziamenti</b>	<b>109</b>

# LISTA DEGLI ACRONIMI

CT = Computed Tomography

DLS = Dynamic Light Scattering

DOX = Doxorubicin

EPR = Enhanced Permeability and Retention

FBS = Fetal Bovine Serum

IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry

LSP = Localized Surface Plasmon

LSPR = Localized Surface Plasmon Resonance

NPs = Nanoparticles

PDI = Polydispersity Index

PMS = Phenazine Methosulphate

PVP = Polyvinylpyrrolidone

ROS = Reactive Oxygen Species

RT = Room Temperature

SERS = Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

SPR = Surface Plasmon Resonance

REM = Electromagnetic Radiation

TEM = Transmission Electron Microscopy





# Capitolo 1

## 1. Introduzione e obiettivi della Tesi

I nanomateriali si sono affermati come un'interessante classe di materiali molto richiesti per numerose applicazioni.[1]

Il concetto di nanometro fu proposto per la prima volta da Richard Zsigmondy, nel 1914, con lo scopo di definire le dimensioni delle particelle colloidali.[1][2] La Commissione Europea definisce le nanoparticelle come particelle le cui dimensioni sono comprese tra 1 e 100 nm.[3][4]

A livello nanometrico le proprietà della materia sono sostanzialmente diverse rispetto a quelle dei materiali massivi definiti “*bulk*” e gli effetti dimensionali diventano più evidenti.[1] Le ragioni di queste differenze sono due: la prima riguarda il maggiore rapporto area superficiale/volume dei nanomateriali che li rende chimicamente più reattivi, mentre la seconda riguarda gli effetti quantistici che possono influenzare il comportamento ottico, elettrico e magnetico.[5]

Le “Nanoscienze”, rappresentano la branca della scienza che comprende tutti gli approcci di ricerca aventi come oggetto di studio i fenomeni e la manipolazione di materiali su scala atomica e molecolare, dove le proprietà differiscono da quelle osservate su scale maggiori.[5][6]

In quest'ambito sono molto studiate le nanoparticelle metalliche, in particolare le nanoparticelle d'argento (Ag NPs) e le nanoparticelle d'oro (Au NPs), la cui commercializzazione è in via di sviluppo poiché alcune loro proprietà sono tuttora in discussione, principalmente per quanto riguarda eventuali effetti a lungo termine sulla salute e sull'ambiente.[7]

L'argento e l'oro, metalli nobili, sono stati oggetto d'interesse fin dai tempi più antichi, come dimostrano loro vari impieghi nel corso della storia: dalle applicazioni in ambito artistico, al valore economico come valute monetarie, fino a quelle ornamentali in differenti prodotti.[7] Oggi trovano ampio spazio anche in ambito scientifico e tecnologico in svariati settori, quali il biomedico, l'agroalimentare e il tessile, proprio in virtù di alcune proprietà specifiche, ad

esempio la risonanza plasmonica di superficie (SPR) o le proprietà antibatteriche.[7][8]

Dal punto di vista clinico, l'uso di queste NPs in ambito biomedico è motivato principalmente dall'elevato rapporto area superficiale/volume, che assume un ruolo rilevante nell'interazione con le cellule.[9] Inoltre, le caratteristiche uniche delle nanostrutture di metalli nobili, in termini di proprietà ottiche, fisiche, elettroniche, catalitiche, facilità di sintesi e possibilità di essere funzionalizzate, forniscono un'importante dimensione aggiuntiva nella biodiagnostica, negli studi biofisici, nel *biosensing* e nella terapia medica.[9][10][11]

E' stato dimostrato che le Ag NPs, soprattutto quelle con dimensioni inferiori a 20 nm, hanno la capacità di penetrare le pareti cellulari dei batteri alterandone le funzioni metaboliche e causandone la morte cellulare; inoltre il rilascio di ioni  $Ag^+$  aumenterebbe la permeabilità della membrana, la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'alterazione della replicazione del DNA.[11][12] Per questo vengono principalmente usate come antibatterici in numerosi prodotti. Le Au NPs, invece, sono riconosciute come maggiormente biocompatibili. Entrambi questi tipi di NPs, presentano delle specifiche proprietà ottiche dovute all'effetto di risonanza plasmonica di superficie (SPR), che le rendono particolarmente impiegate come biosensori.[11][12]

Queste loro proprietà dipendono dalle loro dimensioni, superficie e forma che ne determinano il loro impiego nei vari settori industriali. Ad oggi, la sfida più importante per l'utilizzo di queste proprietà è il perfezionamento di strategie sintetiche che permettano un preciso controllo delle dimensioni e della forma e che consentano la loro implementazione su larga scala per un loro eventuale sfruttamento commerciale.[11]

In generale, gli approcci di sintesi di nanomateriali sono suddivisi in due grandi categorie: *top-down* e *bottom-up*. Il primo parte da materiali *bulk* poi ridotti a particelle di dimensioni nanometriche; il secondo sfrutta processi di autoassemblaggio di atomi, ioni, molecole o cluster a formare entità di dimensioni più grandi, le NPs. Per quanto concerne le NPs metalliche, tra gli approcci *bottom-up* si annoverano varie procedure di sintesi tra cui la riduzione chimica e la riduzione biogenica.[10] I metodi chimici o biologici in soluzione, conosciuti anche come approcci di *wet chemistry*, sono tra i più promettenti poiché risultano i più

economici e richiedono minor consumo di energia in quanto svolti a temperature e pressioni relativamente basse.[13]

Il minor consumo di energia, come la riduzione dell'utilizzo di sostanze chimiche pericolose, rappresentano infatti due dei dodici principi della *Green Chemistry* introdotti nel 1998 da Paul Anastas e John Warner per rendere sia i prodotti che i processi più ecosostenibili e meno tossici sia per l'uomo che per l'ambiente.[14]

La sintesi biogenica contempla questi principi, ed infatti, oltre agli aspetti precedentemente osservati, utilizza i composti organici presenti in estratti di piante, funghi, batteri alghe o altre molecole di derivazione biogenica come agenti riducenti e stabilizzanti.[15]

Questo lavoro di Tesi si propone di sintetizzare nanoparticelle di Ag e Au per riduzione chimica e per riduzione biogenica, confrontando i due approcci sintetici attraverso la caratterizzazione dei prodotti (Ag e Au NPs). La sintesi chimica è stata effettuata seguendo due protocolli noti, il Lee-Meisel [16] ed il Turkevich, [17] rispettivamente per le Ag e Au NPs. Riguardo la sintesi biogenica, è stato scelto l'infuso di tè nero come agente biogenico poiché rappresenta una sostanza di facile reperibilità, contenente molecole con attività antiossidante, antibatterica e antivirale come i flavonoidi.[18][19]

Particolare interesse è rivolto, come già detto in precedenza, all'ottenimento di un protocollo riproducibile al fine di garantire un controllo su composizione, dimensioni e forma delle NPs poiché proprio queste caratteristiche influenzano le proprietà del nanomateriale ed anche gli effetti sulla salute umana e sull'ambiente. Per garantire la sicurezza del loro uso e il dosaggio appropriato, risulta necessario stabilire una correlazione tra queste caratteristiche e la potenziale tossicità delle NPs. Questo lavoro di Tesi contempla, infatti, un'ulteriore parte riguardante la valutazione della tossicità in vitro dei nanomateriali ottenuti, in particolare della loro citotossicità, al fine di contribuire a una loro futura applicazione in ambito medico.

## 1.1. Articolazione della Tesi

Il presente lavoro è articolato in otto capitoli. Il primo Capitolo riguarda l'introduzione al progetto di tesi e gli obiettivi annessi. Il Capitolo 2 presenta le nanoparticelle d'argento e d'oro, descrivendo le loro proprietà chimico-fisiche e le loro applicazioni. Nel Capitolo 3 vengono descritti gli approcci di sintesi utilizzati per la formazione delle NPs d'interesse. Il Capitolo 4 riguarda la valutazione della citotossicità attraverso l'osservazione dei cambiamenti morfologici e la valutazione di saggi di vitalità cellulare MTS. Nel Capitolo 5 vengono presentati e discussi i risultati sperimentali. Il Capitolo 6 presenta e descrive le tecniche di caratterizzazione utilizzate. Nel Capitolo 7 vengono descritte le procedure sperimentali e riportati i relativi dettagli e condizioni di sintesi. Nell'ultimo Capitolo, l'ottavo, sono presentate le conclusioni tratte dal presente lavoro e le prospettive future.

# Capitolo 2

## 2. Nanoparticelle d'argento e d'oro

### 2.1. Proprietà chimico-fisiche

L'argento (Ag) è il quarantasettesimo elemento presente nella tavola periodica degli elementi; si tratta di un metallo di transizione appartenente al gruppo 11, caratteristico dei metalli preziosi. In natura si presenta come metallo dal colore grigio lucente, molto spesso in combinazione con zolfo, cloro, arsenico o presente in minerali contenenti rame, piombo, zinco e oro.[7] L'argento ha punto di fusione e di ebollizione rispettivamente di 961,78 °C e di 2162 °C, ed è un metallo altamente malleabile e duttile; in forma pura è il metallo con conducibilità elettrica e termica migliore di tutti gli altri metalli.[7]

L'oro (Au) è il settantanovesimo elemento presente nella tavola periodica; si tratta di un metallo di transizione tenero, di colore giallo nel suo stato *bulk* appartenente anch'esso al gruppo 11. È il metallo con proprietà di duttilità e di malleabilità più elevate rispetto a tutti gli altri metalli. Presenta una buona conduttività sia elettrica che termica e la sua forma cristallina è cubica. L'oro puro e molte leghe d'oro presentano proprietà diamagnetiche.[20] Entrambi i metalli sono chimicamente inerti sia in acqua che in aria, in quanto metalli nobili non reagiscono con l'ossigeno e presentano un'elevata stabilità e resistenza alla corrosione. Nello specifico, l'argento è altamente sensibile ai composti solforati con i quali reagisce producendo ioni  $\text{Ag}^+$  altamente reattivi mentre l'oro si scioglie sia in presenza di acido selenico che di *acqua regia* ottenuta dalla combinazione di acido cloridrico e acido nitrico è in grado di sciogliere questo metallo.[7][20]

Sebbene l'oro sia universalmente riconosciuto come biocompatibile e l'argento come un materiale poco tossico per l'uomo (a basse dosi), il comportamento delle Ag e Au NPs è notevolmente differente da quello dei materiali "*bulk*" finora descritti.[8]

Le caratteristiche chimico-fisiche delle NPs, come le dimensioni, la forma e il rapporto superficie/volume ne influenzano le loro proprietà, come quelle ottiche, elettroniche, catalitiche e biologiche. Queste proprietà possono essere sfruttate in tutte quelle aree dove i materiali *bulk* non presentano prestazioni e proprietà confrontabili.[7][21]

Conosciuti come metalli massivi fino al secolo scorso, con l'avvento della nanotecnologia, la scoperta delle NPs e lo sfruttamento delle loro proprietà chimico-fisiche, sia l'argento che l'oro sono divenuti un materiale importante per il progresso di questo e di numerosi altri settori.[22]

La nascita della moderna nanotecnologia coincide con la scoperta delle nanoparticelle d'oro (Au NPs) che risale al 1857, data in cui Michael Faraday preparò una sospensione di questo tipo di nanomateriale dal colore rosso scuro.[8]

**Proprietà opto-elettroniche.** Le NPs metalliche sono caratterizzate da proprietà plasmoniche osservabili nello spettro UV-Vis. Un plasmon è definito come un'oscillazione collettiva degli elettroni di conduzione in metalli e materiali conduttori quando vengono eccitati da una radiazione elettromagnetica (REM). Le Ag NPs, in particolare, hanno un'elevata efficienza nell'assorbire e nel disperdere la luce che si traduce in una maggiore efficienza nell'eccitazione plasmonica rispetto agli altri metalli (Au e Cu). La forte interazione dei nanomateriali metallici con la luce è dovuta agli elettroni di conduzione presenti sulla superficie del metallo che subiscono un'oscillazione collettiva in seguito all'interazione con la componente elettrica della REM generando l'effetto di risonanza plasmonica di superficie (SPR).[23][24] (Fig. 1) I fattori che portano a questa oscillazione sono tre: l'accelerazione degli elettroni di conduzione determinata dal campo elettrico della radiazione incidente, la presenza di forze che derivano dalla polarizzazione indotta sia nella NPs che nel mezzo circostante e il confinamento degli elettroni che si verifica quando le dimensioni della NPs sono molto minori della lunghezza d'onda della luce (regime quasi-statico). In tale regime l'oscillazione diviene un fenomeno localizzato e viene pertanto chiamato risonanza plasmonica di superficie (dall'inglese LSPR).[24][25]

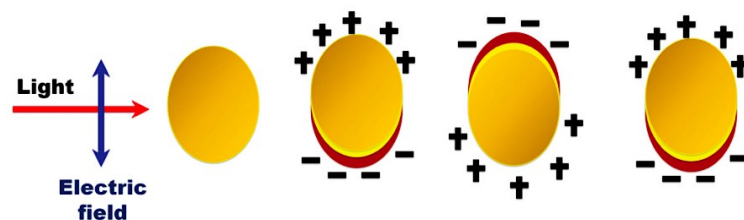


Figura 1: Schema dell' SPR in cui gli elettroni di conduzione nella NP metallica sono portati ad oscillare in seguito all'interazione con una REM.[21]

È possibile modificare la posizione del plasmone su lunghezze d'onda differenti variando il mezzo in cui le NPs sono disperse, a causa di una variazione dell'indice di rifrazione (e quindi della costante dielettrica), ma non solo, lo *shift* e la forma dello spettro SPR possono essere determinati anche dalle dimensioni e dalla forma delle NPs in relazione alla lunghezza d'onda della luce incidente: per NPs più piccole della lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica, il campo elettromagnetico risulta uniforme su tutte le NPs causando un'oscillazione confinata di tutti gli elettroni di conduzione delle NPs che si manifesta con un singolo e stretto picco nello spettro SPR. Generalmente il plasmone relativo alle Ag e Au NPs di forma sferica cade rispettivamente ad una lunghezza d'onda di 350-450 nm e di 500-550 nm nello spettro visibile. La banda plasmonica di superficie è assente nel materiale *bulk* ed anche in Au NPs con dimensioni inferiori a 2 nm. In generale, man mano che aumenta la concentrazione ed anche le dimensioni (entro un certo *range*) delle NPs, si ha un aumento dell'intensità del picco, ma in presenza di dimensioni elevate, aggregati o di NPs di differenti morfologie, il campo elettrico non è più uniforme sulle NPs determinando lo spostamento dell'assorbimento, l'allargamento e la presenza di più picchi nello spettro SPR.[24][23] L'argento è l'unico materiale la cui SPR può essere localizzato su qualsiasi lunghezza d'onda nello spettro visibile: tale spostamento determina le differenti colorazioni che possono assumere le sospensioni di Ag NPs.[21][23] Anche per le Au NPs in soluzione acquosa, il *range* di colori delle sospensioni varia dal marrone, all'arancio fino al rosso-viola.[26][27]

**Proprietà catalitiche.** È stato osservato come le Ag NPs abbiano anche delle eccellenti proprietà catalitiche che dipendono dalla natura delle molecole presenti

sulla superficie.[21] Numerosi sono gli studi volti a definire in modo specifico questo aspetto: nel lavoro di Choudhary et al. si osserva l'efficienza catalitica di Ag NPs biosintetizzate nel ridurre/degradare i contaminanti delle acque reflue delle industrie che includono il 4-nitrofenolo e tre coloranti mutagenici, il blu di metilene, il rosso metile e la rodamina b.[28]

Le proprietà catalitiche delle Au NPs per decenni sono state considerate scarse o assenti. Quest'idea è stata confutata dai lavori (indipendenti tra loro) di Haruta e Hutchings in cui hanno dimostrato l'attività catalitica dell'oro, in particolare riguardo l'ossidazione eterogenea a bassa temperatura del monossido di carbonio (CO). Riguardo questo fenomeno gli autori hanno osservato come le Au NPs nude non fossero attive, ma se associate ad un supporto di ossido metallico come  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostrano eccellenti proprietà catalitiche nei confronti del CO.[29]

**Proprietà biologiche.** È noto in letteratura come i nanomateriali a base di Ag abbiano un'elevata attività antibatterica, ossia presentino un effetto tossico contro i batteri aerobici e anaerobici provocando la precipitazione delle proteine cellulari e bloccando la catena respiratoria.[30]

Gli effetti antibatterici sono dovuti sia alla presenza delle Ag NPs che al loro rilascio di ioni Ag<sup>+</sup>. Riguardo le NPs, l'elevata area superficiale dipendente dalle dimensioni, permette loro di interagire facilmente con le cellule; inoltre, NPs di piccole dimensioni hanno un'ampia superficie di contatto che produce un aumento dell'effetto tossico. Nel caso delle Ag NPs, esse possono legarsi alla membrana cellulare, attraversarla e reagire con proteine e composti contenenti zolfo e solfuro che portano al rilascio di Ag<sup>+</sup> e che causano la morte cellulare tramite l'induzione della formazione di ROS.[7]

La morfologia e l'eventuale *coating* sono altri aspetti che influenzano la tossicità delle NPs nei confronti dei batteri. Ag NPs discoidali presentano proprietà antibatteriche migliori rispetto a quelle con morfologia bastoncellare.[31] Ag NPs presentanti un rivestimento di citrato o polivinilpirrolidone (PVP) mostrano un'alta attività antimicrobica; gli stessi nanomateriali presentanti un *coating* proteico risultano essere più biocompatibili rispetto alle Ag NPs nude.[32] Lo stress ossidativo risulta essere una delle cause principali riguardanti la citotossicità delle Ag NPs: esse provocherebbero lo sbilanciamento tra l'aumentata produzione di



radicali liberi e l'incapacità dell'organismo di "detossificarsi" tramite la formazione di antiossidanti. La formazione dei ROS provoca danni al DNA ed aberrazioni cromosomiche che sono alla base dell'arresto del ciclo cellulare e della conseguente morte cellulare. Questi effetti citotossici, genotossici e antiproliferativi riguardano anche le cellule umane; una chiara dimostrazione è lavoro condotto da Asharani et al. dove viene dimostrato come le Ag NPs inducano la formazione di ROS e successiva morte cellulare.[33]

In fig. 2 sono rappresentati i principali meccanismi di citotossicità delle Ag NPs.

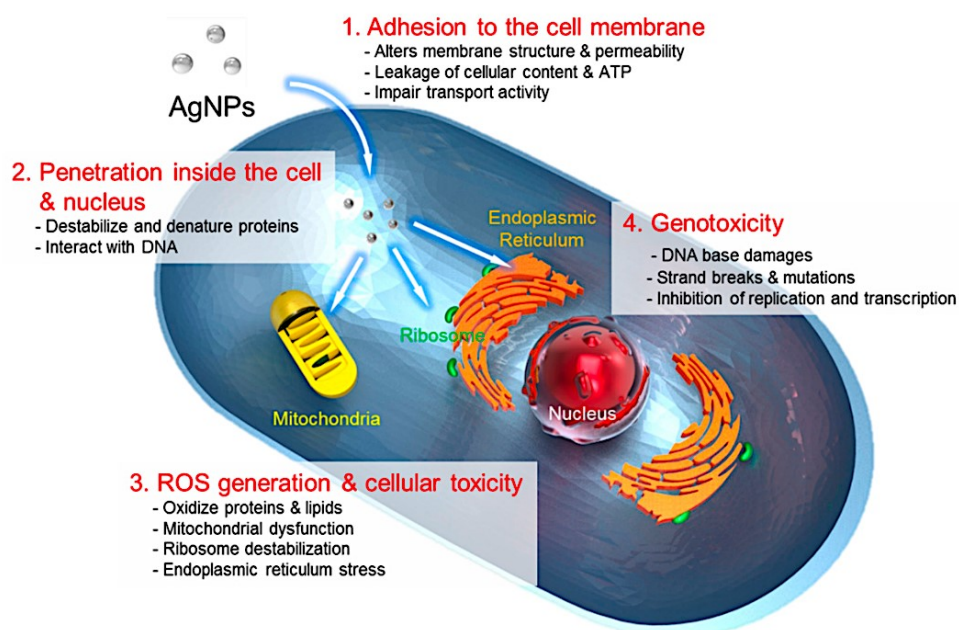


Figura 2: Principali meccanismi di attività citotossica delle Ag NPs.[9]

Contrariamente a quanto osservato per le Ag NPs, le Au NPs mostrano proprietà biologiche molto differenti. Esse sono ampiamente studiate ed utilizzate come coadiuvanti di agenti antibatterici per via della loro stabilità, bassa tossicità, biocompatibilità, elevata area superficiale e facile funzionalizzazione.[26]

È noto come la combinazione delle Au NPs con antibiotici aumenti l'attività antibatterica di quest'ultimi poiché il loro legame alle Au NPs aumenterebbe il loro tempo all'interno del microorganismo rendendo più efficace l'effetto antibatterico.[26] Un esempio è lo studio condotto dal gruppo di ricerca di Lu nel quale si dimostra come l'effetto antibatterico della vancomicina sia aumentato quando legata a Au NPs.[34] In fig. 3 è possibile osservare i meccanismi principali

con i quali le Au NPs, coniugate con antibiotici, esplicano la loro attività antibatterica.

Anche in questo caso, le dimensioni, la morfologia e la funzionalizzazione delle Au NPs ne influenzano questa attività.[26]:[35]

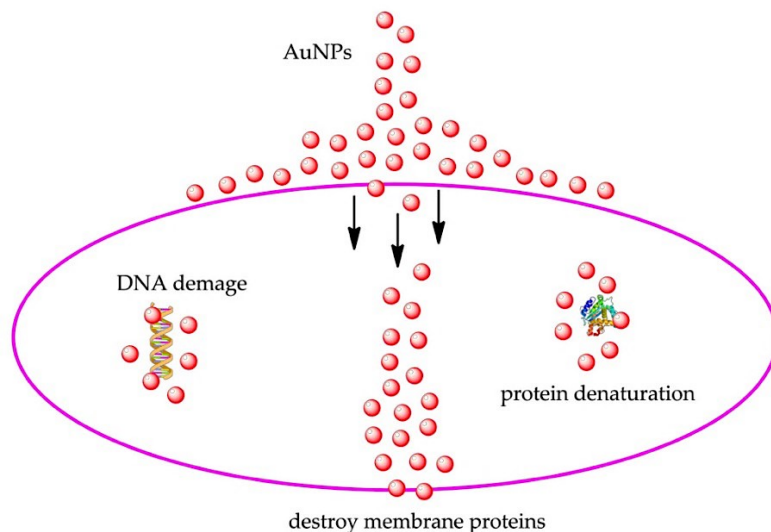


Figura 3: Meccanismi principali con i quali Au NPs coniugate ad antibiotici esplicano l'attività antibatterica.[26]

## 2.2. Applicazioni

L'oro e l'argento sono metalli preziosi conosciuti ed utilizzati per vari scopi fin dai tempi più remoti. Con l'avvento delle Nanoscienze e lo sviluppo della bionanotecnologia, le conoscenze relative alle proprietà e le molteplici funzionalità di superficie delle Ag e Au NPs sono aumentate, permettendo un loro utilizzo nello sviluppo di nuovi biomateriali e nell'indagine di sistemi biologici ancora sconosciuti.[27] La possibilità di modificare l'area superficiale e il confinamento degli elettroni, permettono lo sviluppo e la possibilità di modulare in funzione delle dimensioni alcune proprietà come la reattività chimica, il punto di fusione, la conducibilità elettrica, la fluorescenza e la permeabilità delle NPs.

In special modo, la versatilità di utilizzo delle Au NPs e le proprietà antibatteriche delle Ag NPs hanno fornito la base per un'ampia gamma di applicazioni, soprattutto in campo biomedico.[26]:[27]:[36]

**Applicazione in ambito biomedico.** Le proprietà antibatteriche dell'argento vengono spesso impiegate in ambito biomedico; un esempio è rappresentato dai dispositivi utilizzati per le medicazioni delle ferite come garze, cerotti etc. Ad oggi la maggior parte dei dispositivi impiegati per la medicazione di ferite e scottature è a base di Sulfadiazina Argentica. Invece, per quanto concerne le Ag NPs, l'incorporazione delle Ag NPs in cerotti ha permesso di osservare sia una riduzione delle infezioni che un'accelerazione del tempo di guarigione.[7][37]

Le proprietà citotossiche delle Ag NPs possono anche essere sfruttate contro determinate cellule, ad esempio quelle tumorali e le Ag NPs, se opportunamente funzionalizzate possono essere utilizzate per il trasporto mirato di farmaci. Recenti lavori hanno mostrato come la crescita e proliferazione delle cellule di cancro al seno (MCF-7) sia inibita dal trattamento a concentrazioni differenti (1-10  $\mu\text{g/mL}$ ) con Ag NPs.[7][38]

Riguardo le Au NPs, data la loro bassa tossicità rispetto ad altri nanomateriali metallici, vengono preferite nelle applicazioni mediche. L'utilizzo di Au NPs di differenti dimensioni e morfologie ha permesso lo sviluppo di varie terapie antitumorali. Un esempio è rappresentato dalle Au *nano-shells* utilizzate nella terapia fototermica dei tumori. Queste Au NPs, opportunamente funzionalizzate, vengono introdotte nell'organismo e, una volta nel sito tumorale, aggregano. Tramite l'utilizzo di raggi infrarossi queste Au NPs vengono riscaldate determinando la morte per via termica delle cellule tumorali e lasciando intatte le cellule sane.[8] Le Au NPs vengono utilizzate anche per il trasporto di farmaci. Solitamente dopo una terapia chimica, le cellule tumorali divengono insensibili alla terapia per effetto della somministrazione ripetuta di farmaci. Le Au NPs, opportunamente funzionalizzate, sono in grado di aumentare l'accumulo dei farmaci all'interno delle cellule interessate. Au NPs coniugate con Doxorubicina (DOX), farmaco antitumorale, contribuiscono alla ritenzione del farmaco nelle cellule tumorali MCF-7/ADR, un tumore multi-resistente ai farmaci. Ciò provoca un aumento della concentrazione di DOX a livello intracellulare che ne determina un maggiore effetto citotossico nelle cellule rispetto alla DOX libera.[39]

Altri studi hanno dimostrato come le Au NPs destinate alla terapia tumorale, con dimensioni massime di 100 nm, riescano ad accumularsi all'interno del tumore

sfruttando l'effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (EPR) causato dalle cellule tumorali, in cui l'endotelio vascolare risulta danneggiato e irregolare.[27][40]

**Applicazione in ambito diagnostico e nella diagnostica per immagini (*imaging*).**

Le Ag NPs, insieme alle Au NPs, sono le NPs metalliche con proprietà plasmoniche migliori. Le versatili proprietà ottiche ed elettroniche delle Ag e Au NPs vengono impiegate anche nell'*imaging* cellulare che sfrutta varie tecniche come la tomografia computerizzata (TC), la luce in campo oscuro e la Spettroscopia Raman. Le proprietà plasmoniche sono utilizzate nella Spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS) applicata in medicina diagnostica. I segnali di diffusione Raman sono solitamente utilizzati per l'identificazione di elementi chimici. Il problema riguardante la diffusione Raman riguarda il segnale, solitamente molto debole e di difficile interpretazione. L'utilizzo di Ag NPs serve per potenziare il segnale e rendere più facilmente interpretabili i dati.[41]

Le Au NPs vengono utilizzate come agenti di contrasto nella TC poiché l'oro presenta numero atomico e densità più elevati rispetto ai relativi valori dello iodio attualmente utilizzato come agente di contrasto.[27]

Recentemente uno studio ha dimostrato come Au NPs coniugate ad un antigene di membrana specifico della prostata (PSMA) e ad un aptamero (PMSA-Au NPs) siano efficaci nell'ottenere delle immagini TC di buona qualità per l'*imaging* specifico delle cellule del cancro alla prostata. Infatti, i risultati ottenuti mostrano come le PMSA-Au NPs abbiano un'intensità di TC quattro volte superiore per le cellule trattate (LNCaP) rispetto a quelle di una cellula non trattata PC3. Inoltre, le PMSA-Au NPs sono state caricate con la Doxorubicina (DOX), un farmaco antitumorale, che ha indotto la morte cellulare nelle cellule LNCaP, fenomeno non osservato nelle cellule PC3.[42] (Fig. 4)

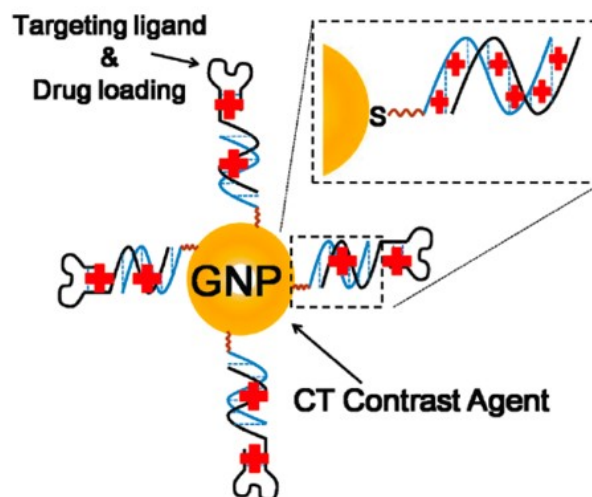


Figura 4: Struttura delle PMSA-Au NPs caricate con Doxorubicina (DOX).[42]

**Applicazione per la rilevazione di biomolecole (*biosensing*).** Le proprietà elettrochimiche delle Ag NPs sono state sfruttate per la realizzazione, su scala nanometrica, di sensori caratterizzati da tempi di risposta più rapidi e limiti di rilevamento più bassi. Un esempio riguarda l'elettrodeposizione delle Ag NPs su elettrodi d'oro presenti su piastre di allumina effettuata nel lavoro di ricerca di Manno et al;[43] tale lavoro ha dimostrato come la presenza dei nanomateriali di argento su tali piastre di allumina, renda quest'ultime più sensibili alla rilevazione del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ).

L'utilizzo di Au NPs cariche positivamente avviene in campo diagnostico per rilevare la presenza di molecole proprie di alcune malattie. Si tratta dei miRNA, piccole molecole di RNA considerate marcatori biologici di patologie. Esse possono essere rilevate in una varietà di secrezioni corporee e campioni raccolti; tuttavia, a causa delle loro caratteristiche uniche o delle basse quantità, la loro identificazione è molto difficile. Le Au NPs sembrano aiutare nel rilevamento di tali molecole.[8] Un particolare studio ha mostrato come un sistema di biosensori composto da Au NPs coniugate con aptameri (brevi catene oligonucleotidiche capaci di legare uno specifico bersaglio biologico) sia efficace nel rilevare la presenza di cellule di Ramos, un particolare linfoma. Qui infatti si combina la selettività e l'affinità degli aptameri con le proprietà spettroscopiche delle Au NPs.[27][44]

**Applicazione nei sistemi di purificazione e disinfezione delle acque.** Le proprietà antibatteriche dell'argento sono state utilizzate fin dai tempi più remoti per la conservazione dell'acqua e la sua disinfezione. Infatti, le tazze e i recipienti d'argento per l'acqua potabile, insieme all'argenteria destinata agli alimenti, sono stati probabilmente il suo primo uso ampiamente conosciuto.[7] Ad oggi, risulta piuttosto naturale provare ad utilizzare l'argento per la purificazione dell'acqua potabile e per la disinfezione delle acque reflue. Riguardo la purificazione dell'acqua potabile sono già in commercio da tempo dei filtri a base di Ag NPs, mentre per la disinfezione delle acque reflue la questione è più complicata. A tal proposito, è stato studiato come la combinazione di materiale a matrice polimerica presentante particelle di silicato disperse con Ag NPs abbiano una buona attività battericida sfruttata per il trattamento delle acque reflue.[45] Quest'ultime, oltre a presentare microrganismi, presentano alti livelli di metalli pesanti tossici per l'ambiente come il mercurio, il cromo, il piombo etc. Risulta quindi necessario lo sviluppo di un approccio standard ed economico in grado di individuarli: varie formulazioni di Ag NPs sono state studiate come biosensori per l'individuazione di tali metalli pesanti.[45]

**Applicazione in ambito alimentare.** L'industria alimentare in ottica di sviluppo e miglioramento pone sempre più attenzione all'utilizzo delle NPs. Ad oggi è facile sentir parlare di "*smart food*", ovvero l'utilizzo di differenti NPs per conferire agli alimenti sapori, odori o colori migliori. In questo ambito, le Ag NPs hanno acquistato particolare interesse per il loro impiego in imballaggi alimentari (per fare "*smart packaging*") e per il rilevamento di contaminanti.[7] Infatti, si cerca di sfruttare le proprietà antibatteriche di queste NPs nel *food packaging* per prevenire la contaminazione degli alimenti ed aumentare quindi sia la qualità che la vita (*shelf-life*) dei prodotti. Inoltre, lo studio sulle Ag NPs in questo ambito è volto anche alla rilevazione di eventuali contaminanti come ad esempio agenti patogeni.[46]

**Applicazione in ambito tessile.** L'utilizzo di indumenti funzionali per la protezione dell'uomo negli ambienti di lavoro è sempre più esteso. Questi, infatti, devono difendere l'individuo dall'azione nociva di eventuali batteri e virus in

ambienti come ospedali o altri siti di esposizione. Sebbene l'applicazione commerciale di Ag NPs su indumenti sia già iniziata, non risulta ancora ampiamente diffusa ed è ancora in fase di studio; è comunque stata osservata l'azione antibatterica delle Ag NPs incorporate in tessuti di cotone.[47]

In questo ambito, oltre alle proprietà antibatteriche, si cercano di sfruttare anche le proprietà ottiche ed elettroniche delle Ag NPs: le proprietà plasmoniche e la possibilità di poter sintonizzare il plasmon su una gamma piuttosto ampia di lunghezze d'onda permette di ottenere tessuti di colorazione differente, principalmente di colore giallo per il cotone e giallo-rossastro o giallo-marrone nel caso della lana. Inoltre, è stato osservato come l'incorporazione di Ag NPs riduca del 90% la trasmittanza UV in indumenti di cotone e del 25% negli indumenti di lana. Ciò dimostra, come grazie alla capacità di riflettere le radiazioni UV, le Ag NPs possano essere sfruttate anche per la protezione dei tessuti dai raggi UV.[7];[47]

C'è da ricordare che tutte queste applicazioni sono ancora in fase di esplorazione, supportata da ricerca, in quanto in tutti gli ambiti applicativi vi sono degli aspetti ancora poco chiari che devono essere compresi per poter utilizzare le NPs in maniera sicura sia per la salute che per l'ambiente. Lo sviluppo di tecnologie basate sull'utilizzo di NPs è difatti fortemente dipendente dallo sviluppo e dalla comprensione delle proprietà di base di questi nanomateriali come quelle fisiche, chimiche e tossicologiche. Un esempio riguarda le Au NPs: esse hanno un grande potenziale applicativo, specialmente in campo biomedico. Una loro effettiva applicazione su larga scala ancora non è avvenuta in quanto vi è da chiarire alcuni aspetti: seppur considerate biocompatibili, alcuni studi hanno mostrato come Au NPs di piccole dimensioni abbiano un minimo effetto tossico che tuttora può essere ulteriormente mitigato tramite opportune modificazioni di superficie. Quest'ultime devono essere ulteriormente studiate per poter essere migliorate.[48];[49] Anche in questo caso le dimensioni delle Au NPs risultano essere un aspetto fondamentale che deve essere maggiormente ottimizzato. La questione riguarda sempre gli effetti collaterali dovuti alla somministrazione di questi nanomateriali: una loro veloce eliminazione dall'organismo abbassa di buon grado le probabilità che queste NPs possano provocare dei danni ai tessuti. Au NPs di più piccole dimensioni riescono

ad essere eliminate più facilmente e velocemente. Tutto ciò però entra in contrasto con le misure volte ad ottimizzare la farmacocinetica delle Au NPs. Quest'ultima ottimizzazione, solitamente, prevede l'aumento dell'emivita, ossia il tempo necessario a ridurre del 50% la concentrazione del nanomateriale/farmaco dal circolo sanguigno, poiché aiuta il potenziamento dell'effetto desiderato.[49]



# Capitolo 3

## 3. Approcci di sintesi

La sintesi delle Ag NPs e Au NPs può essere effettuata con vari approcci. Le metodologie a disposizione possono essere suddivise in tre grandi tipologie, ossia metodi fisici, chimici e biologici. I metodi fisici sfruttano l'approccio di sintesi definito "top-down", dove la formazione delle NPs avviene tramite la frammentazione del materiale *bulk* di partenza. Le tecniche fisiche comprendono vari approcci, di cui i più diffusi sono l'ablazione laser e l'approccio per evaporazione-condensazione. Entrambi questi approcci sono in grado di produrre grandi quantità di NPs con elevata purezza, senza l'uso di sostanze chimiche potenzialmente tossiche sia per l'ambiente che per la salute umana. Nonostante questo aspetto positivo, tali approcci sono energeticamente dispendiosi e richiedono attrezzature e macchinari complessi e costosi.[9]

Con i metodi chimici e biologici, invece, le NPs vengono formate attraverso l'approccio "bottom-up", un approccio di tipo costruttivo che prevede la nucleazione e l'accrescimento di atomi, o molecole, a formare nanomateriali.[9]

In fig. 5 sono schematizzati questi approcci.

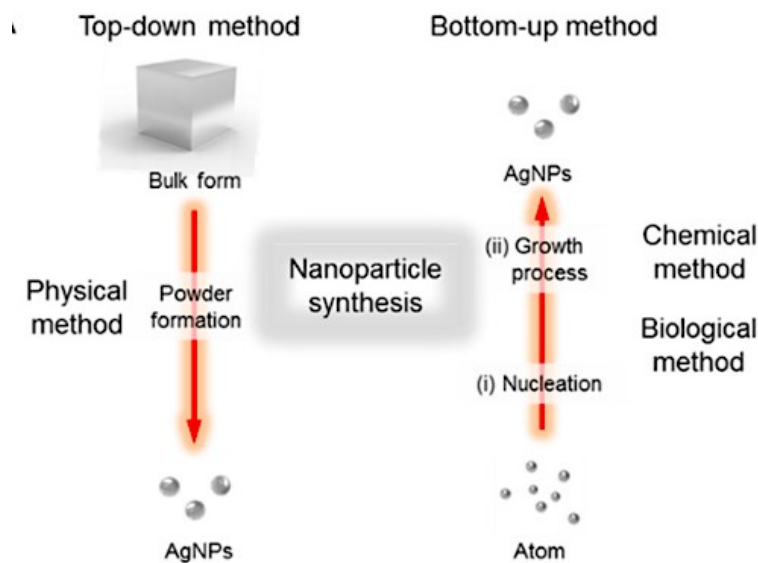


Figura 5: Principali approcci di sintesi delle NPs. Nell'immagine si fa riferimento alle Ag NPs.[9]

Il processo di formazione di NPs tramite quest'ultimo approccio solitamente avviene tramite reazioni chimiche in fase liquida o vapore. Le sintesi in fase liquida comprendono vari metodi tra cui la riduzione chimica, il trattamento sol-gel, la sintesi idrotermale e solvotermale.[50]

Le sintesi in fase liquida, in particolare che si svolgono in soluzione o sospensione, rientrano tra i metodi di *wet chemistry*. Quest'ultimi, oltre a prevedere lo svolgimento della sintesi in fase liquida, prevedono l'utilizzo di temperature e pressioni moderatamente basse, oltre ad essere ritenuti metodi semplici, versatili, relativamente economici e scalabili.[13]

Tradizionalmente considerati metodi di sintesi poco riproducibili, rispetto ad altri che prevedono condizioni di vuoto, gli approcci di *wet chemistry* risultano essere oggetto di studio e miglioramento. Infatti, oggi, alcuni di questi permettono di sintetizzare nanomateriali con un controllo ben preciso delle loro caratteristiche (morfologiche, dimensionali, strutturali, cristallinità e chimica di superficie) influenzandone le proprietà funzionali (ottiche, elettriche, catalitiche, magnetiche).[13] Tra questi approcci, la sintesi chimica che si basa sul processo di riduzione di un precursore da parte di un agente riducente, risulta essere la più diffusa per quanto riguarda la formazione di nanomateriali metallici ed inorganici (Au, Ag, ZnO, ZnS etc.) poiché risulta essere la via sintetica più semplice e versatile. Tuttavia, riguardo questo approccio vi sono diverse limitazioni legate agli agenti riducenti utilizzati, come la tossicità, la scarsa capacità riducente, i costi elevati ed anche eventuali impurità.[9][50]

Per ridurre alcuni di questi aspetti negativi relativi agli agenti riducenti, come la tossicità e il costo elevato, sono stati introdotti i metodi biologici che prevedono l'utilizzo di microrganismi, piante o loro estratti.[50]

Nel presente lavoro di Tesi si è ottimizzato quest'ultime due vie sintetiche: la sintesi chimica e la sintesi biogenica con l'utilizzo di infuso di tè nero.

La formazione di queste NPs in soluzione segue il modello generale proposto da LaMer-Dinegar che si articola in due grandi fasi: nucleazione e crescita. Dal diagramma, in fig. 6, tuttavia, si può evidenziare come tale processo presenti tre step che si susseguono temporalmente: nella prima fase (I) si assiste ad un rapido aumento della concentrazione dei monomeri liberi in soluzione che derivano dalla

scissione dei precursori. Durante la seconda (II), quando la concentrazione dei monomeri raggiunge un dato valore critico ( $C_{crit}$ ), si raggiunge una condizione di sovrasaturazione che determina l'inizio della cosiddetta fase di nucleazione. Dopo questa fase non si verifica più alcuna nucleazione a causa della più bassa concentrazione dei monomeri rimasti in soluzione, ma i nuclei (o cluster) formati si accrescono e ciò porta ad una diminuzione della concentrazione dei monomeri in soluzione; questo è quello che determina la terza e ultima fase (III).[51]:[52]

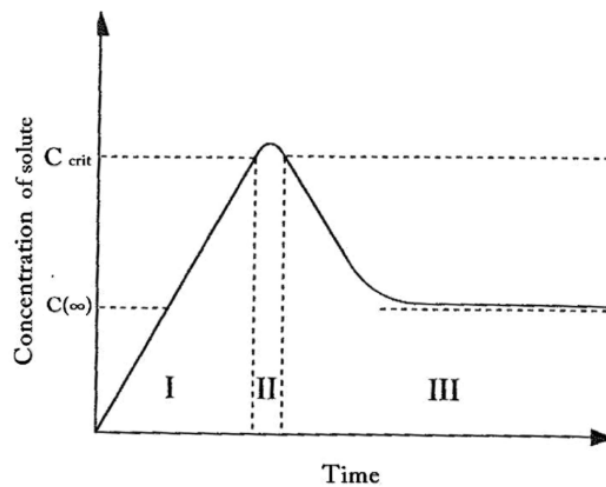


Figura 6: Schema del diagramma di LaMer-Dinegar.[51]

### 3.1. Riduzione chimica

I metodi di sintesi chimica sono comunemente utilizzati per la sintesi di NPs metalliche come dispersione colloidale in soluzione acquosa o in solvente organico tramite la riduzione del sale metallico da parte di un agente riducente e stabilizzante. L'attività riducente, infatti, serve a ridurre il sale di partenza affinché si possano formare atomi metallici che, aggregandosi, formeranno nanostrutture; l'attività stabilizzante, invece, risulta fondamentale per la stabilizzazione delle NPs per ridurre fenomeni di aggregazione. La sintesi tramite riduzione chimica permette di ottenere una varietà di prodotti molto ampia poiché vari sono i reagenti di partenza di cui si dispone oggi. Tale approccio di sintesi, poi, è particolarmente vantaggioso poiché la maggior parte degli agenti riducenti e stabilizzanti utilizzati

possono essere facilmente cambiati o modificati per ottenere NPs con le caratteristiche desiderate. Inoltre, affinché quest'ultime si formino, l'attività redox e il tipo di agenti riducenti e stabilizzanti devono essere accuratamente scelti poiché influenzano forma, dimensioni e stato di aggregazione. Infatti, qualora l'agente riducente avesse scarsa attività stabilizzante, possono venir utilizzati anche degli ulteriori agenti stabilizzanti.[9][50] Tra gli agenti riducenti e stabilizzanti più utilizzati vi è il trisodio citrato ( $C_6H_5Na_3O_7$ ), la cui struttura è raffigurata in fig.7.[53]

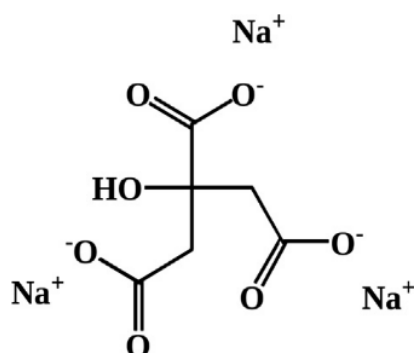


Figura 7: Struttura molecolare del trisodio citrato ( $C_6H_5Na_3O_7$ ).[53]

In questo lavoro di Tesi, si è seguito il metodo Lee-Meisel[16] che prevede l'utilizzo del sodio citrato come agente riducente e stabilizzante per la formazione, tramite riduzione chimica, di Ag NPs a partire dal sale precursore, l'argento nitrato ( $AgNO_3$ ). In fig. 8 è riportata la tipica struttura di una Ag NPs citrato-stabilizzata di forma sferica che si ottiene mediante questo approccio di sintesi.[54]

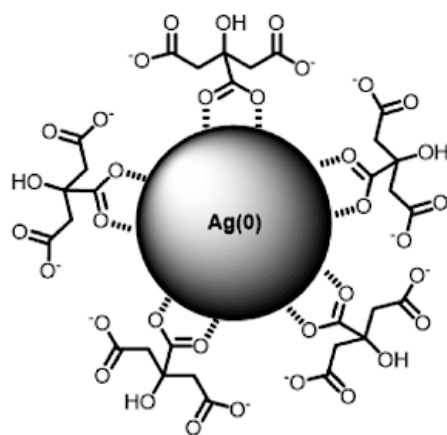


Figura 8: Composizione di Ag NPs sferiche citrato stabilizzate ottenute tramite sintesi chimica.[54]

Per la sintesi chimica delle Au NPs si è seguito il metodo Turkevich,[17] protocollo sviluppato nel 1951, in cui la formazione dei nanomateriali d'oro viene conseguita mediante reazione dell'acido tetracloroaurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) con il  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  in acqua a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , dove quest'ultimo agisce sia da agente riducente che stabilizzante.

In fig. 9 è riportata la tipica struttura di una Au NP di forma sferica che si ottiene tramite questo metodo di sintesi.[55]

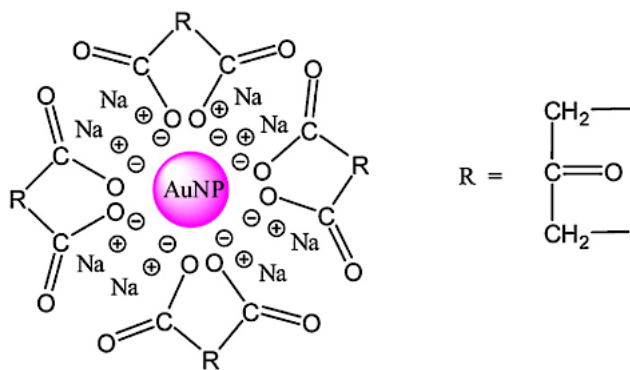


Figura 9: Composizione di Au NPs sferiche citrato stabilizzate ottenute tramite sintesi chimica (a sinistra); struttura del gruppo residuo (a destra).[55]

## 3.2. Riduzione per via biogenica

Recentemente è emersa la necessità di sviluppare dei metodi di sintesi di NPs che soddisfino i criteri della *Green Chemistry*, come la riduzione del consumo di sostanze tossiche attraverso l'utilizzo di risorse naturali e rinnovabili. La sintesi biogenica di NPs metalliche risulta essere una semplice, valida ed ecologica alternativa alle più complesse procedure di sintesi chimica e fisica di NPs. Questo approccio prevede l'utilizzo di reagenti di natura biologica, come microrganismi, funghi, piante o loro estratti per ottenere le NPs d'interesse.[15] Infatti, in presenza di “materiali verdi” e in condizioni adeguate di concentrazione, temperatura, pressione etc. è possibile sintetizzare NPs metalliche. In particolare, sempre più attenzione è rivolta alle sintesi verdi svolte con estratti vegetali: quest'ultimi, ricchi di metaboliti secondari come acidi fenolici, flavonoidi, terpenoidi e alcaloidi, possono sostituire alcuni reagenti chimici ossia alcuni agenti riducenti e stabilizzanti comunemente utilizzati nelle procedure di sintesi chimica. Infatti, gli estratti grezzi presentano una buona attività riducente poiché, per loro natura, sono costantemente coinvolti nelle reazioni redox delle vie metaboliche vegetali.[9][26][50][56]

### 3.2.1. Uso del tè nero come agente riducente

Il tè nero (marca Lipton) è l'agente riducente e stabilizzante utilizzato nella sintesi biogenica ottimizzata in questo lavoro di Tesi. L'infuso di tè nero è una bevanda conosciuta in tutto il mondo, estremamente consumata nei paesi mediorientali, che deriva dalla pianta *Camellia sinensis*. Di quest'ultima esistono due varietà: la *sinensis* e l'*assamica*; la prima, dato il gusto e l'odore unici, viene sfruttata per ottenere il tè verde, la seconda, ricca in catechine e tannini, viene usata per ottenere il tè nero.[57] Sebbene in origine il consumo di tè fosse dovuto ai suoi effetti stimolanti, il suo uso, oggi, è principalmente associato ai suoi effetti benefici per la salute umana come gli effetti antiossidanti, antinfiammatori, di prevenzione del cancro e di riduzione dell'insorgenza di malattie cardiache. Tutto ciò è dovuto ai composti polifenolici che includono teaflavine, tearubigine, oltre a una certa

quantità di catechine che, tuttavia, risulta essere minore rispetto alla quantità presente nel tè verde. L'elevata presenza di polifenoli, rispetto alle catechine, è dovuta alla particolare lavorazione richiesta per ottenere questa bevanda: il processo di fermentazione delle foglie di tè verde a tè nero determina l'ossidazione completa delle catechine che, insieme a processi di polimerizzazione, portano alla formazione dei composti polifenolici. Tuttavia, la presenza delle catechine nel tè nero e nei suoi estratti è dovuta ad un'incompleta conversione di tutte le catechine in polifenoli.[57]:[58] (Fig. 10)

Components	Extracted solids (weight %)
Thearubigins	35.8
Theaflavins	2.6
Catechins	11.2
Gallic acid	1.1
Chlorogenic acid	0.2
Caffeine	7.5
Theobromine	0.7
Oxalic acid	1.5
Mixture of aliphatic acids	1.2
Lipids and waxes	4.8
Sugars	6.9
Polysaccharides	4.2
Pectin	0.2
Peptides	6.0
Theanine	3.5
Amino acids	3.0
Potassium cation	4.8
Other minerals	4.7
Aroma components	0.1

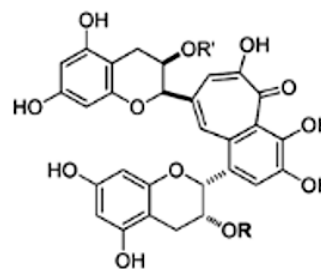
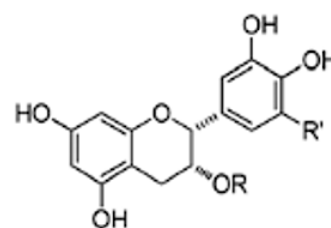


Figura 10: Principali componenti del tè nero (a sinistra); struttura molecolare della catechina (in alto a destra) e struttura molecolare della theaflavina (in basso a destra).[57]:[59]

La scelta del tè nero come agente riducente è stata dettata da numerose ragioni come l'elevato consumo di questa bevanda (78%) rispetto al tè verde (20%) e al tè oolong (2%) che la rende di facile reperibilità e di basso costo, le proprietà benefiche ed antiossidanti, non tossiche per la salute ed infine poiché è noto che i polifenoli abbiano una buona attività riducente e stabilizzante.[57]:[58]:[59]:[60]

Nonostante sia chiaro il contributo dei composti polifenolici in questo tipo di reazione, e numerosa sia la letteratura riguardo la sintesi di nanomateriali metallici mediata da estratti di piante, la sintesi biogenica di Ag e Au NPs tramite l'utilizzo dell'infuso di tè nero risulta tutt'oggi poco studiata. In merito, uno degli studi più citati è quello di Begum et al.[61] che riporta la sintesi di Au e Ag NPs di varie

morfologie (sferiche, prismatiche, trapezoidi e bastoncellari) usando l'estratto di foglie di tè nero; gli autori, inoltre, attribuiscono alla presenza dei polifenoli l'efficienza del potenziale riducente dell'estratto utilizzato. Anche Cataldo,[59] con il suo lavoro, osserva l'attività riducente e stabilizzante dei polifenoli contenuti nell'infuso del tè. In particolare, confronta gli effetti del tè verde e del tè nero verso le caratteristiche delle Ag NPs, evidenziando come l'infuso di tè verde, rispetto al tè nero, aumenti la cinetica di reazione e determini la formazione di Ag NPs con  $d_H$  inferiore. Osserva, inoltre, come entrambi i tipi di Ag NPs mantengano la loro proprietà battericida. Asghar et al.[62] utilizza l'infuso di tè nero e verde per sintetizzare, a temperatura ambiente, diversi tipi di NPs, tra cui le Ag NPs. Le sospensioni che ottiene presentano piccole impurità che suppone derivino dai costituenti vegetali. Nonostante ciò, le Ag NPs che ottiene risultano essere sferiche con dimensioni comprese tra 10 e 20 nm e presentano un'elevata attività antibatterica e antifungina riuscendo, in particolare, a ridurre la produzione dell'aflatossina, una sostanza tossica prodotta da alcuni microfunghi filamentosi e particolarmente dannosa per la salute.

È da ricordare, tuttavia, che vi sono ancora alcune criticità di natura teorica e sperimentale da risolvere legate alle condizioni di sintesi, al controllo della qualità del prodotto e all'applicazione. Un aspetto importante, ancora da chiarire, è la piena comprensione del meccanismo di biosintesi delle NPs, ossia è chiaro il ruolo dell'estratto vegetale (in questo caso il tè nero) nel meccanismo di sintesi, ma i meccanismi in cui è coinvolto, nello specifico, sono ancora da elucidare. Inoltre, risulta ampia la differenza nella forma e nelle dimensioni delle NPs ottenute da diversi estratti e ciò rende il processo poco riproducibile limitandone quindi la sua applicazione nella produzione industriale. Inoltre, le attuali conoscenze sulle applicazioni dei nanomateriali di derivazione biogenica su cellule in vitro sono ancora limitate. Risolvere questi problemi, quindi, risulta necessario per lo *scale-up* e l'applicazione su larga scala dei nanomateriali metallici sintetizzati tramite sintesi verde.[56]



## Capitolo 4

### 4. Valutazione della citotossicità

Le informazioni riguardanti le proprietà del metallo *bulk* non sono sufficienti a spiegare le proprietà e il comportamento del medesimo metallo su scala nanometrica. Il comportamento delle NPs è molto diverso dal punto di vista delle proprietà chimico-fisiche ed inoltre sono largamente sconosciuti gli effetti che esse provocano nei tessuti viventi, soprattutto sotto l'aspetto degli effetti a lungo termine, come ad esempio la genotossicità o i loro effetti sull'ambiente circostante. Con il costante aumento della produzione di prodotti contenenti NPs, risulta quindi essenziale studiarne e monitorarne la sicurezza e i possibili effetti sulla salute umana e sull'ambiente. La caratterizzazione completa del comportamento delle NPs può essere effettuata con un approccio multidisciplinare che miri a fornire un quadro generale riguardante le caratteristiche e il comportamento delle stesse.[7][63]

Oltre alla caratterizzazione chimica delle NPs, in ottica di eventuali applicazioni, è bene studiarne anche la tossicità. Un primo passo verso la comprensione di questo aspetto deriva dagli studi condotti in vitro su colture cellulari. Specialmente per eventuali loro applicazioni in campo biomedico, i test cellulari sono i primi che si conducono, poiché, rispetto agli studi condotti in vivo (su animali), sono di più facile controllo e riproduzione, sono meno costosi e più etici. Nonostante ciò, è fondamentale riconoscere che le colture cellulari appaiono sensibili ai cambiamenti dei parametri sperimentali, quali pH, temperatura e concentrazione dei nutrienti. Risulta quindi necessario il controllo di tali condizioni per poter asserire che la morte cellulare sia dovuta alla tossicità delle NPs e non alle inadeguate condizioni di coltura.[63]

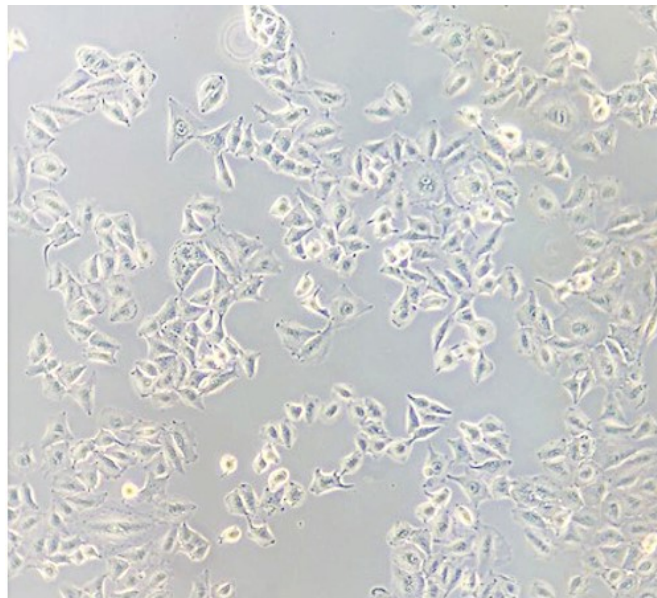
## 4.1. Descrizione delle cellule utilizzate

La maggior parte delle informazioni riguardanti la citotossicità delle cellule umane esposte a nanomateriali deriva da studi condotti in vitro su cellule coltivate in sistemi bidimensionali (2D). Sono molti tipi di cellule che vengono utilizzati per questo tipo di studi, come le HepG2, le HeLa e le A549.[36][63]

L'uso di NPs metalliche, in particolare di Ag NPs, in prodotti di consumo e applicazioni mediche è un ambito in rapida crescita, sotto costante studio. Di conseguenza, gli operai, i consumatori e l'ambiente sono sempre più esposti alle NPs. È noto che una delle potenziali vie di esposizione umana alle NPs è l'inalazione: le Ag e Au NPs vengono facilmente assorbite attraverso il sistema respiratorio. Ratti Sprague-Dawley esposti per 90 giorni all'inalazione di Ag NPs di 20 nm a varie dosi (49, 133 e 515  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) non mostrano evidenti cambiamenti a livello degli organi o nei parametri biochimici, tuttavia, rispetto ai controlli, i ratti trattati presentano delle differenze nei parametri respiratori come la diminuzione del volume respiratorio, cambiamenti istopatologici e la ventilazione al minuto causate dalle alte concentrazioni delle particelle presenti nel flusso sanguigno e a livello dell'epitelio alveolare.[64] Sempre in ratti Sprague-Dawley sottoposti all'inalazione di 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  di Au NPs sferiche (< 6 nm) per 90 giorni, è stata osservata una diminuzione dei parametri respiratori, ossia della funzione polmonare, del volume respiratorio e del volume minuto rispetto al controllo. Inoltre, l'esame istopatologico ha dimostrato la presenza di una diminuzione degli alveoli, di un'infiltrazione infiammatoria di tipo misto (linfociti/neutrofili/macrofagi) e un generale aumento del numero di macrofagi a livello polmonare.[65] Per tale motivo che riguarda proprio la via di assorbimento di queste NPs, nel presente studio, è stata utilizzata la linea di carcinoma epiteliale alveolare (A549).

Numerosi studi di nanotossicità sono stati condotti sulle cellule A549. Si tratta di una linea cellulare epiteliale continua di adenocarcinoma polmonare umano scoperta nel 1972 da Giard D. J.[66] attraverso la coltura di espianti di tessuto carcinomatoso polmonare di un uomo adulto caucasico.[67] Tali cellule presentano una morfologia epitelioide e contengono numerosi, piccoli granuli citoplasmatici

osservabili tramite microscopia in contrasto di fase o in campo chiaro. (Fig. 11) La presenza dei corpi multilamellari e l'elevata quantità di lecitina indicano che queste cellule mantengono funzioni differenziate anche dopo molte generazioni cellulari in vitro; tutto ciò suggerisce che queste cellule abbiano avuto origine dalla trasformazione neoplastica di cellule alveolari di tipo II. In aggiunta, le caratteristiche ultrastrutturali e la capacità di sintetizzare lecitina delle cellule A549 sono simili a quelle di uno pneumocita di tipo II. Le cellule A549, oggi, rappresentano un modello consolidato per lo studio delle risposte alveolari di tipo II, ma non solo, l'ampia conoscenza riguardo queste cellule e la loro facilità di coltura consente di eseguire un gran numero di esperimenti in un breve lasso di tempo.[67]:[68]



*Figura 11: Cellule A549 osservate al microscopio ottico nel presente lavoro di Tesi.*

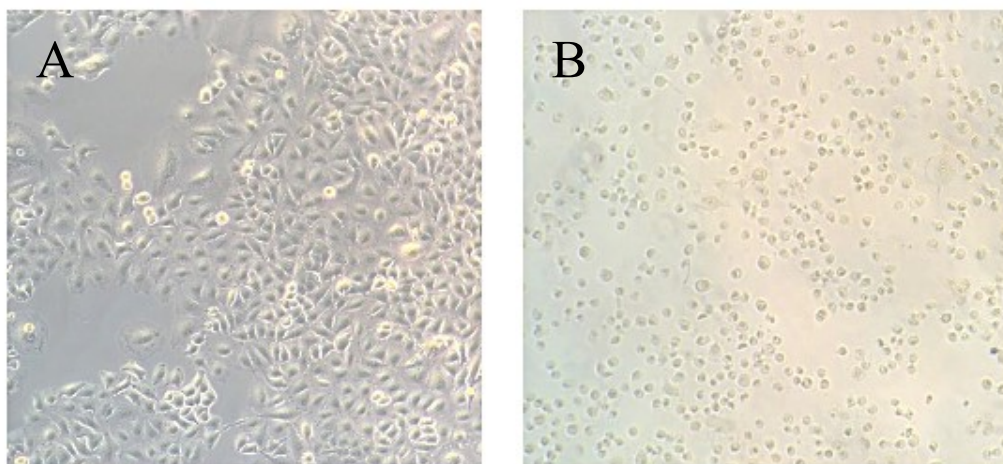
## 4.2. Saggi di citotossicità in colture 2D

I saggi di citotossicità misurano la capacità dei composti tossici di causare danni o morte cellulare. Ad oggi sono molti i saggi di cui si dispone per analizzare gli effetti citotossici dei nanomateriali; gran parte di questi si basano sull'osservazione della vitalità, sui cambiamenti morfologici, sulla capacità proliferativa o sull'attività metabolica delle cellule coltivate in vitro.[69]

In questo lavoro di Tesi è stata valutata la citotossicità concentrazione-dipendente delle Ag e Au NPs mediante l'osservazione dei cambiamenti morfologici di cellule umane A549 e mediante saggi di proliferazione cellulare condotti sulle medesime colture cellulari coltivate in 2D.

#### 4.2.1. Alterazione della morfologia

L'alterazione della morfologia cellulare rappresenta un primo effetto che denota la citotossicità del nanomateriale, si tratta di una prima conseguenza che può essere osservata nelle cellule dopo la loro esposizione alle NPs. È un parametro che può essere osservato tramite microscopia ottica che quindi non richiede né strumentazioni né procedure sperimentali complesse. Il cambiamento più comunemente riportato come risultato del danno cellulare è il distacco delle cellule, oltre ciò solitamente si osservano ulteriori variazioni come l'alterazione della forma, il rigonfiamento cellulare, la rottura della membrana cellulare, la diminuzione nel numero di cellule o la formazione di vescicole.[70][71] (Fig. 12)



*Figura 12: A) Cellule A549 pre trattamento con NPs; B) cellule A549 con morfologia alterata post trattamento con Ag NPs. Le immagini sono state acquisite durante questo lavoro di Tesi.*

## 4.2.2. Saggio di proliferazione cellulare MTS

Il saggio di proliferazione cellulare MTS è un saggio utilizzato per misurare la vitalità cellulare, ossia il numero di cellule vive presenti in una coltura cellulare. Tale misura viene utilizzata come screening della risposta cellulare a farmaci, agenti chimici, NPS etc. per poterne determinare l'effettiva tossicità. Si tratta di un saggio colorimetrico che prevede la riduzione del sale di tetrazolio MTS (5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazoli)-3-(4-solfofenil) tetrazolio) a formazano, un composto solubile di colore viola. (Fig. 13)

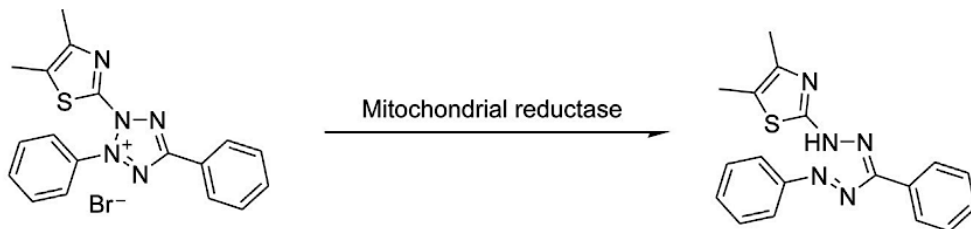


Figura 13: Processo di riduzione dell'MTS a formazano.[72]

In particolare, l'MTS, in presenza di un agente di accoppiamento degli elettroni, la fenazina metosolfato (PMS), viene ridotto a cristalli di formazano dagli enzimi deidrogenasi NADH-dipendenti presenti a livello mitocondriale. (Fig. 14) La quantità di formazano prodotto è proporzionale alle cellule vitali presenti in coltura e tale quantità può essere misurata tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro, impostando l'assorbanza a 492 nm. Questo saggio risulta ideale per questo tipo di analisi poiché di facile utilizzo, rapido, affidabile e relativamente economico.[73]

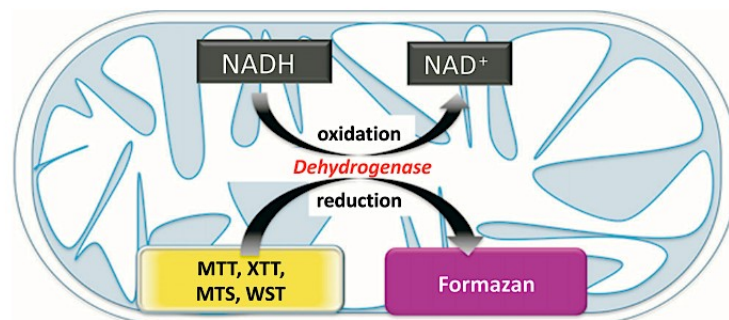


Figura 14: Processo di riduzione enzimatica dell'MTS a formazano grazie all'azione delle deidrogenasi mitocondriali.[73]



# Capitolo 5

## 5. Risultati e discussione

In questo capitolo vengono presentati e discussi gli approcci di sintesi studiati per l'ottenimento di nanomateriali di Au e Ag, tramite riduzione chimica e biogenica, correlando la loro stabilità in sospensione, dimensione e morfologia con i parametri sperimentali applicati. Viene inoltre discussa in modo comparativo la loro citotossicità.

### 5.1. Nanoparticelle d'argento

Le nanoparticelle d'argento (Ag NPs) sono state ottenute attraverso la riduzione di una soluzione acquosa di argento nitrato ( $\text{AgNO}_3$ ), un sale precursore di molti composti d'argento. I nanomateriali ottenuti sono stati sintetizzati tramite riduzione chimica (Lee-Meisel)[16] e biogenica.[62] La differenza tra le due metodiche riguarda l'agente riducente utilizzato: la prima prevede il trisodio citrato diidrato ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), la seconda l'infuso di tè nero (in questo caso marca Lipton). (vedi parte sperimentale 5.1.1. e 5.1.2.).

In entrambe le sintesi, il meccanismo di formazione delle Ag NPs è il medesimo[9]: lo ione argento ( $\text{Ag}^+$ ) presente in soluzione viene inizialmente ridotto ad argento metallico ( $\text{Ag}^0$ ) dall'agente riducente. Segue uno step di nucleazione con formazione di aggregati di  $\text{Ag}^0$  definiti nuclei. I cluster formati possono poi accrescersi grazie al fenomeno di adsorbimento di ulteriori atomi di Ag sulla superficie dei nuclei. Successivamente la crescita può avvenire tramite un processo chiamato *Ostwald ripening* in cui più particelle più piccole si dissolvono nuovamente e il materiale dissolto si deposita sulle particelle più grandi. Si ottengono così le Ag NPs (fig. 15).

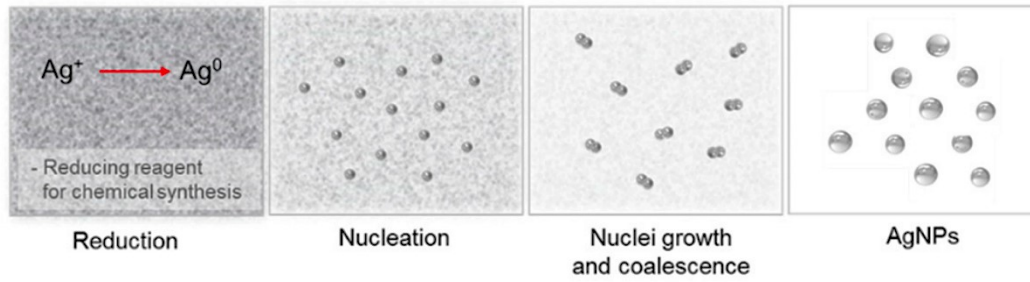
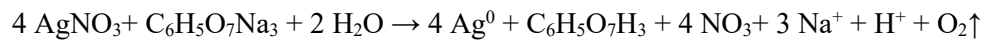


Figura 15: Formazione di Ag NPs tramite riduzione chimica.[9]

### 5.1.1. Riduzione chimica

Per la preparazione della sospensione colloidale di Ag NPs, tramite riduzione chimica, si è ricorso al metodo Lee-Meisel,[16] una variante del metodo Turkevich[17] in cui si utilizza l'AgNO<sub>3</sub> come precursore delle Ag NPs e C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2 H<sub>2</sub>O come agente riducente e stabilizzante in soluzione acquosa.[16] Il meccanismo di riduzione che avviene nella miscela di sintesi è definito dalla seguente reazione:[74][75][76]



Questa procedura prevede che, raggiunta la temperatura di ebollizione dell'acqua, alla soluzione iniziale di AgNO<sub>3</sub> si aggiunga il riducente goccia a goccia sotto costante agitazione. Una volta osservato il cambiamento di colore a giallo paglierino della sospensione, la reazione viene interrotta. (Fig. 16)

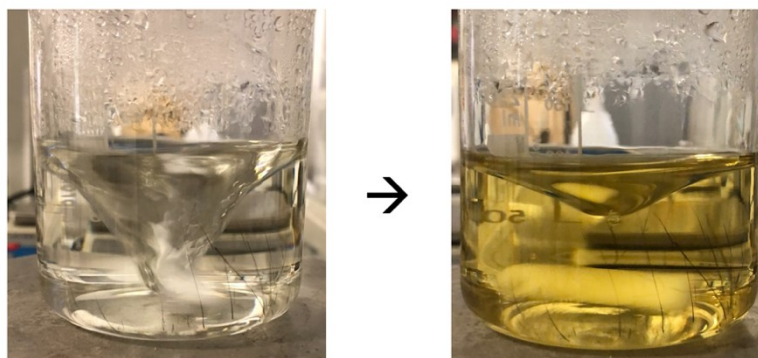


Figura 16: Foto della miscela di reazione, pre (a sinistra) e post (a destra) formazione delle Ag NPs in cui si osserva il cambiamento di colore.



Seguendo il protocollo Lee-Meisel[16] si è ottimizzata una sintesi con concentrazione iniziale di  $\text{AgNO}_3$  di 1 mM e di  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  1% p/V (campione ML 1) in acqua milli-Q. La sospensione ottenuta è stata poi caratterizzata tramite acquisizione dello spettro UV-Vis, sottoposta a DLS per studiare la distribuzione dimensionale delle nanoparticelle e la polidispersione ed infine ne è stata valutata la stabilità con la determinazione del potenziale  $\zeta$ . Le misure sono state acquisite il giorno stesso della sintesi ( $t_1$ ). I valori di Potenziale  $\zeta$  sono stati acquisiti anche a quattro giorni di distanza ( $t_2$ ) per monitorare la stabilità della sospensione.

Le NPs metalliche sono caratterizzate da proprietà plasmoniche.[13] Un plasmone è definito come un'oscillazione collettiva di elettroni liberi in materiali conduttori (ad es. metalli). Nel caso delle NPs metalliche l'oscillazione deriva dalla polarizzazione degli elettroni di conduzione causata dall'interazione con la componente elettrica di una radiazione elettromagnetica. Si parla di plasmone localizzato di superficie (LSP) quando le dimensioni delle NPs metalliche risultano più piccole rispetto alla lunghezza d'onda della radiazione, per cui la distribuzione del campo elettromagnetico lungo tutta la superficie delle NPs è uniforme: l'eccitazione in questo caso porta ad un'oscillazione confinata in tutto il volume della NP e il plasmone viene quindi definito come LSP.[26][77] L'eccitazione dell'LSP porta alla risonanza plasmonica di superficie localizzata, LSPR.

L'evidenza dell'avvenuta formazione delle Ag NPs è data dalla presenza di un picco di assorbimento nella regione dell'UV-Vis. In presenza di una sospensione colloidale d'argento, infatti, lo spettro UV mostra la loro tipica LSPR compresa tra i 350 e i 450 nm.[76][78] Dallo spettro UV (fig. 17) si può evidenziare la loro chiara formazione rilevabile dall' LSP a 416 nm.

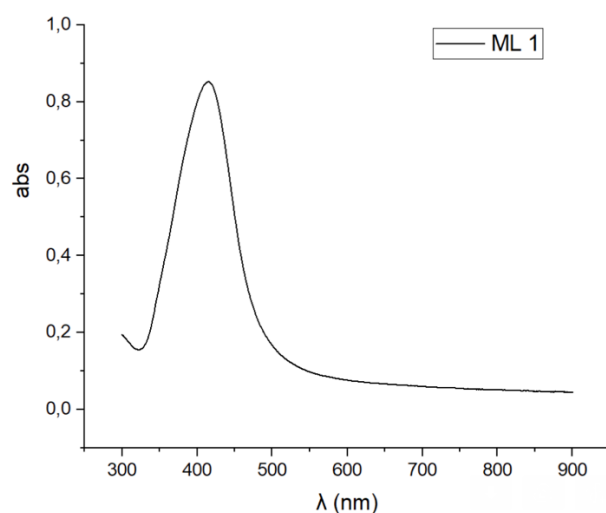


Figura 17: Spettro UV del campione ML 1.

La caratterizzazione dei colloidali è stata integrata dall'utilizzo del DLS. Vari sono i parametri che si possono ricavare da questa tecnica, come la distribuzione dimensionale che considera il diametro idrodinamico medio delle particelle ( $d_H$ ) e l'indice di polidispersione (PDI). Dal primo parametro le particelle presentano un  $d_H$  medio di 58 nm e dal secondo un PDI di 0,504. Quest'ultimo valore indica una larga distribuzione dimensionale del campione. Il PDI, infatti, è un numero adimensionale estrapolato dalla funzione di autocorrelazione che definisce la dispersione delle NPs in relazione alla loro distribuzione dimensionale. Il tipico range di valori è tra 0,01 per campioni monodispersi, e 0,5-0,7; valori  $>0,7$  indicano un'ampia polidispersione della dimensione delle particelle costituenti il campione.[78][79]

Successivamente si è valutata la stabilità della sospensione attraverso la determinazione del potenziale  $\zeta$ . Il potenziale  $\zeta$  è una proprietà fisica specifica di ogni sospensione particolata, macromolecola o materiale di superficie.[80] La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) lo definisce come potenziale elettrocinetico sul piano di scivolamento rispetto alla soluzione.[81] Il valore di potenziale  $\zeta$  fornisce indicazioni quantitative sulla stabilità di un sistema colloidale: se tutte le particelle in sospensione avessero un elevato valore di Potenziale  $\zeta$  ( $> \pm 30$  mV in valore assoluto) tenderebbero a respingersi tra loro rimanendo stabili. Viceversa, con bassi valori di potenziale  $\zeta$  (in valore assoluto)

tenderebbero ad aggregare e flocculare. Una sospensione instabile è quindi caratterizzata da valori di Potenziale  $\zeta$  compresi tra +30 e -30 mV.[80][82] (Fig. 18)

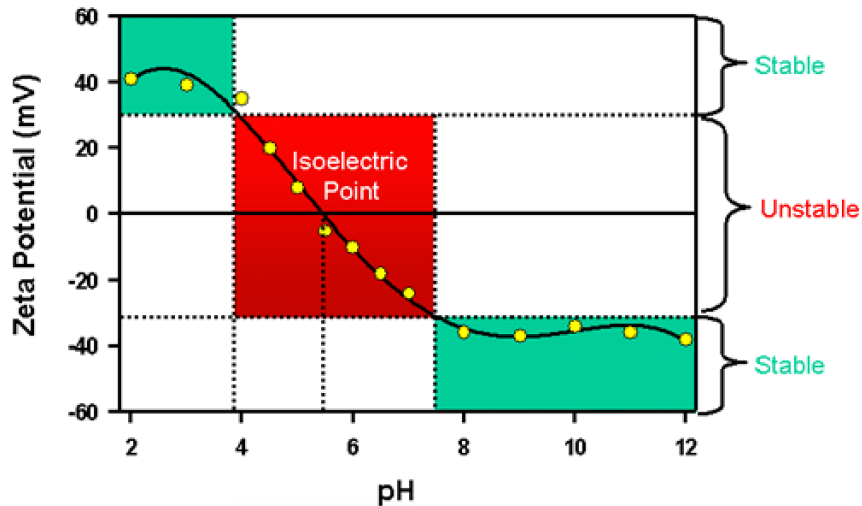


Figura 18: Tipico diagramma del Potenziale  $\zeta$  in funzione del pH. La figura è presa dalle note tecniche "Zeta potential – An introduction in 30 minutes" dell'azienda Malvern Panalytical.[80]

Il campione ML 1, al tempo  $t_1$ , risulta avere un valore elevato in valore assoluto, precisamente di -41,1 mV, che definisce la sospensione come stabile; è assente la presenza di precipitato per un tempo prolungato, di almeno quattro giorni. Il valore di potenziale  $\zeta$  è stato misurato una seconda volta e a  $t_2$  e risulta essere di -56,1 mV. Per poter effettuare le prove di citotossicità, è stato necessario conoscere la concentrazione delle Ag NPs in sospensione. Pur essendo una procedura molto studiata, i dati riguardanti questo parametro sono scarsi poiché, in generale, è complicato misurare la concentrazione delle NPs in sospensione e non si dispone di una bibliografia esaustiva al riguardo. Avendo riscontrato problematicità nel valutare la reale concentrazione delle NPs sia tramite analisi ICP-MS che applicando l'equazione di Lambert-Beer.[83] Si è deciso di ricavare il valore della concentrazione di  $Ag^0$  stimando una resa della reazione del 100%, quindi assumendo che tutto l' $Ag^+$  in soluzione venisse ridotto ad  $Ag^0$ , contribuendo alla formazione delle stesse Ag NPs. Essendo in presenza di un eccesso di agente riducente, è possibile supporre che tutto l' $Ag^+$  presente nella soluzione venga ridotto a  $Ag^0$ . Si è mantenuto questo metodo di stima della concentrazione per tutte le sintesi successive. Da questo calcolo, la concentrazione finale di  $Ag^0$  nel campione ML 1 è risultata essere di 0,15 g/L.

Si è quindi proceduto con l'ottimizzazione di una sintesi a concentrazione maggiore dei reagenti, cercando di mantenere la sospensione stabile, in modo da massimizzare la concentrazione di Ag NPs. Si è preparata una miscela con concentrazione iniziale dei reagenti di 2,5 mM (campione ML 2) con un pH di 7. Le ulteriori prove effettuate a concentrazioni superiori, purtroppo, sono risultate instabili e dunque non sono state analizzate. Il cambio del colore è avvenuto dopo 15 minuti dall'aggiunta dell'agente riducente. L'effettiva formazione delle Ag NPs è stata quindi confermata dal picco plasmonico a 422 nm (fig. 19). [84][85]

Dalle misure rilevate con il DLS, le Ag NPs presentano un  $d_H$  medio di 40 nm e un PDI medio di 0,596. Quest'ultimo valore indica che il campione presenta un discreto grado di polidispersione.[78]: [86]

Successivamente si è valutata la stabilità della sospensione attraverso la determinazione del potenziale  $\zeta$ . Quest'ultimo ha valore di -43,3 mV a t1 e di -48,6 mV a t2. Ciò indica una buona stabilità e difatti la sospensione non presenta precipitato nei 4 giorni successivi alla sua preparazione. I dati sono riassunti nella tabella 1.

Stimando una resa di reazione del 100% la concentrazione finale di  $Ag^0$  nella sospensione è di 0,25 g/L. Come atteso, la conferma della più elevata concentrazione di Ag NPs in quest'ultimo campione è data dal confronto dei relativi spettri UV: la concentrazione delle NPs, in generale, è più alta nel campione ML 2 poiché il rispettivo spettro UV è più intenso rispetto allo spettro UV del campione ML 1. (Fig. 19). Poiché, come atteso, la concentrazione del campione ML 2 è risultata più alta, si è deciso di mantenere come campione finale il campione ML 2.

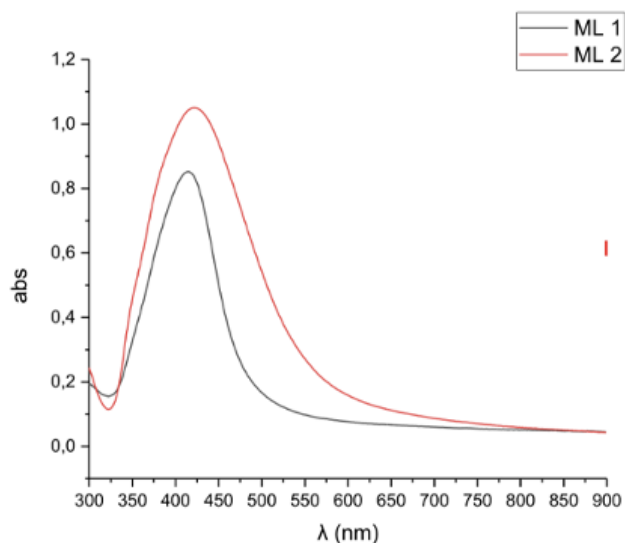


Figura 19: Confronto spettri UV di campioni ottenuti tramite riduzione chimica a partire da concentrazioni di  $\text{AgNO}_3$  differenti.

Tabella 1: Dati delle sintesi condotte a differenti concentrazioni dei reagenti.  $[\text{Ag}^0]$  riguarda la concentrazione stimata con una resa di reazione del 100%.

Campioni	$[\text{AgNO}_3]$ mmol/L	UV nm	DLS		Potenziale $\zeta$		$[\text{Ag}^0]$ g/L
			$d_H$ (nm)	PdI	t1 (mV)	t2 (mV)	
ML 1	1,0	416	58	0,504	-41,1	-56,1	0,15
ML 2	2,5	422	40	0,596	-43,3	-48,6	0,25

Successivamente sono state determinate le dimensioni medie e la morfologia delle Ag NPs presenti nel campione ML 2. mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) (Fig. 20). I dati ottenuti mostrano come la sospensione sia dimensionalmente polidispersa (ampiezza della distribuzione dimensionale) e come vi sia una generale uniformità morfologica delle Ag NPs ottenute; infatti, si nota una prevalenza di Ag NPs di  $44 \pm 10$  nm con morfologia sferica.

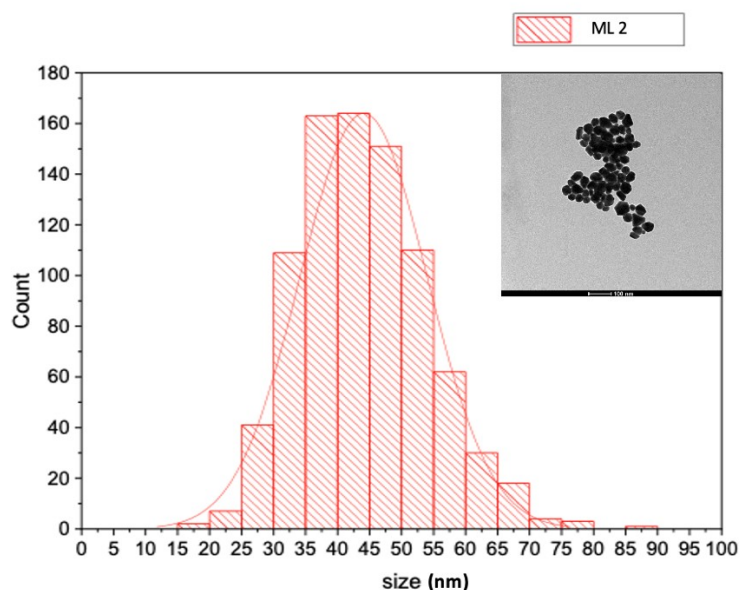


Figura 20: in alto a destra immagine TEM (su scala di 100 nm) delle Ag NPs sferiche del campione ML 2 ottenute tramite riduzione chimica, al centro il relativo grafico raffigurante la frequenza delle loro dimensioni con picco a 45 nm.

Per eseguire le successive prove di citotossicità si è ritenuto necessario misurare la stabilità del campione ML 2 in presenza di siero fetale bovino (FBS). L’FBS è una miscela di biomolecole utilizzata come supplemento per i terreni di coltura cellulare e risulta fondamentale per la crescita e il mantenimento delle cellule in coltura. Presupponendo una resa di reazione del 100% si è aggiunto un volume di FBS corrispondente al 3% (v/v) dopodiché si è proceduto alla misura del  $d_H$  medio e del potenziale  $\zeta$ . Le misure sono state effettuate il giorno stesso del trattamento. I dati sono riportati in tabella 2. A seguito dell’aggiunta del FBS in sospensione, è stato osservato un aumento del  $d_H$  medio del campione, come atteso, mentre il valore in modulo del potenziale  $\zeta$  è diminuito, indicativo di una minore stabilità della sospensione. Nonostante ciò, nel campione non si è verificata la formazione di precipitato nei due giorni successivi.

Tabella 2: Dati di DLS e Potenziale  $\zeta$  del campione ML 2 ottenuto tramite riduzione chimica pre e post trattamento con FBS.

Campione	Solvente	DLS		Potenziale $\zeta$
		$d_H$ (nm)	PdI	mV
ML 2	H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	40	0,596	-48,6
ML 2	H <sub>2</sub> O + FBS 3% v/v	118	0,216	-21,6

## 5.1.2. Riduzione biogenica

Per le Ag NPs ottenute tramite via biogenica si è utilizzato come agente riducente e stabilizzante l'infuso di tè nero, ricavato dall'infusione a temperatura ambiente (RT), per 15 minuti, di foglie di tè nero (1,75 g) in 300 ml di acqua milli-Q e successiva filtrazione a gravità.

La scelta di non ottenere un infuso con acqua scaldata è stata presa per ridurre sia il consumo energetico che per evitare la degradazione di alcuni composti organici presenti nel tè che potrebbero influenzare il risultato delle sintesi e delle proprietà delle Ag NPs.

La procedura di sintesi prevede l'aggiunta, alla soluzione di  $\text{AgNO}_3$ , dell'agente riducente, in questo caso, il tè nero.

Nonostante la sintesi biogenica sia promettente, di notevole interesse scientifico e sostenibile, i dati presenti in letteratura sono frammentari e parzialmente contraddittori.[56] Inoltre, seppur siano noti i principali composti presenti nel tè nero,[57][59][61] la formulazione di ogni infuso varia da marca a marca rendendo tale sintesi poco riproducibile. In letteratura vengono riportati i componenti elencati in fig. 10.

Nella riduzione biogenica si è cercato di valutare l'influenza dei composti del tè nero sui risultati delle sintesi, in particolare per quanto riguarda la morfologia e dimensione delle Ag NPs e la loro citotossicità.

Per capire quali fossero i parametri di sintesi migliori, si è partiti da una soluzione di  $\text{AgNO}_3$  1 mM sottoposta a riscaldamento (25, 40, 60 e 80°C), vari tempi di reazione (15, 30, 45 e 60 minuti) e vari rapporti volumetrici di soluzione di tè/ $\text{AgNO}_3$ . (1:12,5, 1:25, 1:50, 1:100 e 1:150) come riportato in tabella 3.

Tabella 3: Parametri di sintesi biogenica con infuso di tè nero.

<b>PARAMETRI</b>			
<b>T</b>	<b>Tempo di reazione</b>	<b>Concentrazione AgNO<sub>3</sub></b>	<b>Rapporto tra reagenti</b>
°C	min	mmol/L	v tè/v AgNO <sub>3</sub>
25 (RT)	15-30-45-60	1	1:12,5/25/50/100/150
40	30	1	1:25/50/100
60	30	1	1:25/50/100
80	30	1	1:25/50/100

Per ciascuna sintesi si è raccolto lo spettro UV per constatare l'avvenuta formazione delle Ag NPs attraverso la rilevazione della loro tipica LSPR alla lunghezza d'onda tra 350 e 450 nm.[75][78] Una volta verificato ciò, le varie sospensioni sono state poi analizzate attraverso la tecnica DLS per valutare la loro distribuzione dimensionale ed è stata inoltre determinata la loro stabilità nel tempo con il potenziale  $\zeta$ , misurandolo sia il giorno stesso alla sintesi (t1) che a quattro giorni di distanza (t2). Si sono analizzati tre rapporti volumetrici tè/ AgNO<sub>3</sub>: 1:25 (campione ML 10), 1:50 (ML 11) e 1:100 (ML 12). Per ciascuno dei tre rapporti si sono esplorati l'influenza della temperatura di reazione, del tempo di reazione e della quantità di agente riducente sulla cinetica di reazione, le dimensioni e la stabilità delle Ag NPs ottenute.

Dall'osservazione degli spettri UV (fig. 21) si può osservare che, tenendo costante il tempo di reazione a 30 minuti, la formazione di Ag NPs, avviene a temperature più alte di 60 °C indipendentemente dalla concentrazione di tè nero. A RT invece, non si osserva una chiara banda plasmonica relativa alla presenza di Ag NPs (fig. 21 C) per nessun campione, mentre a 40 °C solo nel campione ML 12 (v tè/ v AgNO<sub>3</sub> di 1:100) continua ad essere assente la banda plasmonica. Ciò fa pensare che la quantità di agente riducente utilizzato in quest'ultimo campione (v tè/ v AgNO<sub>3</sub> di 1:100) non sia sufficiente per la formazione delle Ag NPs nei 30 minuti di reazione a 40 °C, mentre a RT la cinetica di reazione risulta essere molto lenta e il solo aumento di concentrazione dell'agente riducente non è sufficiente per la formazione di quantità significative di Ag NPs.



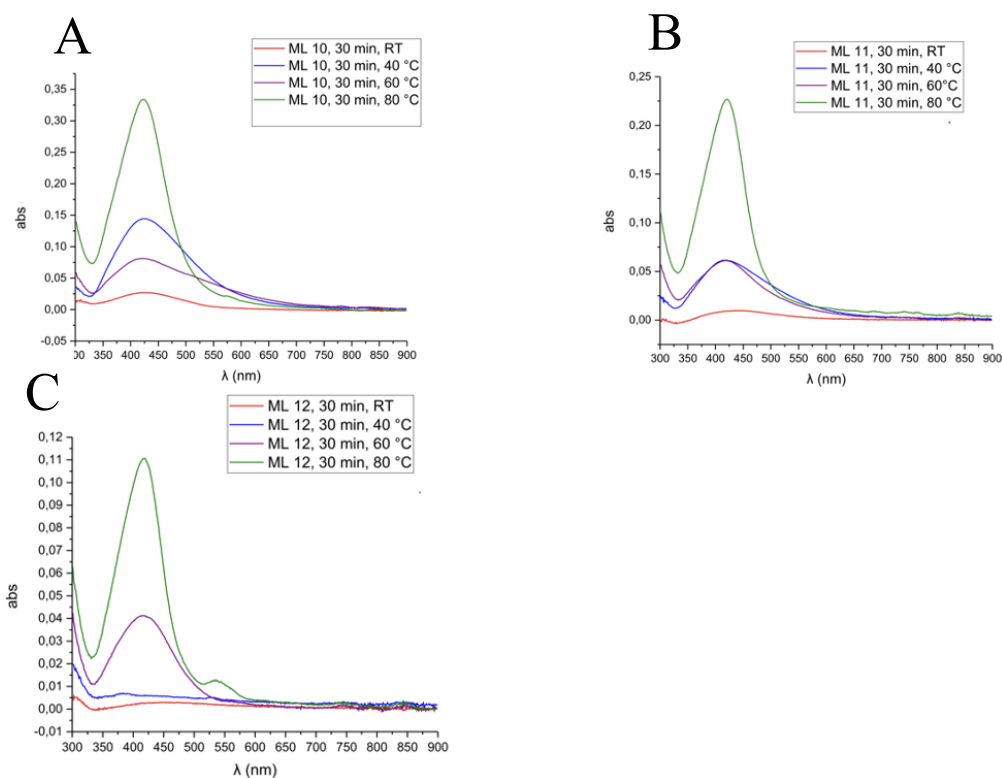


Figura 21: Spettri UV di ciascun campione a diverso rapporto  $v\ t\grave{e}/v\ AgNO_3$  sottoposto a varie temperature. A) ML 10 ( $v\ t\grave{e}/v\ AgNO_3$  di 1:25); B) ML 11 ( $v\ t\grave{e}/v\ AgNO_3$  di 1:50); C) ML 12 ( $v\ t\grave{e}/v\ AgNO_3$  di 1:100).

I campioni sono stati poi sottoposti a DLS e per ciascuno ne è stato valutato il relativo potenziale  $\zeta$ . In Tabella 4 e 5 sono riportati i dati delle sintesi ottenuti a RT. Rispetto ai campioni ottenuti a RT, per i campioni ottenuti a più alte temperature, si è notato un generale aumento delle dimensioni a  $t_1$  che tuttavia non seguiva un aumento lineare con l'aumento della temperatura. Inoltre i valori di potenziale  $\zeta$  dei suddetti campioni, al tempo  $t_1$ , sono risultati più bassi, in termini di valore assoluto, ed inoltre non è stata osservata alcuna correlazione tra il loro valore a  $t_1$  e  $t_2$ , né tra i valori di potenziale  $\zeta$  e la temperatura di reazione in generale, per questo non riportati in tabella 4 e 5.

Tabella 4: Diametro idrodinamico ( $d_H$ ) medio e relativa PdI di campioni ottenuti variando la temperatura e il rapporto volumetrico  $tè/AgNO_3$ .

Campioni	Rapporto volumetrico	DLS (t1)		DLS (t2)	
	v $tè/v$ $AgNO_3$	$d_H$ (nm)	PdI	$d_H$ (nm)	PdI
ML 10, 30min, RT	1 : 25	35	0,282	34	0,302
ML 11, 30 min, RT	1 : 50	41	0,425	40	0,402
ML 12, 30 min, RT	1 : 100	59	0,298	54	0,170

Tabella 5: Potenziale  $\zeta$  dei campioni ottenuti variando la temperatura e il rapporto volumetrico  $tè/AgNO_3$ .

Campioni	Rapporto volumetrico	Potenziale $\zeta$ (t1)	Potenziale $\zeta$ (t2)
	v $tè/v$ $AgNO_3$	mV	mV
ML 10, 30 min, RT	1 : 25	-23,3	-26,9
ML 11, 30 min, RT	1 : 50	-16,7	-25,2
ML 12, 30 min, RT	1 : 100	-22,4	-25,5

A seguire si sono effettuate delle prove con tempi di reazione differenti (15, 30, 45 e 60 minuti) sui campioni con v  $tè/v$   $AgNO_3$ . Tutte queste sintesi sono state realizzate a RT poiché, nonostante a questa temperatura la formazione delle Ag NPs sia scarsa, in termini quantitativi, rispetto alle corrispettive effettuate a temperature più elevate, come evidenziato dallo spettro UV (fig. 21), esse presentano valori più piccoli di  $d_H$  medio e valori di potenziale  $\zeta$  più negativi. (Tabella 4 e 5). Inoltre, la RT permette di non degradare le componenti organiche del  $tè$  oltre a ridurre il consumo energetico altrimenti richiesto per l'innalzamento della temperatura.

Gli spettri UV (fig. 22) mostrano una debole banda di assorbanza, che indica una scarsa formazione di Ag NPs in tutti i campioni. A RT, il tempo di reazione di 15 minuti risulta insufficiente a formare Ag NPs in tutti i campioni. Come atteso, si osserva in generale una relazione diretta tra aumento del tempo di reazione e aumento del numero e delle dimensioni di Ag NPs prodotte.[84][85][61] In fig. 22

C (ML 15, v tè/v AgNO<sub>3</sub> di 1:100) lo spettro UV mostra solo rumore di fondo, definendo quindi il rapporto v tè/v AgNO<sub>3</sub> di 1:100 insufficiente ad ottenere i nanomateriali di Ag a RT per i tempi di reazione testati.

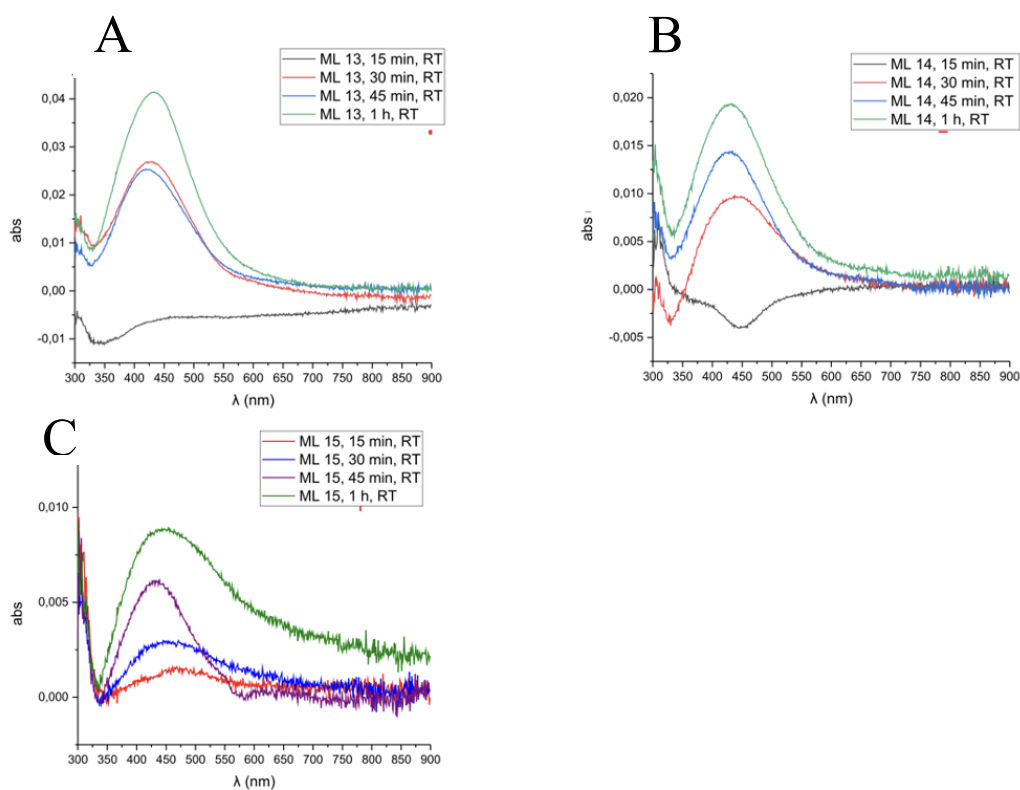


Figura 22: Spettri UV di ciascun campione a diverso rapporto v tè/v AgNO<sub>3</sub> sottoposto a vari tempi di reazione.

Dai valori di DLS e potenziale  $\zeta$  misurati (tabella 6 e 7) si può osservare come il tempo di reazione nei campioni con v tè/v AgNO<sub>3</sub> di 1:25 non influisca in modo sostanziale sulla dispersione dimensionale delle Ag NPs. Tuttavia, nei campioni con v tè/v AgNO<sub>3</sub> di 1:50 e 1:100, il tempo di reazione prolungato (1 h), in combinazione con la ridotta quantità di agente riducente e stabilizzante, favorirebbe l'aumento delle dimensioni e il fenomeno di aggregazione. Inoltre, il  $d_H$  a  $t_2$  dei campioni ottenuti da un tempo di reazione di un'ora è equiparabile a quello degli altri campioni ottenuti con tempi di reazione inferiori. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nell'evento di peptizzazione, ovvero la ridispersione di un flocc in modo da formare una sospensione colloidale.[87]

Riguardo al potenziale  $\zeta$ , confrontando i valori a  $t_1$  e  $t_2$  di tutti i campioni, si può osservare la tendenza ad assumere valori più negativi.

Tabella 6: Diametro idrodinamico medio e relativa Pdl di campioni ottenuti variando il tempo di reazione e il rapporto volumetrico tè/AgNO<sub>3</sub>.

Campioni	Rapporto volumetrico v tè/v AgNO <sub>3</sub>	DLS (t1)		DLS (t2)	
		d <sub>H</sub> (nm)	PdI	d <sub>H</sub> (nm)	PdI
ML 13, 15 min, RT	1 : 25	32	0,304	36	0,437
ML 13, 30 min, RT	1 : 25	35	0,282	34	0,302
ML 13, 45 min, RT	1 : 25	34	0,325	37	0,370
ML 13, 1 h, RT	1 : 25	34	0,205	36	0,371
ML 14, 15 min, RT	1 : 50	37	0,264	33	0,313
ML 14, 30 min, RT	1 : 50	41	0,425	40	0,402
ML 14, 45 min, RT	1 : 50	34	0,325	37	0,370
ML 14, 1 h, RT	1 : 50	87	0,192	43	0,352
ML 15, 15 min, RT	1 : 100	37	0,551	36	0,362
ML 15, 30 min, RT	1 : 100	59	0,298	54	0,170
ML 15, 45 min, RT	1 : 100	43	0,436	44	0,349
ML 15, 1 h, RT	1 : 100	179	0,311	73	0,178

Tabella 7: Potenziale  $\zeta$  di campioni ottenuti variando il tempo di reazione e rapporto volumetrico  $t\grave{e}/AgNO_3$ .

Campioni	Rapporto volumetrico	Potenziale $\zeta$ (t1)	Potenziale $\zeta$ (t2)
	v $t\grave{e}/v$ $AgNO_3$	mV	mV
ML 13, 15 min, RT	1 : 25	-21,7	-26,4
ML 13, 30 min, RT	1 : 25	-23,3	-26,9
ML 13, 45 min, RT	1 : 25	-17,8	-22,7
ML 13, 1 h, RT	1 : 25	-24,0	-25,0
ML 14, 15 min, RT	1 : 50	-21,2	-25,0
ML 14, 30 min, RT	1 : 50	-16,7	-25,2
ML 14, 45 min, RT	1 : 50	-19,3	-26,0
ML 14, 1 h, RT	1 : 50	-18,8	-25,1
ML 15, 15 min, RT	1 : 100	-25,1	-25,5
ML 15, 30 min, RT	1 : 100	-22,4	-25,5
ML 15, 45 min, RT	1 : 100	-16,7	-25,8
ML 15, 1 h, RT	1 : 100	-23,3	-23,9

Successivamente si è deciso di studiare ulteriormente come il diverso rapporto volumetrico v  $t\grave{e}/v$   $AgNO_3$ , influenzi le caratteristiche delle Ag NPs sintetizzate, a parità di temperatura e tempo di agitazione. (Tabella 8 e 9) In particolare, sono state ottimizzate due sintesi a volume decrescente di agente riducente. Ai già noti rapporti volumetrici v  $t\grave{e}/v$   $AgNO_3$ , (1:25, 1:50, 1:100) se ne sono aggiunti altri due: 1:12,5 e 1:150, rispettivamente corrispondenti ai campioni ML 16 e ML 17. Tale integrazione è stata effettuata per confermare la tendenza già osservata nelle prove sperimentali precedenti riguardo la relazione diretta tra quantità di agente riducente utilizzato e quantità di Ag NPs ottenute a parità di tempo di reazione e temperatura. Il seguente confronto degli spettri UV (fig. 23) convalida il *trend* secondo il quale l'aumento della quantità di agente riducente favorisca la formazione delle NPs.

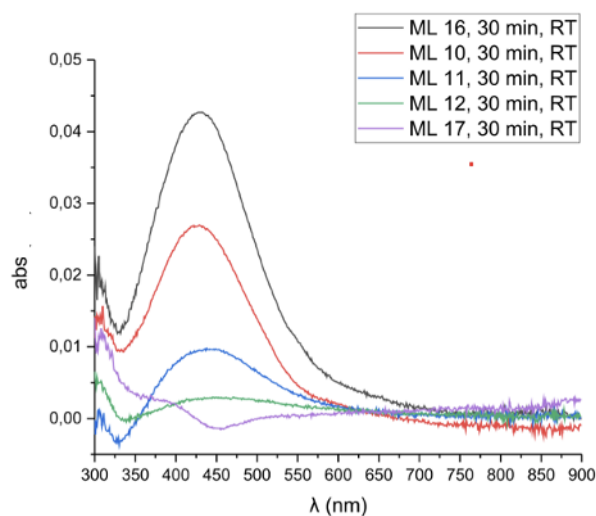


Figura 23: Spettri UV dei campioni a diverso rapporto v tè/v AgNO<sub>3</sub>.

Dai dati di  $d_H$ , soprattutto a t<sub>2</sub>, si osserva come a parità di condizioni di reazione, all'aumentare del volume di agente riducente utilizzato il  $d_H$  delle Ag NPs diminuisca. Le sospensioni ottenute risultano tuttavia poco stabili, come evidenziato dai bassi valori di potenziale  $\zeta$ . (Tabella 8 e 9)

Tabella 8: Dimensioni e PdI a t<sub>1</sub> e t<sub>2</sub> di campioni con rapporti volumetrici di tè/AgNO<sub>3</sub> differenti.

Campioni	Rapporto volumetrico v tè/v AgNO <sub>3</sub>	DLS (t <sub>1</sub> )		DLS (t <sub>2</sub> )	
		$d_H$ (nm)	PdI	$d_H$ (nm)	PdI
ML 16, 30 min, RT	1 : 12,5	34	0,398	37	0,467
ML 10, 30 min, RT	1 : 25	35	0,282	34	0,302
ML 11, 30 min, RT	1 : 50	41	0,425	40	0,402
ML 12, 30 min, RT	1 : 100	59	0,298	54	0,170
ML 17, 30 min, RT	1 : 150	50	0,260	55	0,277

Tabella 9: Potenziale  $\zeta$  dei campioni con differente rapporto volumetrico di  $t\grave{e}/AgNO_3$ .

Campioni	Rapporto	Potenziale $\zeta$ (t1)	Potenziale $\zeta$ (t2)
	volumetrico v $t\grave{e}/v$ $AgNO_3$	mV	mV
ML 16, 30 min, RT	1 : 12,5	-20,9	-22,1
ML 10, 30 min, RT	1 : 25	-23,3	-26,9
ML 11, 30 min, RT	1 : 50	-16,7	-25,2
ML 12, 30 min, RT	1 : 100	-22,4	-25,5
ML 17, 30 min, RT	1 : 150	-16,5	-20,7

Nonostante a RT si osservi una ridotta formazione di Ag NPs (per le condizioni testate), esse presentano dei risultati pi\ugre regolari rispetto alle Ag NPs ottenute a temperature pi\ugre alte ed inoltre, in accordo con i principi generali della *Green Chemistry* che prevedono la salvaguardia dell'uomo e dell'ambiente tramite l'utilizzo di reagenti non tossici e l'ottimizzazione di reazioni per ridurre il consumo di energia,[56][88] si \e deciso di concentrarsi sulle sintesi con concentrazione di  $AgNO_3$  di 1 mM, v  $t\grave{e}/v$   $AgNO_3$  di 1:12,5, condotte a RT e tempo di reazione di 30 minuti (campione ML 16).

Con lo scopo di ottenere una sospensione con quantit\ugre di Ag NPs maggiore, tenendo in considerazione i parametri di reazione del campione ML 16, si \e pensato di aumentare la concentrazione di  $AgNO_3$  a 2,5 mM e di variare ulteriormente i rapporti volumetrici tra v  $t\grave{e}/v$   $AgNO_3$ . Tale concentrazione \e stata adottata per confrontare con la stessa concentrazione di  $AgNO_3$  utilizzata nella riduzione chimica. Sono state effettuate 3 ulteriori sintesi biogeniche con seguente rapporto v  $t\grave{e}/v$   $AgNO_3$ : 1:2 (campione ML 18), 1:10 (ML 19) e 1:100 (ML 20). Quest'ultimo rapporto \e stato mantenuto come confronto. L'effettiva formazione delle Ag NPs \e stata verificata tramite l'acquisizione del relativo spettro UV. Dal loro confronto, fig. 24, il campione ML 19 con rapporto volumetrico v  $t\grave{e}/v$   $AgNO_3$  di 1:10 \e stato reputato il migliore in quanto quello con rapporto 1:100 (ML 20), non mostra bande plasmoniche ascrivibili alla formazione di Ag NPs mentre quello con rapporto 1:2 (ML 18), seppur mostrando una maggiore presenza di Ag NPs, \e risultato poco stabile data la precoce formazione di precipitato (poche ore dopo la fine della

sintesi). La rimanente, con v tè/v AgNO<sub>3</sub> di 1:10, presenta una chiara formazione di Ag NPs data dal plasmone a 422 nm ed assenza di precipitato.

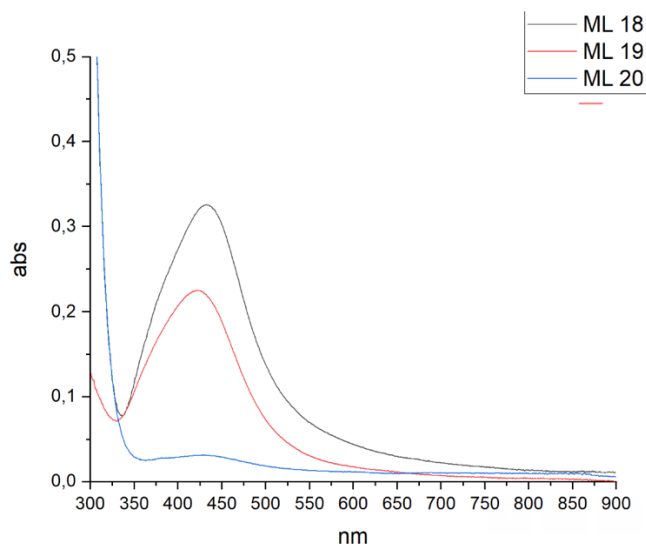


Figura 24: Confronto spettri UV dei campioni con v tè/v AgNO<sub>3</sub>: 1:2 (ML 18), 1:10 (ML 19) e 1:100 (ML 20).

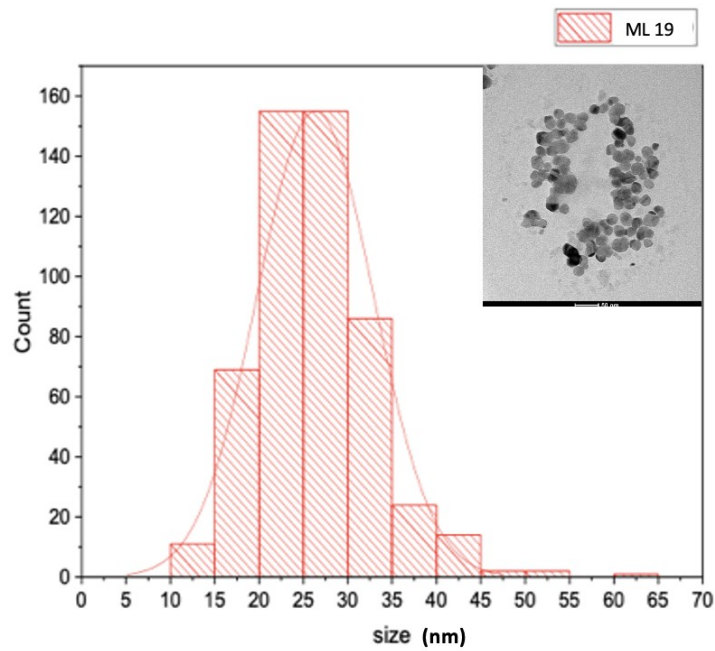
Le sintesi sono state svolte a RT ma dopo 30 minuti non è stato osservato nessun cambio di colore. La formazione delle Ag NPs, evidenziata dal cambio colore a giallo-marrone, avviene dopo 2 ore dall'aggiunta del tè nero. Questo drastico aumento del tempo di reazione si ipotizza possa essere dovuto sia alla RT a cui sono state condotte le sintesi sia all'aumento della concentrazione del sale in soluzione e alla quantità di agente riducente che non risulta ottimale a far avvenire la reazione in tempi minori.

L'utilizzo del DLS ha permesso di determinarne la distribuzione dimensionale e il PDI. Le Ag NPs risultano avere un  $d_H$  di 40 nm ed una PDI di 0,355, quindi la sospensione tende ad essere leggermente polidispersa.

Il valore del potenziale  $\zeta$  a t1 è di -14,8 mV e a t2 diminuisce a -24,3 mV. Entrambi i valori rientrano nel range di instabilità compreso tra +30 e -30 mV, denotando la relativa instabilità del campione. Nei quattro giorni successivi alla sintesi, tuttavia, la sospensione non presenta precipitato.

Tramite il TEM si è definita la morfologia e con l'utilizzo di ImageJ le dimensioni medie delle Ag NPs, da cui poi si è ricavato il grafico della frequenza delle dimensioni. (Fig. 25) La morfologia è prevalentemente sferoidale con una maggioranza di Ag NPs dal diametro di  $26 \pm 6$  nm.





*Figura 25: in alto a destra immagine TEM (in scala di 50 nm) delle Ag NPs sferiche ottenute tramite riduzione biogenica, al centro il rispettivo grafico raffigurante la frequenza delle loro dimensioni con picco a 26 nm.*

Dall'analisi TEM si è inoltre osservato come le Ag NPs ottenute non fossero morfologicamente uniformi. Infatti, oltre alla maggioranza di Ag NPs di forma sferoidale se ne osservano altre di forma differente, dalle dimensioni notevolmente più grandi. In fig. 26 si può notare come questi ulteriori prodotti di reazione abbiano una morfologia cubica e dimensioni medie di  $164 \pm 52$  nm.

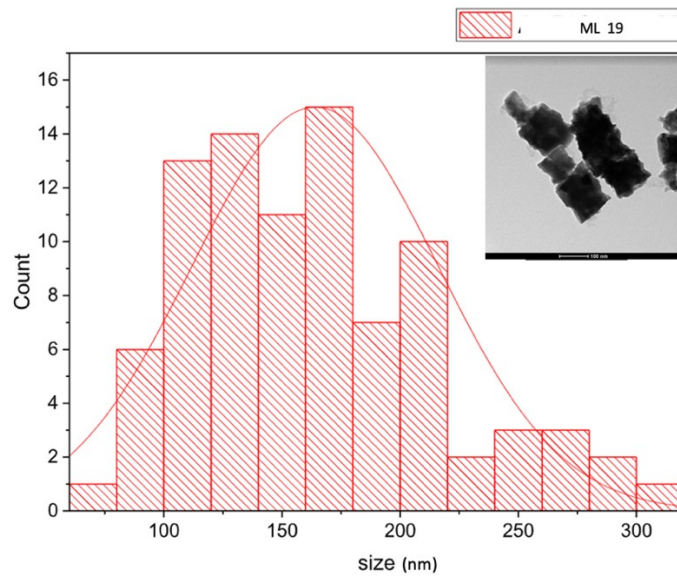


Figura 26: in alto a destra immagine TEM (in scala di 100 nm) dei prodotti presenti nel campione ML 19, al centro il rispettivo grafico raffigurante la frequenza delle loro dimensioni.

Assumendo una resa di reazione del 100% la concentrazione finale di  $\text{Ag}^0$  è di 0,25 g/L. Tale concentrazione è stata reputata adeguata allo svolgimento delle prove di citotossicità stabilendo di terminare la fine delle prove a concentrazioni iniziali più alte di  $\text{AgNO}_3$ . Questo campione, scelto come campione definitivo, presenta un pH di 4.

Anche in questo caso si è misurata la stabilità del campione ML 19 in presenza di FBS. Presupponendo una resa di reazione del 100% si è aggiunto un volume di FBS corrispondente al 3% (v/v) procedendo alla misura del  $d_H$  medio e del potenziale  $\zeta$ . Le misure sono state effettuate il giorno stesso del trattamento. I dati sono riportati in tabella 10. Nonostante la distribuzione dimensionale del campione sia aumentata e i valori di stabilità non abbiano subito particolari variazioni, nel campione non si è verificata la formazione di precipitato nei due giorni successivi.

Tabella 10: Dati DLS e Potenziale  $\zeta$  del campione ML 19 di derivazione biogenica pre e post trattamento con FBS.

Campione	Solvente	DLS		Potenziale $\zeta$
		$d_H$ (nm)	PdI	mV
ML 19	$\text{H}_2\text{O} + \text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$	40	0,355	-24,3
ML 19	$\text{H}_2\text{O} + \text{FBS } 3\% \text{ v/v}$	111	0,175	-24,9

### 5.1.3. Confronto delle nanoparticelle ottenute

I campioni ML 2 e ML 19 hanno un pH rispettivamente di 7 e 4; il pH neutro del primo campione si pensa sia dovuto al  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ , base coniugata dell'acido citrico, che possiede un pH 7,5-9,0 (50 g/L,  $H_2O$ , 25 °C).[89] Viceversa il pH acido del campione biogenico ML 19 si pensa sia dovuto al pH del tè nero che è di 5. Tutti i valori di pH, tranne quello del  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ , sono stati ottenuti tramite l'utilizzo del pH-metro.

Dal confronto dello spettro UV (fig. 27) si può osservare l'avvenuta formazione delle Ag NPs in entrambe le sintesi poiché si rileva il relativo plasmon a 422 nm. La maggiore intensità dello spettro UV del campione ML 2 rispetto al campione ML 19 può essere ascritto alla maggiore concentrazione delle Ag NPs.[84] Osservando questa differenza tra i due campioni, in generale si può ipotizzare che le rese di reazione delle due sintesi siano ben diverse e che la riduzione chimica abbia una resa di reazione molto maggiore rispetto alla riduzione biogenica. Le motivazioni potrebbero essere molteplici: innanzitutto la sintesi chimica, a differenza della biogenica, prevede un protocollo standardizzato.[17][90] Un altro fattore determinante potrebbe essere l'agente riducente utilizzato, quindi, l'attività riducente e stabilizzante del  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$  potrebbe essere più elevata del tè nero permettendo così una più efficace formazione delle Ag NPs.[78][90] Inoltre, la temperatura potrebbe aver influito sulla formazione delle Ag NPs. Infatti, alcuni studi osservano come l'aumento della temperatura avvantaggi l'unione dei nuclei favorendo la formazione delle Ag NPs.[78]

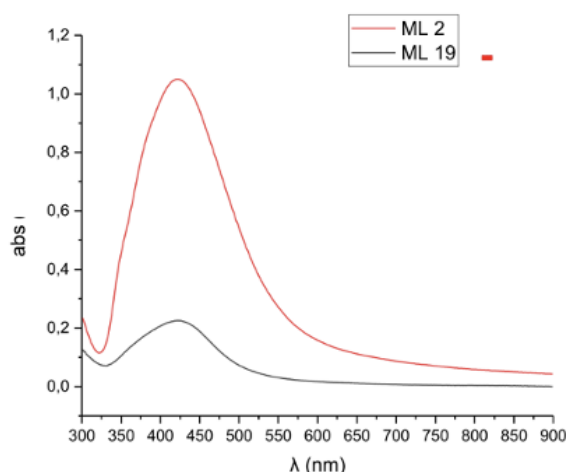


Figura 27: Confronto spettri UV di Ag NPs di origine chimica (ML 2) e biogenica (ML 19).

è noto che la temperatura, oltre a facilitare la formazione delle Ag NPs, influenza anche le loro dimensioni: alcuni studi riportano che aumentando la temperatura si ottengono NPs di piccolo diametro[91] mentre altri asseriscono il contrario.[78][92] Dalle immagini TEM (fig. 28) le dimensioni del campione ML 2 sono di  $44 \pm 10$  nm, mentre quelle del campione ML 19 sono di  $26 \pm 6$  nm. Anche i relativi grafici riguardanti la frequenza delle dimensioni indicano che il campione ML 2 presenta una maggiore polidispersione dimensionale. Sulla base di ciò si potrebbe ipotizzare che la temperatura di  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  della riduzione chimica, aumentando l'energia cinetica del sistema,[93] possa aver favorito l'unione di più nuclei a formare Ag NPs e anche l'adsorbimento dell' $\text{Ag}^0$  sulla superficie delle Ag NPs portando alla formazione di una maggior quantità di Ag NPs dalle più dimensioni grandi.

Dall'analisi TEM, la sintesi biogenica ha mostrato, oltre la presenza di Ag NPs sferoidali, prodotti dalle dimensioni notevolmente più grandi e di forma cubica. (Fig. 28 C) Ciò ci fa ipotizzare che l'attività riducente e stabilizzante del tè nero non sia tale da poter ottenere delle Ag NPs morfologicamente uniformi.

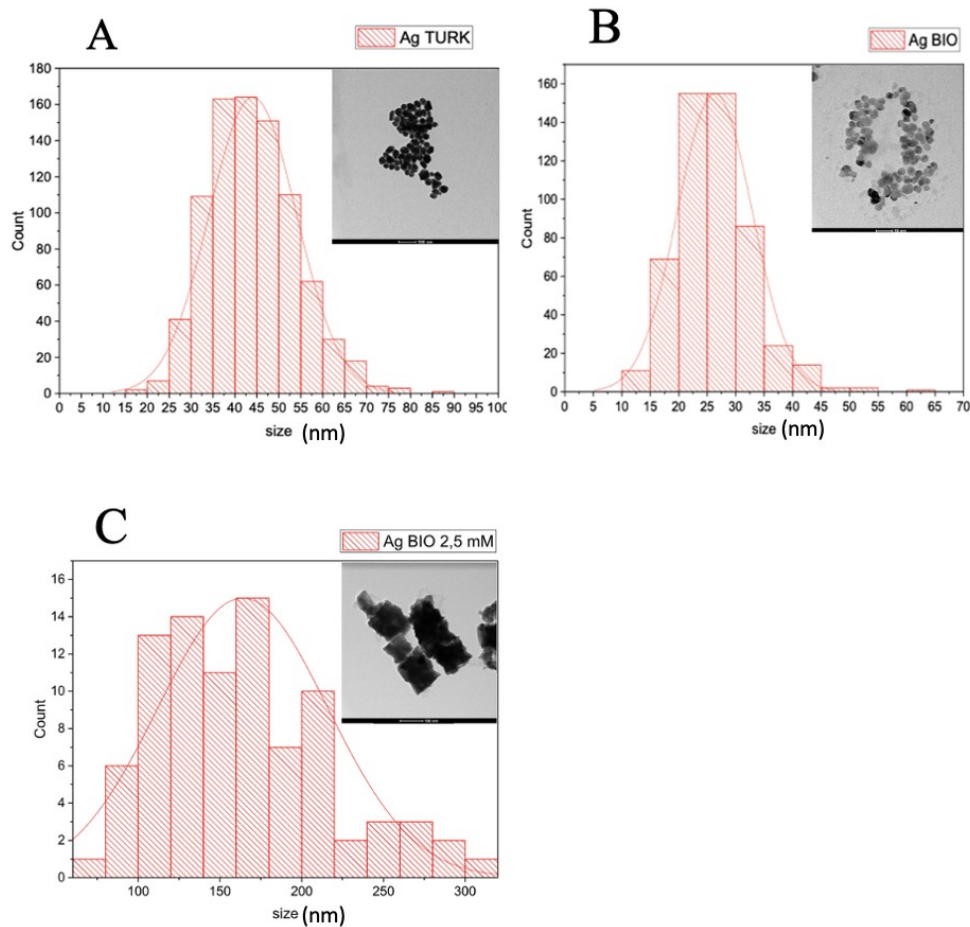


Figura 28: Confronto immagini TEM. A) Ag NPs di sintesi chimica su scala di 100 nm; B) Ag NPs sferiche di sintesi biogenica su scala di 50 nm; C) Prodotto di forma cubica presente nella sintesi biogenica con concentrazione di  $\text{AgNO}_3$  iniziale di 2,5 mM su scala di 100 nm.

A distanza di quattro giorni, il valore di potenziale  $\zeta$  aumenta in valore assoluto passando da -43 a -49 mV per le Ag NPs di origine chimica e da -14,8 a -24,3 per le Ag NPs di origine biogenica. In entrambe le sintesi non si verifica formazione di precipitato in questo lasso di tempo. Tale andamento ci indica, come in entrambi i campioni, si verifichi un aumento delle cariche negative sul piano di scivolamento delle NPs.

Per i campioni ML 2 e ML 19 trattati con siero, appaiono evidenti le variazioni riguardo la loro distribuzione dimensionale; mentre, per quanto riguarda il potenziale  $\zeta$ , il campione ML 2 citrato stabilizzato subisce una forte destabilizzazione a seguito del trattamento con FBS denotata dalla diminuzione del relativo valore in termini assoluti (da -49 mV a t2 a -21,6 dopo trattamento con

FBS), mentre il campione ML 19 il valore rimane simile al caso senza l'aggiunta di siero. (Tabella 11)

Tabella 11: Dati DLS e Potenziale  $\zeta$  dei campioni ML 2 e ML 19 trattati con e senza FBS.

Campione	Solvente	DLS		Potenziale $\zeta$
		$d_H$ (nm)	PdI	mV
ML 2	H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	40	0,596	-48,6
ML 19	H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	40	0,355	-24,3
ML 2	H <sub>2</sub> O + FBS 3% v/v	118	0,216	-21,6
ML 19	H <sub>2</sub> O + FBS 3% v/v	111	0,175	-24,9

Il notevole aumento della distribuzione dimensionale di entrambi i campioni potrebbe fare presupporre che il trattamento con FBS al 3% (v/v) possa aver causato aggregazione delle Ag NPs. Tuttavia, l'ipotesi più accreditata è attribuita alla formazione di una corona proteica attorno alle Ag NPs. Casals et al.,[94] [103] nel loro studio, hanno osservato come le Ag NPs citrato stabilizzate trattate con terreno di coltura base (senza FBS) risultino instabili precipitando, a differenza di quelle trattate con terreno di coltura completo (con FBS al 10 % v/v). La spiegazione risiede nel processo di adsorbimento/coniugazione delle proteine alla superficie delle Ag NPs. Tale processo di adsorbimento determina una repulsione sterica tra le Ag NPs (stabilizzandole) e risulta più veloce rispetto al fenomeno di aggregazione. Infatti, a conferma di ciò, i  $d_H$  delle Ag NPs dopo il trattamento risultano essere molto più ampi senza osservare formazione di precipitato. Le variazioni del potenziale  $\zeta$  sono presumibilmente dovute a delle biomolecole appartenenti al siero che sono rimaste adsorbite sulle NPs, le quali posseggono una carica dipendente dal pH e che quindi influenzano i valori di potenziale  $\zeta$ . In particolare, in letteratura,[94] [103] si osserva come le proteine del siero in terreno di coltura cellulare abbiano un potenziale  $\zeta$  di -8 mV. Quest'ultime, nel campione ML 2 con pH 7, potrebbero essersi adsorbite sulla superficie delle nanoparticelle e/o interagire mediante forze intermolecolari con le molecole di citrati adsorbite su di esse, andando quindi ad alterare i suoi valori di potenziale  $\zeta$ . Nel campione ML 19, con pH 5, alcune proteine del siero potrebbero esser state protonate, tuttavia il loro adsorbimento sulle Ag NPs potrebbe essere stato ostacolato dall'ingombro

sterico dei polifenoli sulla superficie, facendo rimanere invariati i rispettivi valori di potenziale  $\zeta$ .

## 5.2. Nanoparticelle d'oro

Le nanoparticelle d'oro (Au NPs) sono state ottenute tramite riduzione chimica e biogenica dell'acido tetracloroaurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), un sale precursore di molti composti d'oro. Anche in questo caso, l'agente riducente utilizzato nella sintesi chimica è il trisodio citrato diidrato ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), mentre nella biogenica l'infuso di tè nero (marca Lipton). (paragrafi 5.2.1 e 5.2.2.)

Il meccanismo generale di formazione delle Au NPs è simile entrambe le due vie di sintesi: dopo l'iniziale riduzione dello ione metallico  $\text{Au}^{3+}$  e la conseguente formazione di oro metallico  $\text{Au}^0$ , si osserva l'aggregazione di più atomi di  $\text{Au}^0$  a formare nuclei (detti seeds o particelle). Gli step successivi riguardano la continua riduzione dell'oro da ione a metallo e l'accrescimento delle particelle grazie a fenomeni di crescita e all'adsorbimento degli atomi di  $\text{Au}^0$  sulla loro superficie. Una volta consumato tutto il precursore la reazione si interrompe. Si ottengono così le Au NPs.[26][95] (Fig. 29)

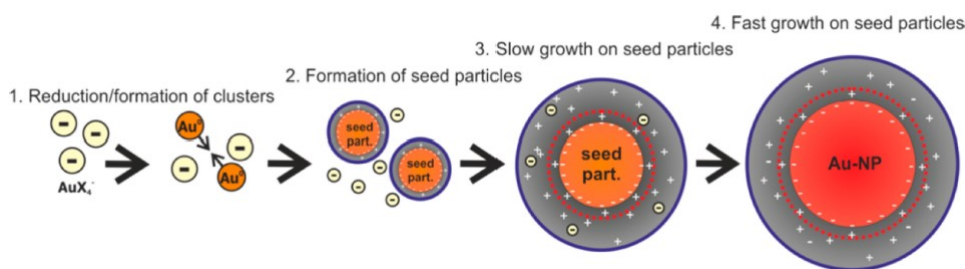
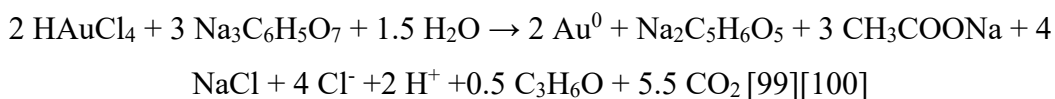


Figura 29: Formazione di nanoparticelle d'oro per riduzione chimica.[26][95]

### 5.2.1. Riduzione chimica

Le Au NPs citrato-stabilizzate, sono state ottenute seguendo il protocollo Turkevich, il primo e il più conosciuto protocollo ideato per la loro formazione.[17][96]

La procedura è molto semplice e permette di ottenere Au NPs con diametri compresi tra 5 e 150 nm citrato-stabilizzate. Quest'ultimo, viene largamente utilizzato può essere facilmente sostituito da leganti con maggiore affinità per l'Au (es. tioli) permettendo la multi-funzionalizzazione delle stesse Au NPs.[97] Il protocollo prevede che, una volta portata a temperatura di ebollizione la soluzione di HAuCl<sub>4</sub>, si proceda con la lenta aggiunta dell'agente riducente sotto costante agitazione. Sia il riscaldamento che l'agitazione vengono interrotti quando la sintesi assume un colore rosso scuro che denota l'effettiva formazione delle Au NPs.[98] La stechiometria di questa reazione può essere così descritta:



Partendo dal protocollo Turkevich [17] si è condotta una sintesi con concentrazione iniziale di HAuCl<sub>4</sub> di 1 mM e di C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 1% p/V (campione Au 1 mM TURK) in acqua mill-Q. Questa è stata poi caratterizzata tramite acquisizione dello spettro UV-Vis, sottoposta a DLS per conoscere la distribuzione dimensionale e la Pdl e ne è stata valutata la stabilità con il potenziale ζ. Quest'ultima misura, rispetto alle altre, è stata presa sia il giorno stesso della sintesi (t1) che a quattro giorni di distanza (t2). La caratterizzazione è terminata con l'analisi TEM dei campioni finali.

E' noto che lo spettro di assorbimento di una dispersione di Au NPs sferiche presenti un LSP nella banda attorno ai 520 nm.[77],[98] L'avvenuta formazione delle Au NPs è stata quindi osservata tramite la spettroscopia UV-Vis: il campione Au 1 mM TURK, infatti, presenta il LSP alla lunghezza d'onda di 524 nm che conferma la presenza di colloidi d'oro sferici in sospensione. (Fig. 30) Dall'analisi del DLS è risultato che le Au NPs ottenute hanno un d<sub>H</sub> medio di 19 nm con una Pdl di 0,575 che ne indica un elevato grado di polidispersione. Per quanto riguarda la stabilità della sospensione, nonostante non si verifichi la presenza di precipitato nei quattro giorni seguenti l'allestimento della sintesi, il valore di potenziale ζ decresce notevolmente da t1 a t2, passando da -58,5 a -28,5 mV. Infine, per effettuare le prove di citotossicità si è calcolata la concentrazione di Au NPs presenti nella sospensione colloidale ottenuta. Anche in questo caso si è assunto che



la resa della reazione fosse del 100%, ottenendo così una concentrazione di Au<sup>0</sup> in soluzione di 0,18 g/L. Tutti i dati sono riportati nella tabella 12.

Con l'obiettivo di ottenere una sospensione con concentrazione massima di Au NPs si è cercato di aumentare la concentrazione dei reagenti di partenza provando a mantenere inalterata la stabilità delle sospensioni. Si è effettuata una sintesi con concentrazione di HAuCl<sub>4</sub> di 2,5 mM e di C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 1% p/V (campione Au 2,5 mM TURK), per creare condizioni confrontabili con la precedente riduzione chimica dell'AgNO<sub>3</sub>. Il cambio di colore a rosso scuro si verifica dopo pochi minuti dall'aggiunta dell'agente riducente. L'acquisizione dello spettro UV ha permesso di constatare l'avvenuta formazione delle Au NPs data la presenza del LSP a 524 nm. (Fig. 30) Inoltre, si può osservare come la concentrazione dei nanoprodotti, in generale, sia più alta nel campione Au 2,5 mM, poiché il rispettivo spettro UV risulta essere più intenso rispetto al campione Au 1,0 mM. (Fig. 30) Infatti, considerando che la resa di reazione sia del 100%, partendo da una concentrazione maggiore di sale precursore e lavorando in eccesso di agente riducente, tutto l'Au<sup>3+</sup> derivante dal sale si presume venga ridotto a Au<sup>0</sup> che concorre nella formazione e accrescimento delle Au NPs. La concentrazione finale di Au<sup>0</sup> è risultata essere di 0,45 g/L. I dati sono riassunti in tabella 12.

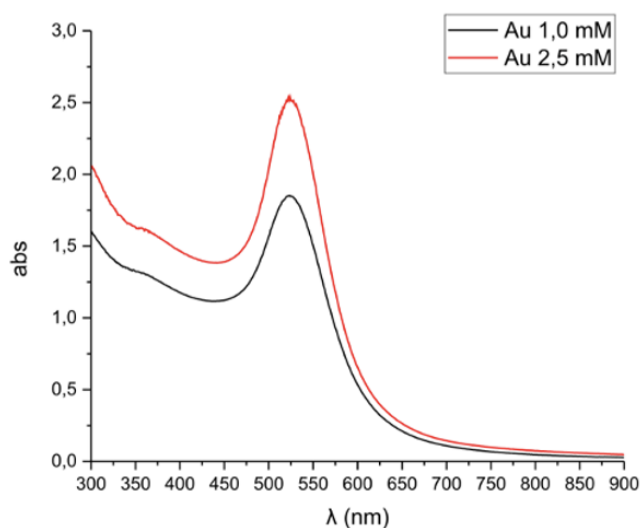


Figura 30: Confronto spettri UV dei campioni ottenuti tramite riduzione chimica a partire da concentrazioni differenti dei reagenti di partenza: Au 1 mM e Au 2,5 mM.

Dal DLS, il  $d_H$  medio delle NPs risulta di 29 nm con un valore di PDI di 0,519 che ne indica il discreto grado di polidispersione dimensionale. La sospensione ha una buona stabilità difatti non si verifica formazione di precipitato nei quattro giorni successivi alla sintesi; il potenziale  $\zeta$  a t1 e t2 segue la stessa tendenza osservata con il campione precedente con una decrescita del valore in termini di valore assoluto: da -49,3 mV a t1 si arriva a -45,9 mV a t2. Nonostante ciò, questi valori indicano una buona stabilità della sospensione colloidale.

*Tabella 12: Dati caratterizzanti i due campioni a diverse concentrazioni di HAuCl<sub>4</sub> ottenuti con protocollo Turkevich. La concentrazione di Au<sup>0</sup> è stimata secondo una resa di reazione del 100%.*

Campioni	UV	DLS		Potenziale $\zeta$		TEM	[Au <sup>0</sup> ]
	nm	$d_H$ (nm)	PDI	t1 (mV)	t2 (mV)	nm	g/L
Au 1,0 mM	524	19	0,575	-58,5	-28,5	/	0,18
Au 2,5 mM	524	29	0,519	-49,3	-45,9	32±4	0,45

Ulteriori sintesi a concentrazioni maggiori dei reagenti di partenza non sono state effettuate. La motivazione riguarda i buoni dati ottenuti a concentrazione iniziale di 2,5 mM di HAuCl<sub>4</sub> e la scelta di avere concentrazioni simili tra le sintesi di nanomateriali di argento e oro per rendere paragonabili le successive prove di citotossicità. Sulla base di ciò, tra i due campioni la scelta è ricaduta sul campione Au 2,5 mM come campione finale caratterizzato da un pH di 5.

Il campione è stato poi sottoposto ad analisi TEM. Dalle immagini ottenute, grazie ad ImageJ si è ricavata la dimensione delle Au NPs e realizzato il relativo grafico riguardante la frequenza delle dimensioni. (Fig. 31) I dati ottenuti mostrano la presenza di Au NPs con un'uniforme morfologia sferoidale dalle dimensioni medie di  $32 \pm 4$  nm.

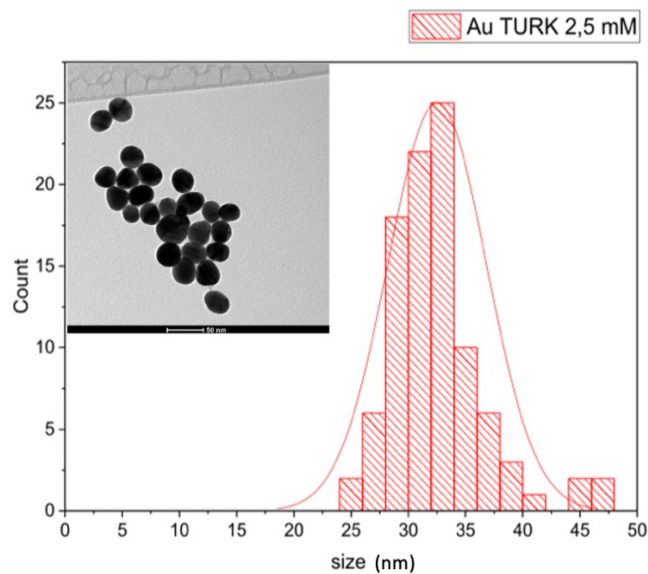


Figura 31: In alto a sinistra immagini TEM (scala di 50 nm) del campione Au 2,5 mM ottenuto tramite metodo Turkevich. Al centro il grafico relativo alla frequenza delle dimensioni delle Au NPs sintetizzate.

Per eseguire le successive prove di citotossicità si è ritenuto necessario misurare la stabilità del campione Au 2,5 mM in presenza di FBS. Come nei casi precedenti, si è presupposta una resa di reazione del 100%, dunque si è aggiunto un volume di FBS corrispondente al 3% (v/v) e dopodiché si è proceduto alla misura del  $d_H$  medio e del potenziale  $\zeta$ . Le misure sono state effettuate il giorno stesso del trattamento. I dati sono riportati in tabella 13. La dimensione media del campione Au 2,5 mM aumenta leggermente, passando da 29 a 65 nm; inoltre, il valore del potenziale  $\zeta$  (in termini di valore assoluto) decresce nettamente. Nonostante ciò, la formazione del precipitato non si è verificata subito, ma a distanza di un giorno.

Tabella 13: Dati DLS e Potenziale  $\zeta$  del campione Au 2,5 mM di derivazione chimica pre e post trattamento con FBS.

Campione	Solvente	DLS		Potenziale $\zeta$
		$d_H$ (nm)	PdI	mV
Au 2,5 mM	H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	29	0,519	-45,9
Au 2,5 mM	H <sub>2</sub> O + FBS 3% v/v	65	0,584	-15,3

## 5.2.2. Riduzione biogenica

In questa sezione viene riportata la sintesi delle Au NPs attraverso la riduzione di una soluzione acquosa di  $\text{HAuCl}_4$  con infuso di tè nero. Quest'ultimo, ricco in polifenoli, può essere utilizzato come agente riducente anche per le particelle d'oro.[59][57][61] Le varie prove di sintesi sono state condotte prima a temperatura ambiente (RT) e poi a  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , sotto costante agitazione e tramite l'aggiunta alla soluzione di  $\text{HAuCl}_4$  del tè ottenuto dall'infusione RT di foglie di tè nero (1,75 g) in 300 ml di acqua milli-Q e successiva filtrazione a gravità.

Nella riduzione biogenica si è cercato di valutare l'influenza dei composti del tè in relazione alla morfologia e dimensione delle Au NPs e della loro citotossicità.

Si è deciso di partire da una soluzione 1,0 mM di  $\text{HAuCl}_4$  e rapporto v tè/v  $\text{HAuCl}_4$  di 1:10 (campione Au 1,0 mM 1:10). Tale sintesi è stata inizialmente condotta a RT da cui si è ottenuta una sospensione con precipitato ed assenza di Au NPs poiché la colorazione differiva dal rosso scuro, risultando di colore rosso/rosa.[98] Tale campione non è stato caratterizzato. Reputando la temperatura come la causa principale dell'insuccesso della reazione si è deciso di condurre tale sintesi a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  per 30 minuti (campione Au 1,0 mM 1:10  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ), come evidenziato dagli esperimenti in letteratura.[61] Anche in questo caso l'esito è stato negativo e non si è proceduto con la caratterizzazione del campione. La prova successiva (campione Au 1,0 mM 1:10  $40\text{ }^\circ\text{C}$  10') è stata effettuata con i medesimi parametri della sintesi precedente, ma scaldando per 10 minuti a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  e lasciando in agitazione a RT per i successivi 30 minuti. Si è ottenuta una sospensione dal colore differente dal rosso scuro, di colore rosso/rosa. Dallo spettro UV, però, è risultata l'avvenuta formazione di Au NPs nonostante un poco definito LPS a 585 nm. (fig. 32) Tale *shift* del picco a lunghezze d'onda maggiori indica la presenza di aggregati e Au NPs di morfologia differente da quella sferica.[101] Dai dati di DLS, il  $d_H$  medio risulta essere di 154 nm e PDI di 0,135. Il potenziale  $\zeta$  è di -21,2 mV che indica una bassa stabilità del sistema colloidale.

Con lo scopo di ottenere Au NPs con distribuzione dimensionale più stretta si è ottimizzata una sintesi con rapporto volumetrico v tè/v  $\text{HAuCl}_4$  di 1:2. Si è mantenuto la concentrazione di 1,0 mM del sale precursore, la temperatura di  $40\text{ }^\circ\text{C}$

per 10 minuti dopodichè si è mantenuta l'agitazione a RT per i successivi 30 minuti (campione Au 1,0 mM 1:2 40 °C 10'). La sospensione ottenuta ha assunto il tipico colore rosso scuro. Dallo spettro UV si è osservato il picco del plasmone alla lunghezza d'onda di 533 nm che ha confermato la formazione di Au NPs di morfologia sferica.[101] (Fig. 32)

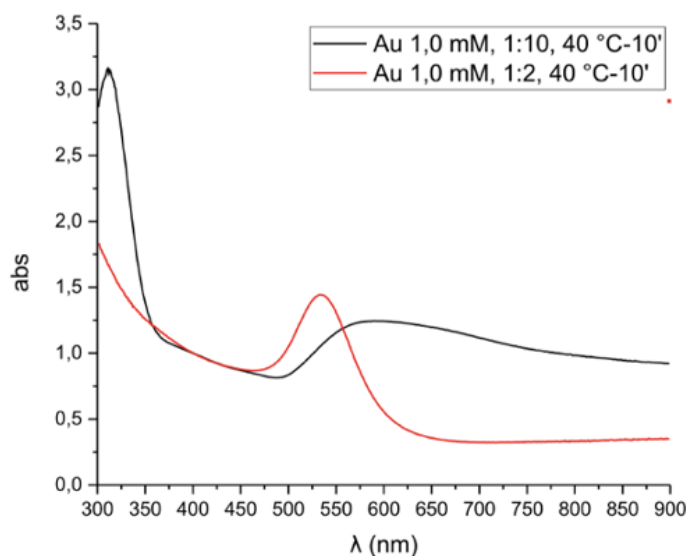


Figura 32: Spettro UV di Au NPs ottenute tramite sintesi biogenica con v t v HAuCl<sub>4</sub> differenti, Au 1,0 mM con rapporto 1:10 e Au 1,0 mM con rapporto 1:2.

Dato l'esito positivo della sintesi si è deciso di monitorare le caratteristiche delle Au NPs, tramite i valori sia di  $d_H$  medio che di potenziale  $\zeta$  ottenuti sia il giorno stesso della sintesi ( $t_1$ ) che a quattro giorni di distanza ( $t_2$ ).

A  $t_1$ , dall'analisi DLS, il  $d_H$  medio è risultato essere di 44 nm e PdI di 0,361 che conferma il quanto rilevato dallo spettro UV. Tuttavia, dal valore di potenziale  $\zeta$  di -13 mV la sospensione è risultata meno stabile della precedente. Dopo quattro giorni, il  $d_H$  medio non è risultato notevolmente variato con un valore di 44 nm e di PdI di 0,395, mentre per quanto riguarda il potenziale  $\zeta$  si è osservato un abbassamento a -15,9 mV. Tale campione è stato ulteriormente caratterizzato con l'acquisizione delle immagini TEM. Da tali immagini si evidenzia una limitata uniformità della morfologia delle Au NPs: ad una maggioranza di Au NPs sferiche se ne aggiungono altre di forma discoidale e prismatica. Tramite ImageJ, si sono definite le dimensioni delle Au NPs sferiche di  $16 \pm 10$  nm, da cui poi si è ricavato il relativo grafico riguardante la distribuzione dimensionale del campione. (Fig. 33)

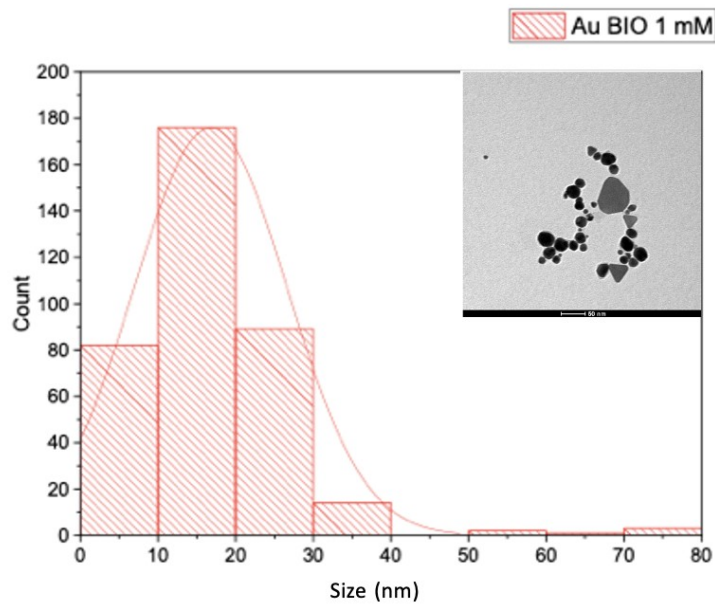


Figura 33: In alto a destra immagine TEM (scala di 50 nm) del campione Au 1,0 mM con  $v$  tè/ $v$   $HAuCl_4$  di 1:2 ottenuto tramite sintesi biogenica. Al centro il grafico relativo alla frequenza delle dimensioni delle Au NPs sferiche sintetizzate.

Lo stesso procedimento è stato eseguito per le impurità e per i sottoprodotti dalla morfologia prismatica. La dimensione media di tali prodotti è di  $41 \pm 24$  nm. (Fig. 34)

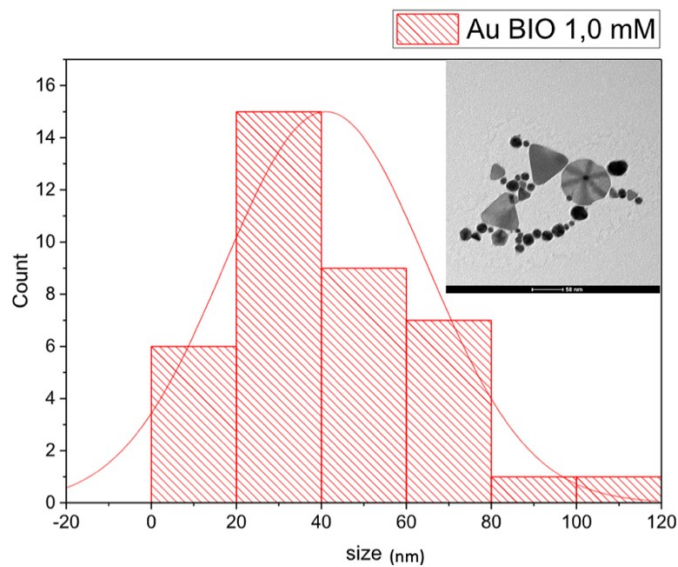


Figura 34: In alto a destra immagine TEM (scala di 100 nm) del campione Au 1,0 mM con  $v$  tè/ $v$   $HAuCl_4$  di 1:2 ottenuto tramite sintesi biogenica. Al centro il grafico relativo alla frequenza delle dimensioni dei prodotti di forma prismatica.

La stessa sintesi è stata riprodotta con una concentrazione di  $\text{HAuCl}_4$  di 2,5 mM (Au 2,5 mM 1:2 40 °C 10') per avere un confronto diretto con la sintesi Turkevich. Si è ottenuta una sospensione di colore rosso/rosa come nel campione Au 1,0 mM 1:10 40 °C 10'. Infatti, dallo spettro UV si è osservato uno spostamento a lunghezze d'onda maggiori, a 570 nm, del relativo LPS indice della presenza di aggregati e Au NPs di morfologia non sferica. Inoltre, tale picco risulta essere molto ampio indicando quindi l'ampia polidispersione dimensionale del campione. (Fig. 35)

Quanto osservato è stato convalidato dall'analisi DLS in cui il  $d_H$  medio è di 155 nm con valore di PDI di 0,204. Anche in questo caso il valore del potenziale  $\zeta$  subisce una riduzione arrivando a -25,1 mV. (Tabella 14). Da tale risultato si è ipotizzato che il volume di tè utilizzato non fosse sufficiente per la sintesi di Au NPs sferiche dal  $d_H$  medio più piccolo e dimensionalmente monodisperse. Si è quindi preparata un'ultima sintesi con concentrazione iniziale di  $\text{HAuCl}_4$  di 2,5 mM e v tè/v  $\text{HAuCl}_4$  di 1:1 (campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10'), mantenendo invariati gli altri parametri di sintesi. Nuovamente la sospensione ha assunto il colore rosso scuro indice dell'avvenuta formazione di Au NPs.[98] In fig. 35, la banda plasmonica osservata pur cadendo a 558 nm si discosta molto da quella ideale riguardante le Au NPs sferiche ed inoltre risulta essere molto largo, indicando quindi una polidispersione dimensionale delle Au NPs ottenute.

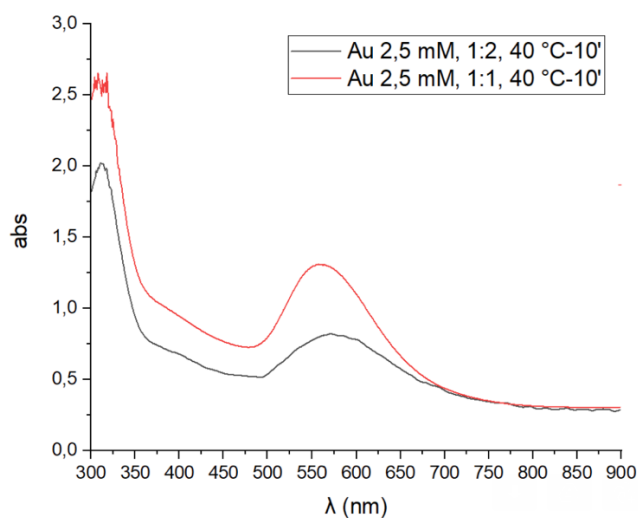


Figura 35: Confronto spettri UV di Au NPs ottenute tramite sintesi biogenica con V tè/V  $\text{HAuCl}_4$  differenti, Au 2,5 mM con rapporto 1:2 e Au 2,5 mM con rapporto 1:1.

Anche in questo caso si è deciso di effettuare le misure di DLS e potenziale  $\zeta$  in tempi diversi: a t1 il DLS conferma che il  $d_H$  medio è di 58 nm con un PdI di 0,234 e il valore di potenziale  $\zeta$ , di -15,7 mV che indica una bassa stabilità del sistema colloidale. A t2 la distribuzione dimensionale è risultata essere di 62 nm e PdI di 0,264 e il potenziale  $\zeta$  di -16,7 mV. L'acquisizione delle immagini TEM di quest'ultimo campione ha permesso di stabilire con certezza le dimensioni e la varietà morfologica delle Au NPs ottenute. (Fig. 36) Si sono definite le dimensioni delle Au NPs di forma sferica che risultano essere di  $26 \pm 13$  nm da cui poi si è ottenuto il relativo grafico riguardante la distribuzione dimensionale delle Au NPs sferiche. (Fig. 36)

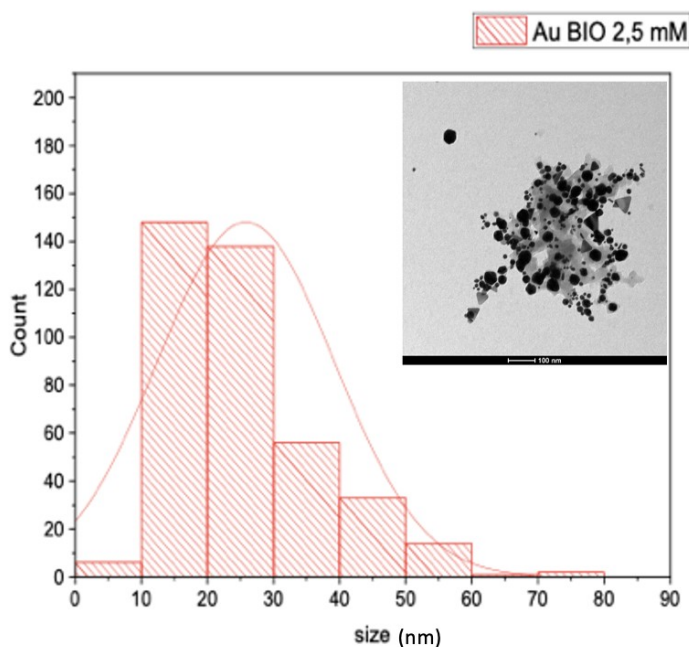


Figura 36: in alto a destra immagine TEM (scala 100 nm): del campione Au 2,5 mM con  $V_{t\grave{e}}/V_{H AuCl_4}$  di 1:1 ottenuto tramite sintesi biogenica. Al centro il grafico relativo alla frequenza delle dimensioni delle Au NPs sferiche sintetizzate.

Anche in questo caso, oltre alle Au NPs di forma sferica, il campione risulta caratterizzato dalla presenza di impurità e di sottoprodotti di forma prevalentemente prismatica con dimensione  $52 \pm 42$  nm. (Fig. 37) che potrebbero aver influenzato la banda plasmonica aumentando la sua ampiezza e spostandola verso lunghezze d'onda maggiori rispetto a quelle ideali.



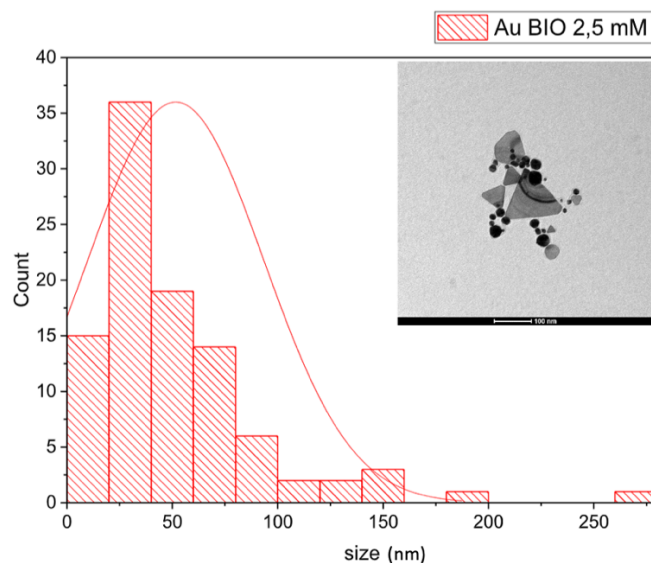


Figura 37: In alto a destra immagine TEM (scala di 100 nm) del campione Au 2,5 mM con  $V$  tè/ $V$   $H AuCl_4$  di 1:1 ottenuto tramite sintesi biogenica. Al centro il grafico relativo alla frequenza delle dimensioni dei prodotti prismatici presenti nel campione.

Da quanto visto finora si può asserire che l'aumento della concentrazione del precursore di partenza permetta la formazione di Au NPs dalle dimensioni più grandi. L'aumento del volume di tè aggiunto permette comunque di ottenere delle Au NPs, confermando la sua attività riducente.

Nonostante le dimensioni più grandi e la maggiore polidispersione, si è deciso di mantenere come campione finale il campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10', che presenta dei buoni valori di Potenziale  $\zeta$  ed inoltre la concentrazione delle Au NPs si ipotizza essere maggiore.

L'ottenimento di sospensioni con elevata concentrazione di Au NPs, per poter effettuare le prove di citotossicità, ha rappresentato un punto chiave che ha indirizzato l'individuazione di quest'ultimo come campione definitivo. Infatti, per il calcolo della concentrazione delle Au NPs, si è stimato che la resa della reazione fosse del 100%. Nel caso del campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' la concentrazione finale stimata di  $Au^0$  è di 0,25 g/L.

Infine, si è proceduto con la misurazione del pH di tale campione che è di 2.

Di seguito la tabella riassuntiva dei dati ottenuti dalla caratterizzazione dei campioni precedentemente descritti.

Tabella 14: Dati caratterizzanti i campioni di Au NPs di derivazione biogenica.

Campioni	UV	DLS (t1)		DLS (t2)		Potenziale	Potenziale	TEM	
		Nm	d <sub>H</sub> (nm)	PdI	d <sub>H</sub> (nm)	PdI	ζ (t1) (mV)		ζ (t2) (mV)
Au 1,0 mM 1:10 40 °C 10'		585	154	0,135	/	/	-21,2	/	/
Au 1,0 mM 1:2 40 °C 10'		533	44	0,361	44	0,395	-13,0	-15,9	16±10
Au 2,5 mM 1:2 40 °C 10'		570	155	0,204	/	/	-25,1	/	/
Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10'		558	58	0,234	62	0,264	-15,7	-16,7	26±13

Si è inoltre misurata la stabilità del campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' in presenza di FBS. Anche in questo caso si è presupposto una resa di reazione del 100%, dunque si è aggiunto un volume di FBS corrispondente al 3% (v/v) e dopodiché si è proceduto alla misura del d<sub>H</sub> medio e del Potenziale ζ. Le misure sono state ottenute il giorno stesso del trattamento. I dati sono riportati in tabella 15.

Ciò che si può osservare è che la distribuzione dimensionale del campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' aumenta, ma soprattutto, il valore del Potenziale ζ (in termini di valore assoluto) cambia totalmente, passando da valori negativi a valori positivi. Nonostante ciò, la formazione del precipitato non si è verificata subito, ma a distanza di un giorno.

Tabella 15: Dati DLS e Potenziale  $\zeta$  del campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' di derivazione chimica pre e post trattamento con FBS.

Campione	Solvente	DLS		Potenziale $\zeta$
		$d_H$ (nm)	PdI	mV
Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10'	H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	62	0,264	-16,7
Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10'	H <sub>2</sub> O + FBS 3% v/v	83	0,415	+21,1

### 5.2.3. Confronto delle nanoparticelle ottenute

Entrambe le sospensioni Au 2,5 mM (di origine chimica) e Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' (di origine biogenica) hanno un pH acido, misurato tramite l'utilizzo di un pHmetro, rispettivamente di 5 e di 2.

La formazione delle Au NPs è stata accertata con l'individuazione del relativo plasmone nella banda intorno ai 520 nm, tipica delle Au NPs di forma sferica.[98][77] (Fig. 38). Si potrebbe presupporre che nel campione Au 2,5 mM (ottenuto tramite protocollo Turkevich) vi sia una maggioranza di Au NPs di forma sferica poiché il picco è più spostato verso i 520 nm. Tra i due campioni, inoltre, quello di sintesi chimica, risulta più stabilizzato con una minor presenza di aggregati. Questo può essere spiegato dal fatto che l'alta temperatura richiesta nel protocollo Turkevich porti ad una riduzione più veloce del sale precursore da parte del C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2 H<sub>2</sub>O che a sua volta si ossida a formare sodio acetone dicarbossilato, un prodotto intermedio di reazione con una buona attività riducente.[96][102] Questo sembra anche garantire anche una migliore stabilizzazione sterica.

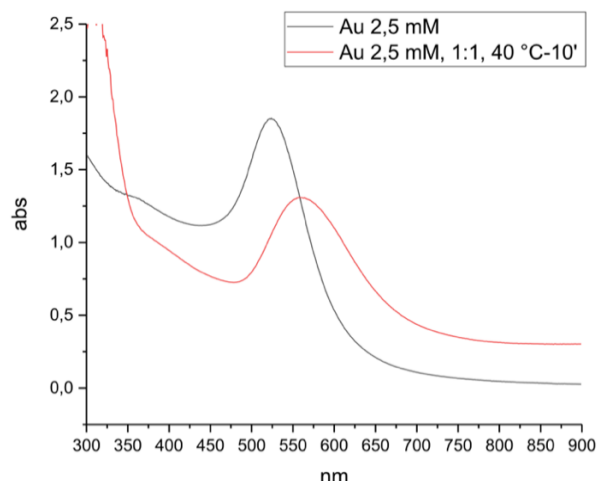


Figura 38: Confronto spettri UV relativi al campione Au 2,5 mM ottenuto tramite sintesi chimica e Au 2,5 mM, 1:1, 40 °C-10' ottenuto tramite sintesi biogenica.

Data la sostanziale differenza tra gli spettri UV del campione Au 2,5 mM e Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10', si è provato a confrontare i plasmoni normalizzandoli alla lunghezza d'onda di 400 nm. (fig. 39) Il plasmone relativo alle Au NPs del campione Au 2,5 mM, 1:1, 40 °C-10' (di origine biogenica) risulta essere più ampio, indicando quindi una maggiore polidispersione dimensionale delle Au NPs; inoltre, lo spostamento a lunghezze d'onda maggiori potrebbe essere ascritto alla presenza di Au NPs la cui morfologia si discosta da quella sferoidale e/o alla presenza di aggregati. Si osserva inoltre come l'LSP del campione biogenico sia caratterizzato da una minore intensità. Ciò ci fa ipotizzare che le dimensioni delle Au NPs ottenute con la sintesi biogenica siano inferiori rispetto a quelle ottenute con la sintesi Turkevich poiché esiste una correlazione tra intensità del plasmone e dimensioni delle Au NPs per NPs con dimensioni inferiori ai 30 nm.[25] Tuttavia, poiché le dimensioni delle NPs (ottenute dall'analisi TEM) sono molto vicine al valore soglia di 30 nm, il confronto tra le dimensioni medie delle nanoparticelle è stato effettuato prendendo in considerazione i risultati DLS e TEM.

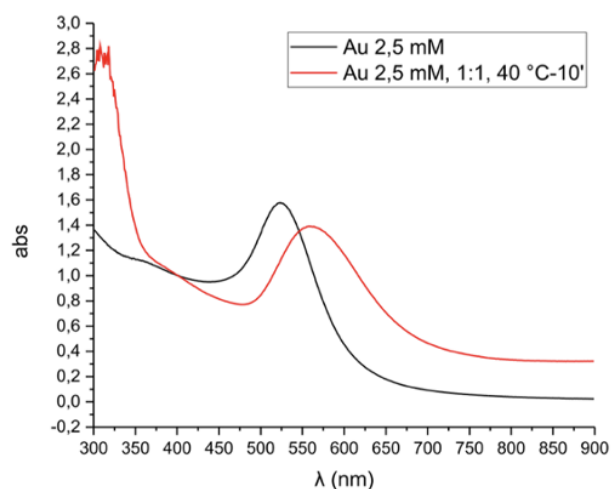


Figura 39: Confronto dei plasmoni relativi al campione Au 2,5 mM ottenuto tramite sintesi chimica e Au 2,5 mM, 1:1, 40 °C-10' ottenuto tramite sintesi biogenica. Plasmoni normalizzati a 400 nm.

Dai dati ricavati dalle immagini TEM il campione Au 2,5 mM ha delle dimensioni medie di  $32 \pm 4$  nm, mentre il campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' di  $26 \pm 13$  nm. (Fig. 40) Nonostante da questa analisi si osservi la vicinanza delle dimensioni al limite dei 30 nm, i valori di dimensioni medie ottenute sembrano confermare la correlazione diretta tra intensità del picco plasmonico e dimensioni.

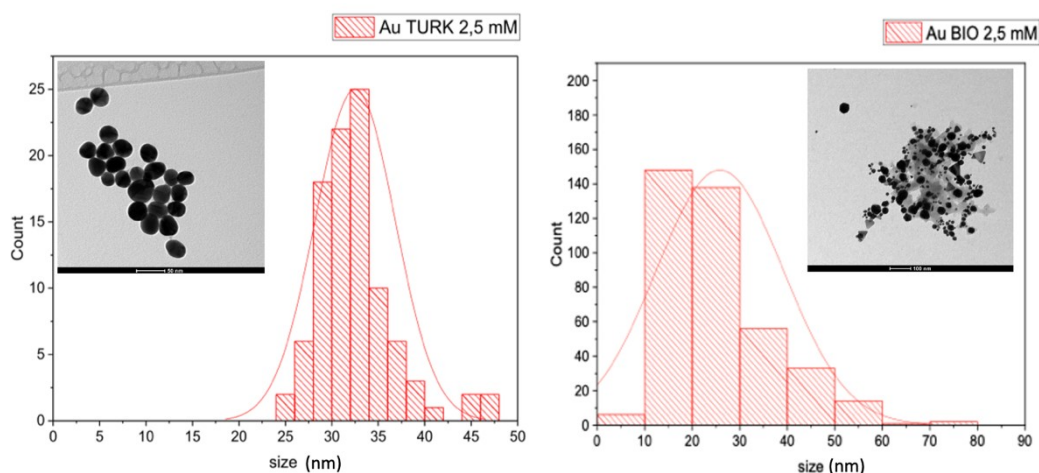


Figura 40: A) In alto a sinistra immagine TEM (scala di 50 nm) del campione Au 2,5 mM ottenuto tramite metodo Turkevich. Al centro il grafico relativo alla frequenza delle dimensioni delle Au NPs sintetizzate. B) In alto a destra immagine TEM (scala di 100 nm) del campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' ottenuto tramite sintesi biogenica. Al centro il grafico relativo alla frequenza delle dimensioni di Au NPs sintetizzate.

Inoltre, in fig. 41 si osserva come la distribuzione dimensionale delle impurità presenti nel campione di origine biogenica (Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10') sia molto ampia con dimensioni medie di  $52 \pm 42$  nm. Quest'ultimi, quindi, potrebbero essere sali oppure aggregati di Au NPs che con il loro LSPR potrebbero aver influenzato la natura del plasmone del campione di sintesi biogenica causandone lo spostamento a lunghezze d'onda maggiori e l'aumento dell'ampiezza. Queste immagini, inoltre, fanno presupporre che, come già osservato per l'argento, l'attività riducente e stabilizzante del tè non sia ottimale per la sintesi di Au NPs morfologicamente uniformi, rendendo la sintesi biogenica poco riproducibile e di bassa qualità.

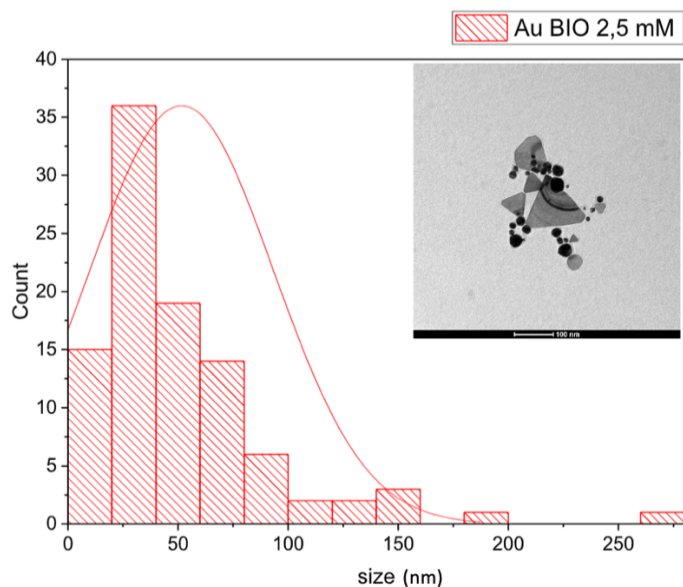


Figura 41: in alto a destra immagine TEM (scala di 100 nm) del campione Au 2,5 mM con v tè/v  $AgNO_3$  di 1:1 ottenuto tramite sintesi biogenica. Al centro il grafico relativo alla frequenza delle dimensioni dei prodotti prismatici presenti nel campione.

A distanza di quattro giorni, il valore di Potenziale  $\zeta$  delle sospensioni dei campioni studiati rimane sostanzialmente invariato, passando da -49,3 a -45,9 mV per le Au NPs di origine chimica e da -15,7 a -16,7 mV per le Au NPs di origine biogenica; in entrambe le sintesi non si verifica formazione di precipitato in questo lasso di tempo.

A seguito del trattamento con siero, entrambi i campioni finali subiscono delle variazioni riguardo la loro distribuzione dimensionale: per Au 2,5 mM si passa da

29 a 65 nm, mentre per Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' si passa da 62 a 83 nm. Inoltre, la carica superficiale del campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' preparato con sintesi biogenica cambia totalmente valore passando da valori negativi a valori positivi. (Tabella 16)

*Tabella 16: Dati DLS e Potenziale  $\zeta$  dei campioni Au 2,5 mM e Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' trattati con e senza FBS.*

Campione	Solvente	DLS		Potenziale $\zeta$
		$d_H$ (nm)	PdI	mV
Au 2,5 mM	H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	29	0,519	-45,9
Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10'	H <sub>2</sub> O + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	62	0,264	-16,7
Au 2,5 mM	H <sub>2</sub> O + FBS 3% v/v	65	0,584	-15,3
Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10'	H <sub>2</sub> O + FBS 3% v/v	83	0,415	+21,1

La spiegazione riguardo la distribuzione dimensionale è da attribuire, anche in questo caso, alla formazione di una corona proteica attorno alle Au NPs causata dall'adsorbimento delle proteine presenti nel FBS che previene l'aggregazione delle Au NPs come conferma lo studio condotto da Casals et al.[103] Riguardo l'abbassamento del valore del Potenziale  $\zeta$ , in valore assoluto, del campione di sintesi chimica Au 2,5 mM (da -45,9 a -15,3 mV), potrebbe essere attribuito ad una eventuale protonazione delle proteine del siero una volta aggiunte alla sospensione con pH 5 (valore più basso rispetto al loro punto isoelettrico) che si sono poi adsorbite sulla superficie delle NPs. Mentre il drastico cambiamento del valore di Potenziale  $\zeta$  del campione di sintesi biogenica Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' (passa da -16,7 a +21,1 mV), si pensa che sia dovuto al pH estremamente acido della sospensione che ha portato ad una protonazione massiva delle proteine del siero, che potrebbero poi essersi adsorbite sulla superficie della NPs alterandone il valore di Potenziale  $\zeta$ . Anche in questo caso, tale aspetto deve essere ulteriormente studiato.

## 5.3. Citotossicità delle nanoparticelle

Essendo questo tipo di sistemi interessanti per la biomedicina, in questo lavoro di Tesi è stata valutata la citotossicità delle Ag e Au NPs ottenute sia tramite riduzione chimica che riduzione biogenica. Le diverse NPs, essendo di dimensioni contenute (tra 20 e 50 nm) e piuttosto stabili sia in acqua che in FBS (al 3 % v/v), hanno permesso di effettuare i test di citotossicità su una linea cellulare di carcinoma epiteliale alveolare umano (A549).

### 5.3.1. Nanoparticelle d'argento

#### 5.3.1.1. Risultati e discussione

Le cellule A549, fatte crescere in 2D, sono state incubate per 24 ore con le sospensioni di Ag NPs ottenute sia tramite riduzione chimica che tramite riduzione biogenica, con concentrazioni di 0, 5, 10, 15, 20, 40 µg/ml. La citotossicità delle NPs è stata valutata inizialmente mediante osservazione degli eventuali cambiamenti morfologici delle cellule e successivamente tramite saggio di vitalità cellulare MTS, i cui risultati sono stati sottoposti a Student's *t*-test per verificarne la significatività sperimentale. Ciascuna sospensione di NPs è stata filtrata prima di ogni saggio con filtro a pori di 0,22 µm. Quindi, le cellule A549 sono state seminate nelle piastre, fatte crescere per 24 ore, dopodiché incubate per altre 24 ore con le sospensioni di Ag NPs. Terminato questo periodo le cellule sono state osservate al microscopio ottico. Per quanto riguarda le Ag NPs di origine chimica (campione ML 2) si è riscontrato evidenti segni di citotossicità, dati da un'alterazione della morfologia cellulare, alla concentrazione di 40 µg/ml, mentre per le Ag NPs di origine biogenica (campione ML 19) i segni più evidenti di alterazione morfologica sono stati osservati già alla concentrazione di 10 µg/ml. A queste concentrazioni, infatti, le cellule mostrano una morfologia più rotondeggiante, nucleo ingrossato e dimensioni minori rispetto alle cellule di controllo incubate con il solo terreno di coltura che si presentano più grandi e affusolate (Fig. 42).



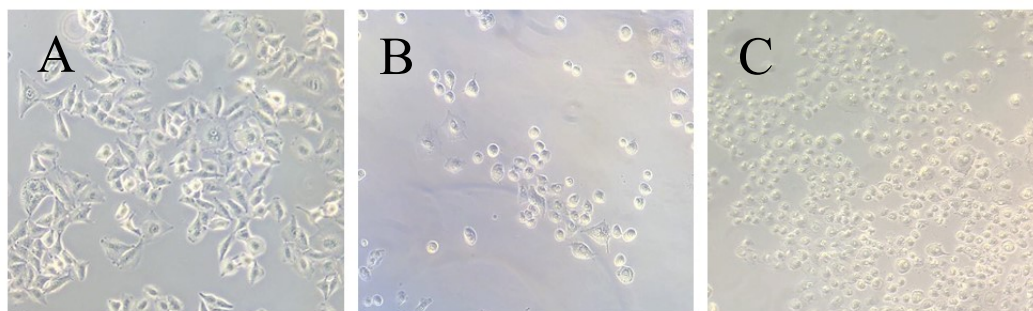


Figura 42: A) Cellule A549 di controllo; B) Cellule A549 post incubazione con Ag NPs di sintesi chimica; C) Cellule A549 post incubazione con Ag NPs di sintesi biogenica.

In fig. 43 sono riportati i risultati di citotossicità derivanti dal saggio MTS delle Ag NPs del campione ML 2. I risultati mostrano che la vitalità cellulare decresce all'aumentare della concentrazione delle NPs; in particolare, nell'intervallo di concentrazioni compreso tra 0 e 20  $\mu\text{g/ml}$ , la diminuzione della vitalità cellulare rimane attorno all'80-90 % rispetto al controllo (0  $\mu\text{g/ml}$ ), e tale abbassamento non è statisticamente significativo. Alla concentrazione più elevata, di 40  $\mu\text{g/ml}$ , si assiste ad un abbassamento significativo della vitalità cellulare al di sotto del 20 %; ( $p\text{-value} < 0,001$ ). Da questi risultati si può osservare come le Ag NPs citrato stabilizzate presentino lievi (se non nulle) proprietà citotossiche alle concentrazioni più basse (5  $\mu\text{g/ml}$ ), per poi manifestare degli effetti particolarmente nocivi a partire da concentrazioni  $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ , nello specifico alla concentrazione di 40  $\mu\text{g/ml}$  queste NPs risultano essere letali per gran parte delle cellule A549. Dato che le sospensioni delle NPs sono in soluzione acquosa, si è allestito un controllo in cui le cellule sono state incubate con un volume di acqua sterile pari al volume di sospensione acquosa di NPs alla dose più alta (40  $\mu\text{g/ml}$ ) per osservare eventuali effetti tossici dell'acqua che potrebbero influire sull'effetto tossico delle Ag NPs. Alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/ml}$  l'effetto citotossico è paragonabile a quello osservato nel controllo con l'acqua, con  $p\text{-value} = 0,0005$ . Quindi, all'evidente effetto citotossico osservato alla concentrazione di Ag NPs di 40  $\mu\text{g/ml}$  potrebbe aver contribuito anche l'acqua.

Dai valori di deviazione standard, si nota come vi siano delle leggere differenze tra i tre esperimenti condotti: differenze tra gli esperimenti, soprattutto quando si lavora con cellule vive, sono da attendere poiché esiste una certa variabilità inter-sperimentale. Quest'ultima deriva da numerosi fattori come variazioni della crescita

cellulare, differenze nella durata dell'incubazione del saggio MTS, differente livello di conta cellulare per la semina delle piastre del saggio ed anche differenze riguardo le concentrazioni delle NPs testate non esattamente identiche in tutti gli esperimenti.

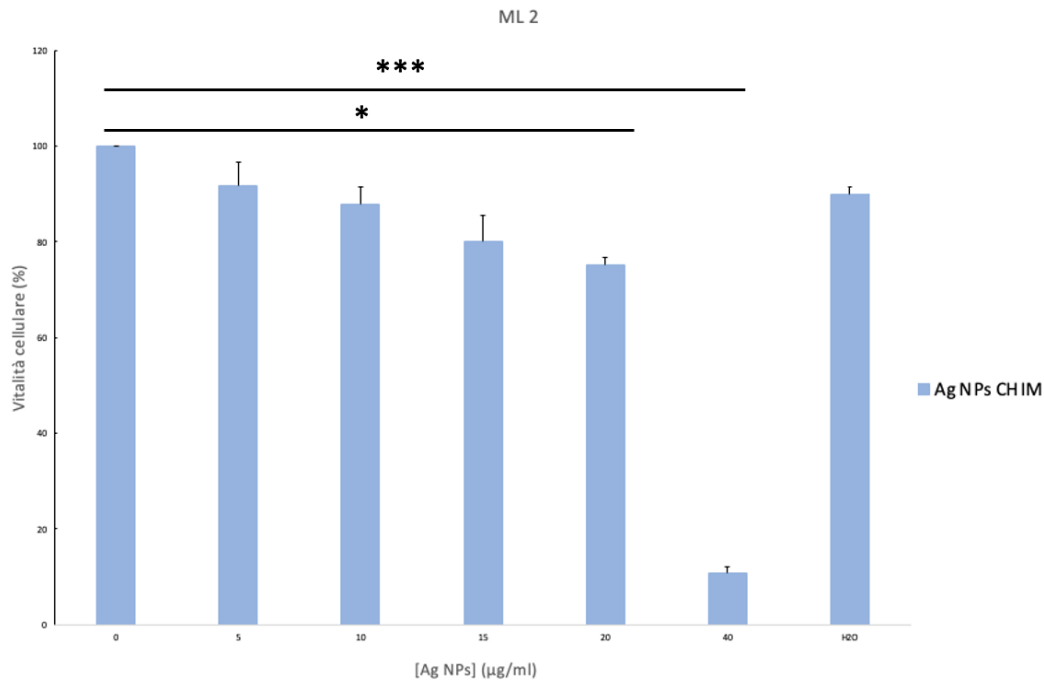


Figura 43: Vitalità delle cellule A549 dopo 24 ore di incubazione con Ag NPs di derivazione chimica (campione ML 2). Valore di *p*-value (\**p* < 0,05; \*\*\**p* < 0,001).

La fig. 44 mostra i risultati di citotossicità delle Ag NPs del campione biogenico ML 19 derivanti dal saggio MTS. In questo caso la citotossicità delle Ag NPs risulta essere maggiore, infatti, gli effetti tossici si osservano già alla concentrazione di 10 µg/ml dove la vitalità cellulare si abbassa significativamente intono a valori del 20 % (*p*-value= 0,0004). E' interessante notare che il contributo dell'acqua all'effetto citotossico della dose 10 µg/ml è trascurabile, dal momento che il 90% delle cellule è vitale quando incubato con un volume pari a quello della sospensione acquosa di NPs alla dose più alta (40 µg/ml).

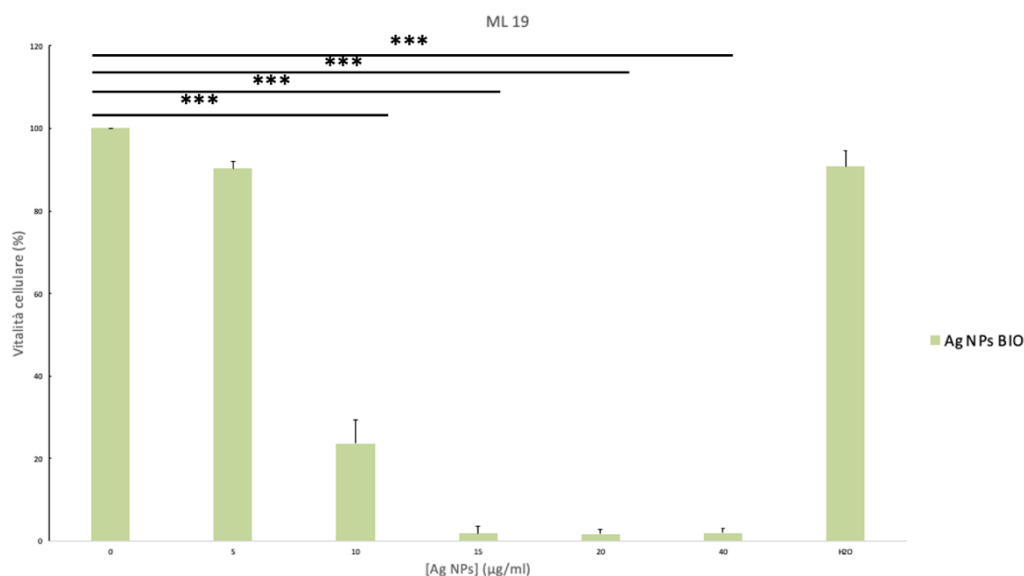


Figura 44: Vitalità delle cellule A549 dopo 24 ore di incubazione con Ag NPs di derivazione biogenica (campione ML 19). Valore di p-value (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### 5.3.1.2. Confronto fra sintesi per via chimica e biogenica

La fig. 45 mostra il confronto dei dati di citotossicità del campione ML 2 e ML 19 ottenuti con saggio MTS derivanti dalla media di tre esperimenti indipendenti. I dati mostrano come entrambi i tipi di Ag NPs abbiano un effetto citotossico verso le cellule A549. Considerevoli sono i risultati ottenuti con il campione ML 19, in cui la tossicità è molto più rilevante rispetto al campione ML 2. In questo caso, infatti, si osserva un drastico calo della vitalità cellulare già a partire da 10 µg/ml. Difatti, il calo di vitalità cellulare a questa concentrazione risulta essere significativo per il campione biogenico (p-value= 0,0004) mentre per il campione di origine chimica no (p-value > 0,05). L'aumentato effetto tossico del campione biogenico si pensa possa esser dovuto alle componenti organiche presenti nell'infuso di tè nero che sono adsorbite sulla superficie delle Ag NPs. Infatti, nonostante il previo passaggio di purificazione, il prodotto finale può contenere dei residui organici sulla superficie che potrebbero contribuire all'aumento della tossicità. Oltre a ciò, un'ulteriore spiegazione potrebbe essere attribuibile alle dimensioni delle Ag NPs: è noto in letteratura che confrontando l'attività citotossica di Ag NPs di differenti dimensioni (Ag NPs < 10 nm e Ag NPs > 100 nm), quest'ultima aumenta per particelle di

dimensioni minori, poiché NPs di piccole dimensioni presentano un'ampia superficie di contatto che aumenta la loro permeabilità intracellulare determinando un aumento del loro effetto tossico.[7] I dati TEM, infatti, indicano che il campione di origine biogenica ML 19, presenta delle Ag NPs di dimensioni inferiori ( $26 \pm 6$  nm) rispetto a quelle di origine chimica del campione ML 2 ( $44 \pm 10$  nm).

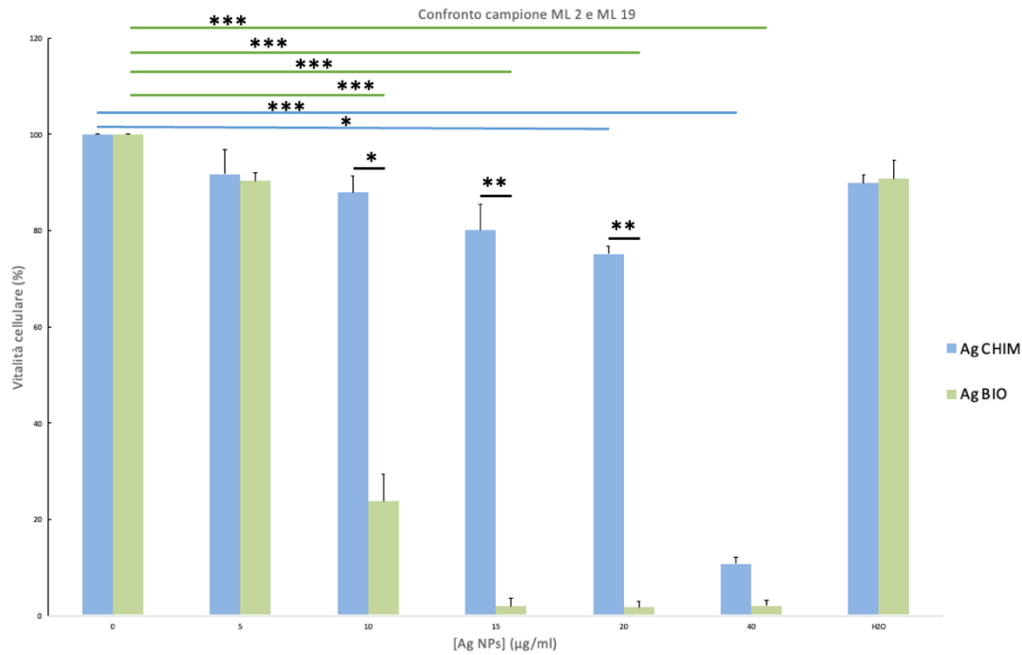


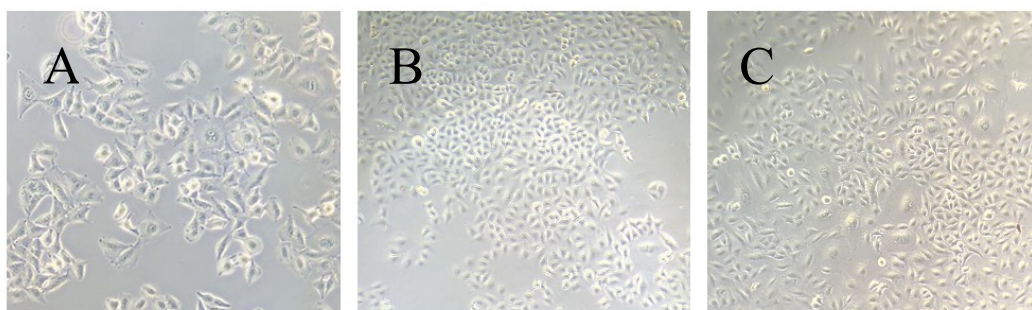
Figura 45: Confronto vitalità delle cellule A549 dopo 24 ore di incubazione con Ag NPs di derivazione chimica (ML 2) e Ag NPs di derivazione biogenica (ML 19). Valore di p-value (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 5.3.2. Nanoparticelle d'oro

### 5.3.2.1. Risultati e discussione

Le Au NPs sintetizzate sia tramite riduzione chimica (campione Au 2,5 mM) che tramite riduzione biogenica (campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10') sono state valutate per quanto riguarda i loro effetti citotossici su cellule A549. Quest'ultime sono state fatte crescere in 2D e successivamente incubate per 24 ore con le sospensioni precedentemente citate. Essendo nota la biocompatibilità delle Au

NPs,[26] si è deciso di testare concentrazioni più elevate rispetto a quelle testate per le Ag NPs. Le cellule sono state incubate con concentrazioni di Au NPs di 0, 10, 20, 40, 60 e 80 µg/ml. Anche in questo caso la citotossicità è stata valutata mediante saggio MTS in tre esperimenti indipendenti, ciascuno dei quali è stato condotto in triplicato. Le sospensioni testate sono state innanzitutto purificate con filtro con pori di 0,22 µm e dopodiché incubate con le cellule A549 per 24 ore. Come prima valutazione della citotossicità sono state osservate eventuali alterazioni morfologiche e/o dimensionali delle cellule, seminate nei pozzetti, tramite osservazione al microscopio ottico. Come si osserva dalla fig. 46 le cellule sono apparse vitali dopo incubazione di 24 ore con la dose più alta (80 µg/ml) di Au NPs sia di origine chimica che biogenica, poiché oltre a non osservare particolari variazioni morfologiche e/o dimensionali rispetto a quelle di controllo incubate con solo terreno di coltura, si osserva anche un aumento nel numero di cellule segno di intensa proliferazione cellulare. Da questa prima analisi si può già escludere un effetto altamente citotossico delle Au NPs anche a concentrazioni più elevate, come quelle testate in questo lavoro di Tesi.



*Figura 46: A) Cellule A549 di controllo; B) Cellule A549 post incubazione con Au NPs di sintesi chimica; C) Cellule A549 post incubazione con Au NPs di sintesi biogenica.*

In fig. 47 sono riportati i dati MTS ottenuti dall'incubazione di 24 ore delle cellule A549 con Ag NPs di derivazione chimica (campione Au 2,5 mM). I risultati mostrano che c'è un abbassamento del 10 %, non significativo, della vitalità cellulare a partire dalla dose più bassa (10 µg/ml). All'aumentare della concentrazione di Au NPs, la vitalità cellulare rimane intorno all'80-90 %. A conferma di quanto già noto in letteratura sull'elevata biocompatibilità delle Au NPs, anche a concentrazioni più alte.

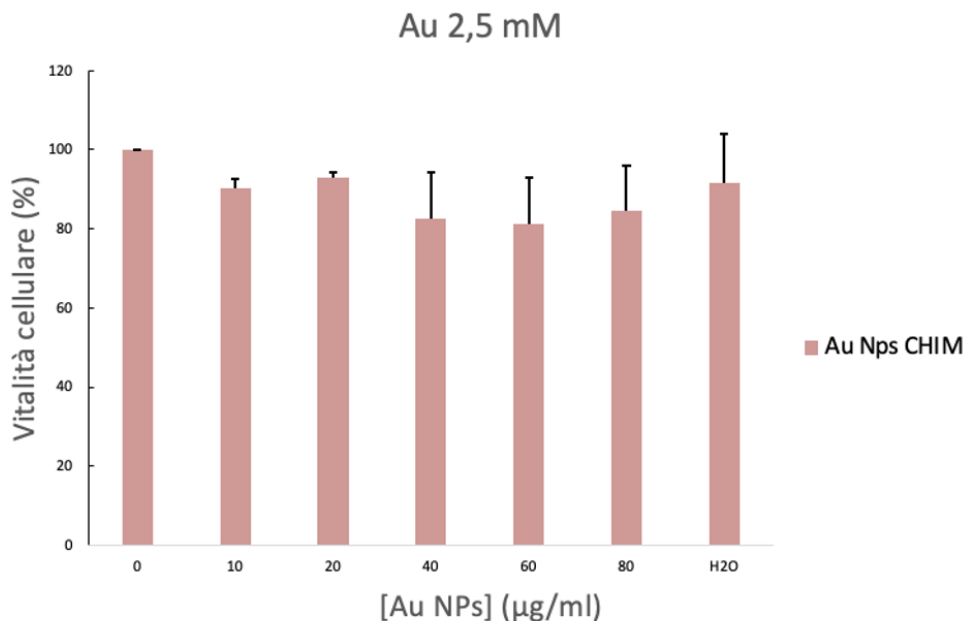


Figura 47: Vitalità delle cellule A549 dopo 24 ore di incubazione con Au NPs di derivazione chimica (campione Au 2,5 mM).

La fig. 48 mostra i risultati di citotossicità derivanti dal saggio MTS riguardanti le Au NPs del campione biogenico Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10'. I valori ottenuti non si discostano molto da quelli relativi al campione di sintesi chimica Au 2,5 mM anche se l'abbassamento della vitalità risulta essere più lineare. La vitalità cellulare complessiva si abbassa leggermente rimanendo intorno all'80 %, facendoci ipotizzare una maggiore (seppur lieve) attività citotossica delle Au NPs di sintesi biogenica, nonostante questa osservazione, i relativi *p*-value indicano come queste differenze rispetto al controllo non siano statisticamente rilevanti, e questo è evidente sulla base dei valori di deviazione standard che sono elevati, rendendo necessaria un'ulteriore validazione di questi dati, anche con nuove sintesi di NPs. Inoltre, quando si lavora con cellule vive, ci possono essere variazioni nelle conte cellulari, necessarie alla corretta semina delle cellule nelle piastre, variazioni di crescita cellulare, lievi differenze nel tempo di incubazione del saggio MTS, così come concentrazioni di sospensione nanoparticellare non esattamente identici in tutti gli esperimenti, possono influire in maniera consistente nel risultato del saggio.

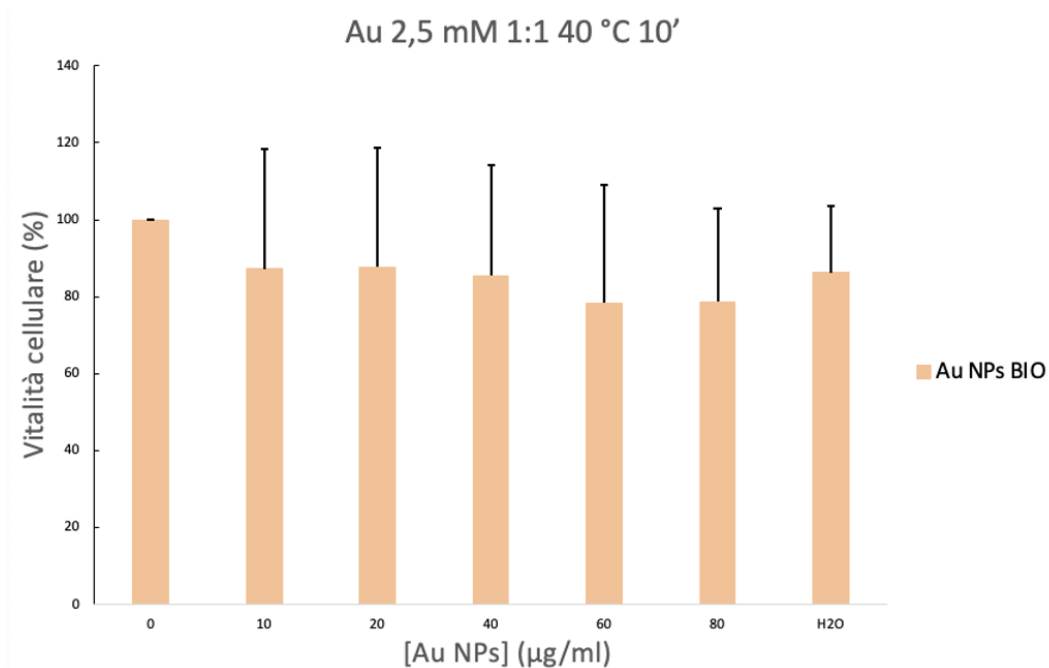


Figura 48: Vitalità delle cellule A549 dopo 24 ore di incubazione con Au NPs di origine biogenica (campione Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10').

### 5.3.2.2. Confronto fra sintesi per via chimica e biogenica

In fig. 49 vengono mostrati i risultati MTS messi a confronto. Dal confronto dei dati di citotossicità del campione di sintesi chimica Au 2,5 mM e di sintesi biogenica Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10', ottenuti dalla media di tre saggi MTS condotti in triplicato, si può osservare l'elevata biocompatibilità delle Au NPs poiché l'effetto tossico riscontrato sulle cellule A549 non risulta essere particolarmente evidente. A parte per la concentrazione di 40 µg/ml, le Au NPs di origine biogenica presentano proprietà citotossiche lievemente maggiori rispetto alle altre di origine chimica. Per entrambi i campioni, nonostante le lievi differenze riscontrate siano statisticamente non rilevanti, si potrebbe assumere che le molecole di origine organica presenti nell'infuso di tè nero ed adsorbite sulla superficie delle Au NPs o le dimensioni più contenute delle Au NPs di origine biogenica abbiano contribuito ad aumentarne l'effetto citotossico. Ciononostante, dal momento che l'effetto citotossico di entrambi i campioni è pressoché paragonabile, il lieve, seppur statisticamente non rilevante, abbassamento della vitalità riscontrato sia con le Au NPs di sintesi chimica che con le Au NPs biogeniche potrebbe essere attribuibile al

pH acido delle sospensioni. In particolare, il pH 2 del campione biogenico Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10' potrebbe aver particolarmente alterato le condizioni di coltura delle cellule destabilizzandole, rendendole meno vitali, soprattutto a concentrazioni maggiori dove il volume di sospensione immesso è più grande, decretando quindi i valori leggermente più bassi di vitalità cellulare.

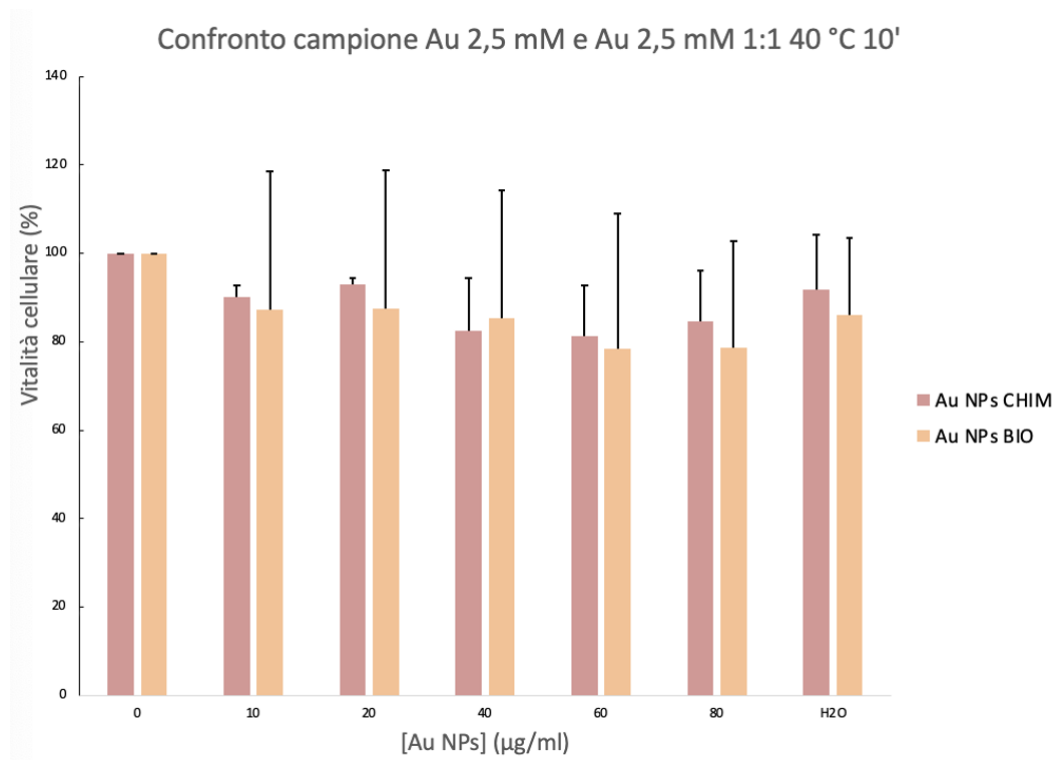


Figura 49: Confronto vitalità delle cellule A549 dopo 24 ore di incubazione con Au NPs di derivazione chimica (Au 2,5 mM) e Au NPs di derivazione biogenica (Au 2,5 mM 1:1 40 °C 10).



# Capitolo 6

## 6. Caratterizzazione delle nanoparticelle

### 6.1. Spettroscopia UV-Vis

Le misure di spettroscopia UV-Vis sono state effettuate con uno spettrofotometro Agilent Varian Cary 50 UV-Vis (presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Padova) nell'intervallo 300-900 nm utilizzando delle cuvette di vetro a temperatura ambiente. Questa tecnica spettroscopica si basa sull'interazione della luce con la materia: il campione viene colpito da una radiazione elettromagnetica (REM) a varie lunghezze d'onda dello spettro UV e visibile (300-800 nm) e, a seconda del composto analizzato, la REM viene parzialmente assorbita ad alcune lunghezze d'onda e trasmessa ad altre, a seconda del composto presente nel campione analizzato. Assorbanza e trasmittanza sono inversamente proporzionali. I fenomeni di assorbimento della REM sono descritti dalla legge di Lambert-Beer [83] che risulta particolarmente importante quando si sfrutta questa tecnica per analisi quantitative (oltre che qualitative). Difatti, come si può notare nella seguente equazione, vi è una proporzionalità diretta tra l'assorbanza e concentrazione della sostanza.

$$A = \epsilon bC$$

A= assorbanza.

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare

b= cammino ottico

C= concentrazione della sostanza

Lo spettro UV-Vis che si ottiene in *output* è una curva che correla la luce trasmessa registrata in funzione della lunghezza d'onda.[104]

Oltre a questo, tale tecnica può essere utilizzata per la rilevazione e quantificazione di NPs metalliche in sospensione, sfruttando le loro uniche proprietà optoelettroniche (plasmoniche), ampiamente descritte nel Capitolo 2.1: In questo caso, la REM (ad una determinata lunghezza d'onda) induce un'eccitazione e quindi un'oscillazione collettiva degli elettroni presenti sulle NPs, risultando in una banda nello spettro UV, definita plasmone. Generalmente il plasmone relativo alle Ag e Au NPs di forma sferica cade rispettivamente ad una lunghezza d'onda di 350-450 nm e di 500-550 nm nello spettro visibile. In questo lavoro di Tesi, tale tecnica è stata utilizzata per caratterizzare le NPs d'interesse.[24][25]

## 6.2. Diffusione dinamica della luce (DLS)

La diffusione dinamica della luce, o *Dynamic light scattering* (DLS), è una tecnica utilizzata per misurare il diametro idrodinamico ( $d_H$ ) delle NPs in sospensione. Nello specifico, la sospensione viene illuminata da un laser (monocromatico e coerente) che permette di misurare, in funzione del tempo, le variazioni di intensità di *scattering* causate dal movimento browniano delle particelle. L'equazione di Stokes-Einstein viene utilizzata per calcolare il  $d_H$  delle NPs poiché mette in relazione la dimensione delle NPs con la velocità del loro moto browniano. Quest'ultimo viene definito dal coefficiente di diffusione traslazionale,  $D$ .

Di seguito l'equazione di Stokes-Einstein.

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

$K_b$ : Costante di Boltzmann

$T$ : Temperatura assoluta sperimentale

$\eta$ : Viscosità del mezzo

$R_h$ : Raggio idrodinamico delle NPs

Le variazioni dell'intensità di *scattering* sono direttamente correlate al coefficiente di diffusione; quest'ultimo, a parità di viscosità e temperatura, è più elevato più la NPs è piccola. Per NPs più grandi, le variazioni dell'intensità dello *scattering* sono

più lente poiché si muovono più lentamente e quindi il coefficiente di diffusione risulta essere più piccolo.[105]

In questo lavoro di Tesi, le misure DLS sono state effettuate tramite lo strumento DLS Zetasizer Nano S Malvern presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

### 6.3. Potenziale $\zeta$

Lo strumento utilizzato per le analisi di  $d_H$  delle NPs in sospensione, DLS (DLS Zetasizer Nano S Malvern presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova) permette anche di prevedere la stabilità delle sospensioni attraverso la misura del potenziale  $\zeta$ . Il Potenziale  $\zeta$  è definito come una proprietà fisica, specifica di ogni sospensione particolata, macromolecola o materiale di superficie. Si tratta della carica di una particella in un mezzo particolare. Il valore di potenziale  $\zeta$  fornisce indicazioni quantitative sulla stabilità di un sistema colloidale: un valore di potenziale  $\zeta$  elevato ( $\pm 30$  mV) garantisce che le NPs rimangano lontane tra loro grazie alle forze repulsive di tipo elettrostatico, assicurando che esse non aggregino.[80]·[82]

### 6.4. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Le dimensioni e la morfologia dei campioni di Ag e Au NPs, sono state analizzate con la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Lo strumento utilizzato è il microscopio elettronico a trasmissione FEI Tecnai G2 presente nei Laboratori di Microscopia Elettronica (LME) del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova, operante a 100 kV, munito di telecamera Olympus Veleta ed una telecamera TVIPS F114. Per eseguire questa analisi, una goccia di ciascuna sospensione è stata depositata su un reticolo di rame rivestito di carbonio. Le immagini 2D risultano essere risolte poiché lo strumento sfrutta un fascio di elettroni che colpisce il campione e che in seguito a ciò viene disperso. L'onda

trasmessa viene amplificata da un sistema di lenti e raggiunge poi il rivelatore che in *output* fornisce l'immagine. Nell'immagine, le zone a contrasto più alto corrispondono a zone maggiormente elettrondense, che quindi provocano una maggiore deviazione (e una minore trasmissione) del fascio elettronico. Dalle immagini ottenute, tramite il *software* ImageJ, si sono analizzate le dimensioni delle NPs.

# Capitolo 7

## 7. Procedure sperimentali

### 7.1. Reagenti e materiali

In questo lavoro di Tesi i reagenti impiegati per le sintesi delle Ag e Au NPs sono elencati nella seguente tabella. (Tabella 17)

*Tabella 17: Reagenti utilizzati per la sintesi delle Ag e Au NPs.*

Nome	Formula	CAS	Fornitore
Argento nitrato	AgNO <sub>3</sub>	7761-88-8	Sigma- Aldrich
Acido nitrico	HNO <sub>3</sub>	7697-37-2	Sigma- Aldrich
Acido cloridrico	HCl	7647-01-0	Sigma- Aldrich
Sodio citrato tribasico diidrato	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	6132-04-3	Sigma- Aldrich

Riguardo l'acido tetracloroaurico (HAuCl<sub>4</sub>) utilizzato in questo lavoro è stato ottenuto dal trattamento dell'oro metallico massivo con una soluzione di *acqua regia*, miscela composta da acido nitrico (HNO<sub>3</sub>) e acido cloridrico (HCl) in rapporto 1:3 v/v.

Riguardo il tè utilizzato come agente riducente nella sintesi biogenica sia delle Ag NPs che delle Au NPs è della marca Lipton ed infine le cellule A549 utilizzate nei saggi di citotossicità sono state fornite dal gruppo della Prof.ssa Maddalena Mognato del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova.

## 7.2. Sintesi nanoparticelle d'argento

### 7.2.1. Sintesi Lee-Meisel

Le Ag NPs di origine chimica sono state ottenute seguendo il protocollo Lee-Meisel.[16] I campioni (1 mM e 2,5 mM) sono stati sintetizzati a partire da una soluzione acquosa di argento nitrato ( $\text{AgNO}_3$ ) e una soluzione di trisodio citrato diidrato ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) entrambi alla medesima concentrazione. In un matraccio da 100 ml sono stati sciolti 0,0170 g di  $\text{AgNO}_3$  (campione 1 mM) e 0,0425 g di  $\text{AgNO}_3$  (campione 2,5 mM) in acqua milli-Q ed in un altro matraccio da 50 ml sono stati disciolti 0,50 g di  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  per il campione 1 mM e 1,25 g di  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  per il campione 2,5 mM. La soluzione di  $\text{AgNO}_3$  è stata poi trasferita in una beuta ed è stata scaldata alla temperatura desiderata (100 °C) sotto costante agitazione. Una volta raggiunta la temperatura, sono stati aggiunti goccia a goccia 10 ml di soluzione di  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , per ottenere un rapporto molare di  $\text{AgNO}_3/\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  1:3,4. Una volta osservato il cambio di colore a giallo paglierino della sospensione, la reazione è stata interrotta e lasciata raffreddare a temperatura ambiente. La sospensione è stata infine trasferita in falcon da 50 ml oscurate con carta stagnola.

### 7.2.2. Sintesi biogenica

Le Ag NPs di origine biogenica sintetizzate in questo lavoro di Tesi sono state ottenute a partire da soluzioni acquose di  $\text{AgNO}_3$  a diverse concentrazioni (1 mM e 2,5 mM) e infuso di tè nero. Per i campioni 1 mM di  $\text{AgNO}_3$ , in un matraccio da 100 ml, sono stati disciolti 0,0170 g di sale precursore, mentre per i campioni 2,5 mM ne sono stati disciolti 0,0425 g. Per i primi campioni sono state testate varie temperature (RT, 40, 60, 80 °C), vari rapporti volumetrici v tè/v  $\text{AgNO}_3$  (1:12,5, 1:25; 1:50; 1:100; 1:150) e vari tempi di reazione (15, 30, 45 e 60 minuti). Una volta sciolto il sale, esso è stato trasferito in una beuta e, raggiunta la temperatura desiderata, è stato aggiunto goccia a goccia il volume desiderato di agente riducente

e la reazione è stata interrotta una volta trascorso il tempo di reazione testato. Per i campioni a concentrazione 2,5 mM di  $\text{AgNO}_3$ , la reazione è stata interrotta una volta verificatosi il cambio di colore della sospensione a giallo-marrone. La sospensione è stata poi trasferita in falcon da 50 ml oscurate con carta stagnola.

**Preparazione infuso di tè nero.** L'infuso di tè nero è stato ottenuto dall'infusione per 15 minuti a temperatura ambiente (RT) di foglie di tè nero (1,75 g) in 300 ml di acqua milli-Q e successiva filtrazione a gravità. La filtrazione è avvenuta con carta da filtro *Macherey-Nagel* con pori di dimensioni di 16  $\mu\text{m}$ .

## 7.3. Sintesi nanoparticelle d'oro

### 7.3.1. Sintesi Turkevich

Per la sintesi chimica delle Au NPs è stato seguito il protocollo Turkevich.[17] I campioni (1 mM e 2,5 mM) sono stati sintetizzati a partire da una soluzione acquosa di acido tetracloroaurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) e una soluzione di trisodio citrato diidrato ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) entrambi alla medesima concentrazione. Per il campione 1 mM sono stati sciolti 0,034 g di  $\text{HAuCl}_4$  e per il campione 2,5 mM sono stati sciolti 0,085 g di  $\text{HAuCl}_4$  in acqua milli-Q, entrambi in un matraccio da 100 ml. In un altro matraccio da 50 ml sono stati disciolti 0,50 g di  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  per il campione 1 mM e 1,25 g di  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  per il campione 2,5 mM. Le soluzioni acquose di  $\text{HAuCl}_4$  sono state poi trasferite in una beuta ed è stata scaldata alla temperatura desiderata (100 °C) sotto costante agitazione. Una volta raggiunta la temperatura, sono stati aggiunti goccia a goccia 10 ml di soluzione di  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , per ottenere un rapporto molare di  $\text{HAuCl}_4/\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  1:3,4. Una volta osservato il cambio di colore a rosso scuro della sospensione, la reazione è stata interrotta e lasciata raffreddare a temperatura ambiente. La sospensione è stata infine trasferita in falcon da 50 ml oscurate con carta stagnola.

### 7.3.2. Sintesi biogenica

Per le sintesi biogeniche, i campioni sono stati sintetizzati a partire da una soluzione acquosa di acido tetracloroaurico (HAuCl<sub>4</sub>) e infuso di tè nero. Le soluzioni di H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, testate alla concentrazione di 1 mM e 2,5 mM, sono state rispettivamente ottenute sciogliendo 0,034 g di H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> e 0,085 g di H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> in acqua milli-Q in un matraccio da 100 ml. Per i primi campioni (1 mM H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>) sono state testate varie temperature (RT e 40 °C) e vari rapporti volumetrici v tè/v AgNO<sub>3</sub> (1:10 e 1:2). Una volta sciolto il sale, esso è stato trasferito in una beuta e, raggiunta la temperatura desiderata, è stato aggiunto goccia a goccia il volume richiesto di agente riducente e la reazione è stata interrotta una volta avvenuto il cambio di colore a rosso scuro. In particolare, per il campione 1,0 mM ottenuto a temperatura di 40 °C con rapporto v tè/v H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> di 1:2, si è mantenuta la reazione a 40 °C per 10 minuti dopodichè la reazione è continuata a RT per i successivi 30 minuti. Per i campioni a concentrazione 2,5 mM di H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, l'ottimizzazione della sintesi è avvenuta a 40 °C e testando rapporti v tè/v H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> di 1:2 e 1:1. La reazione è stata condotta alla temperatura di 40 °C per 10 minuti e i successivi 30 minuti a RT, alla fine dei quali la sospensione ha assunto il tipico colore rosso scuro. La sospensione è stata poi trasferita in falcon da 50 ml oscurate con carta stagnola.

## 7.4. Analisi citotossicità delle nanoparticelle

La citotossicità delle Ag e Au NPs è stata valutata su una linea cellulare di carcinoma epiteliale alveolare umano (A549). Il saggio di vitalità cellulare MTS ha una durata di tre giorni: il primo giorno vengono seminate, in piastre da 96 pozzetti, 5000 cellule per pozzetto con un volume di 200 µl di terreno RPMI contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) e 1 % di antibiotico (penicillina o streptomina). Tale terreno viene comunemente chiamato terreno completo. Le cellule seminate in piastra vengono poi lasciate in incubazione a 37 °C per 24 ore, al termine del quale le cellule risulteranno adese al fondo del relativo pozzetto. Il secondo giorno vengono rimossi i 200 µl di terreno completo e le cellule vengono poi messe ad incubare con le sospensioni di NPs sintetizzate. Prima dell'incubazione, tali



sospensioni vengono purificate con un filtro per siringa sterile con pori da 0,22 µm (Merck Millex™-GS) e successivamente sono state preparate sei diverse sospensioni a concentrazione crescente di NPs, questa volta in terreno RPMI al 3 % di FBS. Per ogni concentrazione di Ag o Au NPs è stato prelevato un certo volume di sospensione madre contenente le NPs alla concentrazione di: 1) 0,25 g/L per entrambe le sospensioni (di sintesi chimica e biogenica) di Ag NPs e per la sospensione di Au NPs di sintesi biogenica; 2) 0,45 g/L per la sospensione di Au NPs di sintesi chimica. Il volume di sospensione madre prelevato è stato calcolato seguendo la formula:

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

$V_p$ : volume da prelevare

$C_f$ : concentrazione finale delle Ag NPs (0, 5, 10, 15, 20, 40 µg/ml) e Au NPs (0, 10, 20, 40, 60 e 80 µg/ml)

$V_f$ : volume finale (ossia 200 µl per pozzetto)

$C_i$ : concentrazione finale della sospensione madre

La fig. 50 mostra come è stata allestita la piastra nel presente lavoro di Tesi.

Il terzo giorno si elimina dai pozzetti il terreno di coltura al 3% FBS e si aggiungono 100 µl di terreno RPMI, ovvero terreno base senza FBS. Al buio, in ogni pozzetto, vengono aggiunti ulteriori 20 µl del sale di tetrazolio MTS (5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazoli)-3-(4-solfofenil) tetrazolio). La piastra viene poi riposta in incubatore a 37 °C per 40 minuti in modo da favorire la riduzione del sale di tetrazolio MTS a formazano. Solitamente, trascorso questo lasso di tempo si osserva un cambiamento di colore nei pozzetti (da giallo a viola) e dunque si procede con la lettura dell'assorbanza del formazano a 492 nm con un lettore per micropiastre (Spectramax 190, Molecular Device®).

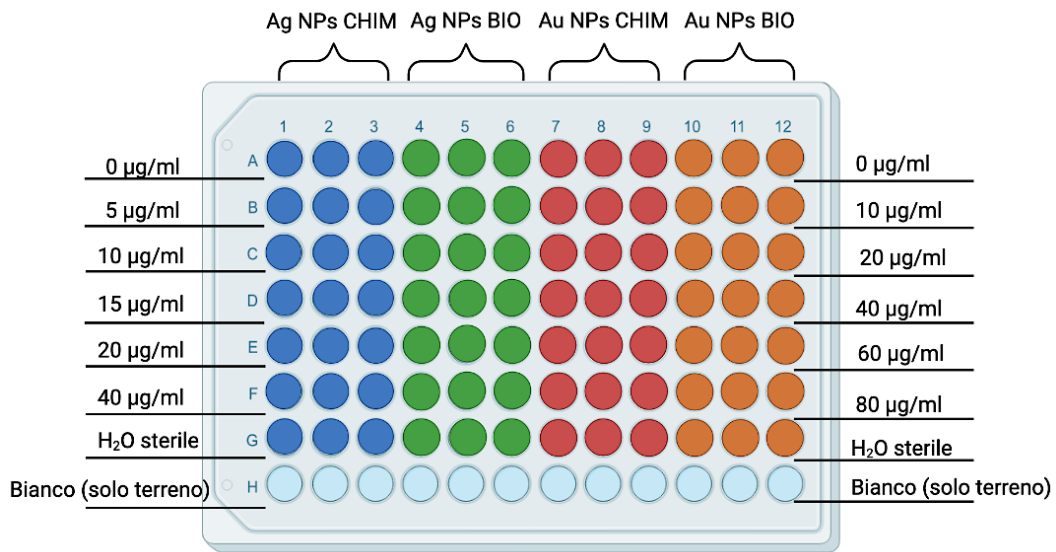


Figura 50: Schema di allestimento della piastra da 96 pozzetti per il saggio di vitalità MTS. Nei pozzetti a 0 µg/ml di NPs vi sono le cellule in coltura. Il bianco, invece, indica i pozzetti in cui viene inserito solo terreno RPMI base e sale MTS, qui non vi sono né cellule né NPs.

# Capitolo 8

## 8. Conclusioni e prospettive future

Il presente lavoro di Tesi ha permesso di ottenere interessanti risultati sperimentali riguardo le sintesi di nanomateriali metallici, Ag e Au NPs, mediante approcci di sintesi *wet chemistry*, quali riduzione chimica e biogenica.

In particolare, è stato osservato che l'approccio di sintesi mediante riduzione chimica (protocollo Lee-Meisel per le Ag NPs e Turkevich per le Au NPs), effettuato a temperature moderate (100 °C), ha consentito di ottenere nanoparticelle di Ag e Au con una buona omologia morfologica e dimensionale in tempi di reazione inferiori rispetto a quelli delle sintesi biogeniche (condotte a temperature più basse). Le NPs, infatti, risultano sferiche con dimensioni che rientrano tra i 30 e i 55 nm, in particolare di  $44 \pm 10$  nm per le Ag NPs e  $32 \pm 4$  nm per le Au NPs. Al contrario, mediante le sintesi biogeniche, condotte a temperatura più bassa (RT per le Ag NPs e 40 °C per le Au NPs) e con tempi di reazione più lunghi utilizzando l'infuso di tè nero come agente riducente e stabilizzante, sono state ottenute sospensioni di NPs caratterizzate da un'ampia eterogeneità sia morfologica che dimensionale. Infatti, nonostante la maggioranza di Ag e Au NPs presentino una forma sferica con un diametro di circa 26 nm, il range delle dimensioni risulta essere più ampio, spaziando tra i 10 e i 35 nm. Inoltre, dalle immagini TEM si è osservato la presenza di impurità e prodotti con differente morfologia e dimensioni notevolmente più elevate: nella sospensione di Ag NPs sono state osservate particelle cubiche con dimensioni di  $164 \pm 52$  nm, mentre nelle sospensioni di Au NPs si riscontrano particelle prismatiche di dimensioni di  $52 \pm 42$  nm. Inoltre, sebbene le sospensioni ottenute mediante entrambi gli approcci di riduzione non mostrino macroscopicamente la formazione di precipitato nei quattro giorni successivi alla sintesi, dalla caratterizzazione del loro Potenziale  $\zeta$ , si è osservata una maggiore stabilità delle sospensioni di derivazione chimica rispetto a quelle di derivazione biogenica. Quindi, in generale, si può asserire che la temperatura di reazione risulti fondamentale nel favorire la cinetica di reazione ottimizzandone i tempi, oltre al tipo di agente riducente utilizzato. Quest'ultimo, oltre ad avere un

ruolo nella cinetica di reazione, è risultato essere un agente cruciale riguardo il controllo della dimensione e morfologia delle NPs ottenute. Infatti, nonostante l'infuso di tè nero (riduzione biogenica) permetta la formazione di alcune NPs di diametro inferiore rispetto a quelle ottenute con il trisodio citrato diidrato (riduzione chimica), l'ampia distribuzione dimensionale e morfologica di particelle ottenuta implica che sia necessaria un'ulteriore ottimizzazione della sintesi biogenica di nanoparticelle di Ag e Au.

Per una possibile applicazione in biomedicina di tali nanomateriali, oltre alle caratteristiche sopracitate, è stata valutata la loro stabilità in sospensione nei confronti dell'aggregazione in siero e la loro biocompatibilità. In particolare, sono verificate sia la stabilità in sospensione in ambiente acquoso al 3% FBS (v/v), sia la relativa citotossicità in colture cellulari 2D. Seppur non si presenti, a livello macroscopico, formazione di aggregati (o precipitato) nei due giorni successivi al trattamento con FBS al 3% (v/v), il potenziale  $\zeta$  relativo a tutte le sospensioni denota una scarsa stabilità (nel lungo termine) data dai valori che rientrano nel range compreso tra  $\pm 30$  mV. Inoltre, dai dati di DLS effettuati sui medesimi campioni si può ipotizzare la formazione di una corona proteica attorno alle NPs che potrebbe influenzare la loro interazione a livello cellulare e di conseguenza i loro effetti sulle cellule.

La citotossicità delle Ag e Au NPs è stata analizzata in cellule umane della linea A549, mediante osservazione dei cambiamenti morfologici cellulari e saggi MTS in colture 2D. I risultati mostrano come le Ag NPs di riduzione biogenica abbiano un effetto citotossico più evidente rispetto a quelle di derivazione chimica, le quali mostrano effetti citotossici solo alla maggiore concentrazione testata (40  $\mu\text{g/ml}$ ). Per quanto riguarda le Au NPs di derivazione biogenica, seppur i relativi grafici di citotossicità mostrino degli effetti tossici poco più marcati rispetto a quelle di origine chimica, i relativi *p*-value dimostrano come entrambi i tipi di Au NPs non presentino evidenti proprietà citotossiche, poiché le differenze riscontrate con il controllo (cellule non trattate con NPs) non sono statisticamente rilevanti. Tali osservazioni confermano la loro alta biocompatibilità, anche ad elevate concentrazioni. Si presume che le molecole organiche presenti sulla superficie delle NPs derivate dal tè contribuiscano, seppur in maniera poco evidente, all'effetto citotossico delle NPs e che quindi l'aumento della tossicità riscontrato nelle Ag NPs

di origine biogenica sia da attribuire in particolar modo ad un effetto dimensionale (dimensioni ridotte).

## 8.1. Prospettive future

Per un'eventuale applicazione in campo biomedico di tali nanomateriali, vi è innanzitutto da ottimizzare le sintesi in modo da ottenere un'elevata riproducibilità che permetta il loro *scale-up*. Ma non solo, in ottica di salvaguardia della salute e dell'ambiente, è bene focalizzare la ricerca sui metodi di sintesi biogenica. Per quanto riguarda questo tipo di sintesi, svolto con l'utilizzo del tè nero, vi sono ancora numerosi aspetti da chiarire e da ottimizzare. Uno di questi riguarda la ricerca sul migliore sfruttamento delle proprietà riducenti e stabilizzanti delle molecole organiche presenti nell'infuso di tè, in maniera da ottenere una sospensione che presenti un minor numero di prodotti aspecifici. Una maniera potrebbe essere di ottimizzare il processo di filtrazione dell'infuso di tè che avviene a monte della sintesi. Inoltre, la sintesi biogenica, che cerca di racchiudere i principi della *Green Chemistry*, viene condotta a basse temperature, ma risulta avere tempi di reazione più lunghi rispetto alla sintesi chimica che avviene a elevate temperature. Risulta quindi necessario, in ottica di ottimizzazione della reazione, chiarire quale sia l'impatto, in termini energetici, dell'utilizzo delle temperature moderate (100 °C) rispetto all'utilizzo prolungato del tempo di agitazione e, qualora fossero necessari entrambi, trovare il giusto compromesso tra questi due parametri. Infine, per validare in modo completo l'effettiva applicazione in campo biomedico delle nanostrutture sintetizzate, è necessario un approfondimento delle analisi citotossiche su altri tipi di cellule umane, comprese cellule non tumorali, attraverso l'utilizzo di saggi di proliferazione cellulare più sensibili, come quello clonogenico, saggi di morte cellulare e di stress ossidativo, da applicare anche in colture cellulari in condizioni di crescita tridimensionale, più simili all'ambiente dei tessuti *in vivo*.



## 9. Bibliografia

1. Baig, N., Kammakakam, I., Falath, W., e Kammakakam, I. (2021) Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, **2** (6), 1821–1871.
2. Hulla, J.E., Sahu, S.C., e Hayes, A.W. (2015) Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*, **34** (12), 1318–1321.
3. EUR-Lex - 32011H0696 - EN - EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=CELEX%3A32011H0696>, 28.02.23
4. Schmid, G. (2004) Nanoparticles: From Theory to Application. *Wiley VCH*.
5. The Royal Society, The Royal Academy of Engineering (Great Britain) (2004) Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. *The Royal Society*, **46**, 618–618.
6. Borsella, E. (2008) Nanoscienze e Nanotecnologie. 120.
7. Zivic, F., Grujovic, N., Mitrovic, S., Ahad, I.U., e Brabazon, D. (2017) Characteristics and applications of silver nanoparticles. *Springer International Publishing*, 227–273.
8. Hammami, I., Alabdallah, N.M., Jomaa, A. Al, e Kamoun, M. (2021) Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of King Saud University - Science*, **33** (7).
9. Lee, S.H., e Jun, B.H. (2019) Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, **20** (4).
10. Azharuddin, M., Zhu, G.H., Das, D., Ozgur, E., Uzun, L., Turner, A.P.F., e Patra, H.K. (2019) A repertoire of biomedical applications of noble metal nanoparticles. *Chemical Communications*, **55** (49), 6964–6996.
11. Vajtai, R. (2013) Noble Metal Nanoparticles. *Springer Handbook of Nanomaterials*. **9**, 303-388.
12. Park, M.V.D.Z., Neigh, A.M., Vermeulen, J.P., de la Fonteyne, L.J.J., Verharen, H.W., Briedé, J.J., van Loveren, H., e de Jong, W.H. (2011) The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, **32** (36), 9810–9817.
13. Gaspera, E. Della (2021) Special Issue “Wet Chemical Synthesis of Functional Nanomaterials.” *Nanomaterials*, **11** (4), 1044.

14. Anastas, P., e Eghbali, N. (2009) Green Chemistry: Principles and Practice. *The royal Society of Chemistry*. **39**, 301-312.
15. Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., e Parikh, R.Y. (2010) Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **6** (2), 257–262.
16. Lee, P.C., e Meisel, D. (1982) Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of physical Chemistry*, **86** (17), 3391–3395.
17. Turkevich, J., Stevenson, P.C., e Hillier, J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussion of the Faraday Society.*, **11** (0), 55–75.
18. Onitsuka, S., Hamada, T., e Okamura, H. (2019) Preparation of antimicrobial gold and silver nanoparticles from tea leaf extracts. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **173**, 242–248.
19. Wheeler, D.S., e Wheeler, W.J. (2004) The Medicinal Chemistry of Tea. *Drug Development Research*, **61** (2), 45–65.
20. Yannopoulos, J.C. (1991) Physical and Chemical Properties of Gold Fullerenes. *The extractive Metallurgy of Gold*. (2), 11-23
21. Shenashen, M.A., El-Safty, S.A., e Elshehy, E.A. (2014) Synthesis, morphological control, and properties of silver nanoparticles in potential applications. *Particle & Particle Systems Characterization*, **31** (3), 293–316.
22. Meena, J., Gupta, A., Ahuja, R., Panda, A.K., and Bhaskar, S. (2020) Inorganic Particles for Delivering Natural Products. *Sustainable Agriculture Reviews*, **44**, 205-241.
23. Abbasi, E., Milani, M., Aval, S.F., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Nasrabadi, H.T., Nikasa, P., Joo, S.W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., e Samiei, M. (2016) Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology.*, **42** (2), 173–180.
24. Evanoff, D.D., e Chumanov, G. (2005) Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem*, **6** (7), 1221–1231.
25. Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O.M., e Iatì, M.A. (2017) Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **29** (20).
26. Ielo, I., Rando, G., Giacobello, F., Sfameni, S., Castellano, A., Galletta, M., Drommi, D., Rosace, G., e Plutino, M.R. (2021) Synthesis, chemical–physical characterization, and biomedical applications of functional gold nanoparticles: A review. *Molecules*, **26** (19), 5823.



27. Yeh, Y.C., Czeran, B., e Rotello, V.M. (2012) Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, **4** (6), 1871–1880.
28. Choudhary, M.K., Kataria, J., e Sharma, S. (2018) Evaluation of the kinetic and catalytic properties of biogenically synthesized silver nanoparticles. *Journal of Cleaner Production*, **198**, 882–890.
29. Sardar, R., Funston, A.M., Mulvaney, P., e Murray, R.W. (2009) Gold nanoparticles: Past, present, and future. *Langmuir*, **25** (24), 13840–13851.
30. Barreiro, E., Casas, J.S., Couce, M.D., Sánchez, A., Seoane, R., Sordo, J., Varela, J.M., e Vázquez-López, E.M. (2006) Synthesis and antimicrobial activities of silver(i) sulfanylcarboxylates. Structural isomers with identically or unequally coordinated Ag centers in an Ag<sub>4</sub>S<sub>4</sub> ring. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **30** (28), 3074–3085.
31. Sadeghi, B., Garmaroudi, F.S., Hashemi, M., Nezhad, H.R., Nasrollahi, A., Ardalan, S., e Ardalan, S. (2012) Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates. *Advanced Powder Technology*, **23** (1), 22–26.
32. Bhunia, A.K., Samanta, P.K., Aich, D., Saha, S., e Kamilya, T. (2015) Biocompatibility study of protein capped and uncapped silver nanoparticles on human hemoglobin. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **48** (23), 235305.
33. AshaRani, P. V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., e Valiyaveetil, S. (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, **3** (2), 279–290.
34. Lu, Z., Zhang, J., Yu, Z., Liu, X., Zhang, Z., Wang, W., Wang, X., Wang, Y., e Wang, D. (2017) Vancomycin-hybrid bimetallic Au/Ag composite nanoparticles: Preparation of the nanoparticles and characterization of the antibacterial activity. *New Journal of Chemistry*, **41** (13), 5276–5279.
35. Liu, S., e Lämmerhofer, M. (2019) Functionalized gold nanoparticles for sample preparation: A review. *Electrophoresis* **40** (18-19), 2438-2461.
36. Talarska, P., Boruckowski, M., e Żurawski, J. (2021) Current knowledge of silver and gold nanoparticles in laboratory research—application, toxicity, cellular uptake. *Nanomaterials*, **11** (9).
37. Huang, Y., Li, X., Liao, Z., Zhang, G., Liu, Q., Tang, J., Peng, Y., Liu, X., e Luo, Q. (2007) A randomized comparative trial between Acticoat and SD-Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis. *Burns*, **33** (2), 161–166.

38. Gurunathan, S., Han, J.W., Dayem, A.A., Eppakayala, V., Park, J.H., Cho, S.G., Lee, K.J., e Kim, J.H. (2013) Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles and its potential cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Industrial Engineering Chemistry*, **19** (5), 1600–1605.
39. Beik, J., Khateri, M., Khosravi, Z., Kamrava, S.K., Kooranifar, S., Ghaznavi, H., e Shakeri-Zadeh, A. (2019) Gold nanoparticles in combinatorial cancer therapy strategies. *Journal of Industrial Engineering Chemistry*, **387**, 299–324.
40. Kennedy, L.C., Bear, A.S., Young, J.K., Lewinski, N.A., Kim, J., Foster, A.E., e Drezek, R.A. (2011) T cells enhance gold nanoparticle delivery to tumors in vivo. *Nanoscale Research Letters*, **6** (1), 1–11.
41. Coluccio, M.L., Francardi, M., Gentile, F., Candeloro, P., Ferrara, L., Perozziello, G., e Di Fabrizio, E. (2016) Plasmonic 3D-structures based on silver decorated nanotips for biological sensing. *Optics and Lasers Engineering*, **76**, 45–51.
42. Kim, D., Jeong, Y.Y., e Jon, S. (2010) A drug-loaded aptamer - Gold nanoparticle bioconjugate for combined ct imaging and therapy of prostate cancer. *ACS Nano*, **4** (7), 3689–3696.
43. Manno, D., Filippo, E., Di Giulio, M., e Serra, A. (2008) Synthesis and characterization of starch-stabilized Ag nanostructures for sensors applications. *Journal of Non Crystalline Solids*, **354** (52–54), 5515–5520.
44. Liu, G., Mao, X., Phillips, J.A., Xu, H., Tan, W., e Zeng, L. (2009) Aptamer-nanoparticle strip biosensor for sensitive detection of cancer cells. *Analytical Chemistry*, **81** (24), 10013–10018.
45. Lovatel, R.H., Neves, R.M., Oliveira, G.R., Mauler, R.S., Crespo, J.S., Carli, L.N., e Giovanela, M. (2015) Disinfection of biologically treated industrial wastewater using montmorillonite/alginate/nanosilver hybrids. *Journal of Water Process Engineering*, **7**, 273–279.
46. Stephen Inbaraj, B., e Chen, B.H. (2016) Nanomaterial-based sensors for detection of foodborne bacterial pathogens and toxins as well as pork adulteration in meat products. *Journal of Food Drug Analysis*, **24** (1), 15–28.
47. Durán, N., Marcato, P.D., De Souza, G.I.H., Alves, O.L., e Esposito, E. (2007) Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal Biomedical Nanotechnology*, **3** (2), 203–208.
48. Das, M., Shim, K.H., An, S.S.A., e Yi, D.K. (2011) Review on gold nanoparticles and their applications. *Toxicology Environmental Health Sciences*, **3** (4), 193–205.

49. Bai, X., Wang, Y., Song, Z., Feng, Y., Chen, Y., Zhang, D., e Feng, L. (2020) The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (7).
50. Jamkhande, P.G., Ghule, N.W., Bamer, A.H., and Kalaskar, M.G. (2019) Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **53** (July 2018), 101174.
51. Thanh, N.T.K., Maclean, N., e Mahiddine, S. (2014) Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chemical Reviews*, **114** (15), 7610–7630.
52. Schmidt, A., Schneiders, M., Döpfner, M., e Lehmkuhl, G. (2003) Störungskonzepte für psychische probleme bei Jugendlichen. Pilotstudie zur validierung eines fragebogens zu störungskonzepten bei psychischen problemen von Jugendlichen (SSPJ). *Zeitschrift für Kinder Jugendpsychiatrie und Psychother.*, **31** (2), 111–121.
53. Wulandari, P., Nagahiro, T., Fukada, N., Kimura, Y., Niwano, M., e Tamada, K. (2015) Characterization of citrates on gold and silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **438**, 244–248.
54. Traboulsi, H., e Awada, C. (2020) Toward the Development of Ultrasensitive Detectors for Environmental Applications: A Kinetic Study of Cr(III) Monitoring in Water Using EDTA and SERS Techniques. *ACS Omega*, **5** (48), 31352–31361.
55. Zhao, P., Li, N., e Astruc, D. (2013) State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, **257** (3–4), 638–665.
56. Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P.C., Clubb, P., Rico, C., He, F., e Hong, J. (2022) Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*, **26**.
57. Li, S., Lo, C.Y., Pan, M.H., Lai, C.S., e Ho, C.T. (2013) Black tea: Chemical analysis and stability. *Food & Function*, **4** (1), 10–18.
58. Singh, B.N., Prateeksha, P., Rawat, A.K.S., Bhagat, R.M., e Singh, B.R. (2017) Black tea: Phytochemicals, cancer chemoprevention, and clinical studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57** (7), 1394–1410.
59. Cataldo, F. (2014) Green synthesis of silver nanoparticles by the action of black or green tea infusions on silver ions. *European Chemical Bulletin*, **3** (3), 280–289.
60. Alegria, E.C.B.A., Ribeiro, A.P.C., Mendes, M., Ferraria, A.M., Botelho do Rego, A.M., e Pombeiro, A.J.L. (2018) Effect of phenolic compounds on the

synthesis of gold nanoparticles and its catalytic activity in the reduction of nitro compounds. *Nanomaterials*, **8** (5).

61. Begum, N.A., Mondal, S., Basu, S., Laskar, R.A., e Mandal, D. (2009) Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **71** (1), 113–118.
62. Asghar, M.A., Zahir, E., Shahid, S.M., Khan, M.N., Asghar, M.A., Iqbal, J., e Walker, G. (2018) Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using green and black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B1 adsorption activity. *LWT - Food Science and Technology*, **90**, 98–107.
63. Lewinski, N., Colvin, V., e Drezek, R. (2008) Cytotoxicity of nanopartides. *Small*, **4** (1), 26–49.
64. Petersen, E.J., Mortimer, M., Burgess, R.M., Handy, R., Hanna, S., Ho, K.T., Johnson, M., Loureiro, S., Selck, H., Scott-Fordsmand, J.J., Spurgeon, D., Unrine, J., Van Den Brink, N.W., Wang, Y., White, J., e Holden, P. (2019) Strategies for robust and accurate experimental approaches to quantify nanomaterial bioaccumulation across a broad range of organisms. *Environmental Science: Nano*, **6** (6), 1619–1656.
65. Sung, J.H., Ji, J.H., Park, J.D., Song, M.Y., Song, K.S., Ryu, H.R., Yoon, J.U., Jeon, K.S., Jeong, J., Han, B.S., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Kim, D.W., Kelman, B.J., e Yu, I.J. (2011) Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. *Particle Fibre Toxicology*, **8**, 1–18.
66. Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., e Parks, W.P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, **51** (5), 1417–1423.
67. Martin, A., e Sarkar, A. (2017) Overview on biological implications of metal oxide nanoparticle exposure to human alveolar A549 cell line. *Nanotoxicology*, **11** (6), 713–724.
68. Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., e Nelson-Rees, W. (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Internationa Journal of Cancer*, **17** (1), 62–70.
69. Perea, L., Coll, M., e Sancho-Bru, P. (2015) Assessment of liver fibrotic insults in vitro. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. 1250, 391-401.
70. Yen, H.J., Hsu, S.H., e Tsai, C.L. (2009) Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*, **5** (13), 1553–1561.

71. Kaur, J., e Tikoo, K. (2013) Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, **51** (1), 1–14.
72. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., e Sivas, H. (2017) Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables, in *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 271–297.
73. Adan, A., Kiraz, Y., e Baran, Y. (2016) Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **17** (14), 1213–1221.
74. Oprica, L., Andries, M., Sacarescu, L., Popescu, L., Pricop, D., Creanga, D., e Balasoiu, M. (2020) Citrate-silver nanoparticles and their impact on some environmental beneficial fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **27** (12), 3365–3375.
75. Rashid, M.U., Bhuiyan, M.K.H., e Quayum, M.E. (2013) Synthesis of silver nano particles (Ag-NPs) and their uses for quantitative analysis of vitamin C tablets. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12** (1), 29–33.
76. Xu, H., e Suslick, K.S. (2007) Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters. *Advanced Materials*, **22** (10), 1078-1082.
77. Amendola, V., Meneghetti, M., Stener, M., Guo, Y., Chen, S., Crespo, P., García, M.A., Hernando, A., Pengo, P., e Pasquato, L. (2014) Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles. *Comprehensive Analytical Chemistry*, **66**, 81-152.
78. Mazzonello, A., Valdramidis, V.P., Farrugia, C., Grima, J.N., Valdramidis, V. V, e Gatt, R. (2017) Synthesis and characterization of silver nanoparticles. *International Journal of Modern Engineering Research*, **7** (3).
79. Sreeram, K.J., Nidhin, M., Indumathy, R., e Nair, B.U. (2008) Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. *Bulletin of Materials Science*, **31** (1), 93–96.
80. Malvern Ltd. (2011) Zeta potential: An Introduction in 30 minutes. *Zetasizer Nano Serles Tech. Note. MRK654-01*, **2**, 1–6.
81. (2014)  $\zeta$ -potential. *IUPAC Compend. Chem. Terminol.* <https://goldbook.iupac.org/terms/view/E01968>
82. Gillot-Stokkink, A.J., e Cardozo, R.L. (1969) Zeta potential control applied to the treatment of radioactive effluent. *European Atomic Energy*, Lussemburgo.
83. Beer (1852) Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik*, **162** (5), 78–88.

84. Bhui, D.K., Bar, H., Sarkar, P., Sahoo, G.P., De, S.P., e Misra, A. (2009) Synthesis and UV-vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. *Journal of Molecular Liquids*, **145** (1), 33–37.
85. Masooleh, A.K., Ahmadikhah, A., e Saidi, A. (2019) Green synthesis of stable silver nanoparticles by the main reduction component of green tea (*Camellia sinensis* L.). *IET Nanobiotechnology*, **13** (2), 183–188.
86. Kharia, A.A., Singhai, A.K., e Verma, R. Kharia et al: Formulation and Evaluation of Polymeric Nanoparticles of an Antiviral Drug for Gastroretention Formulation and Evaluation of Polymeric Nanoparticles of an Antiviral Drug for Gastroretention. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology(IJPSN)*, **4** (4).
87. Guldberg, A. (1919) On the theory of frequency-distributions. *Scandinavian Actuarial Journal*, **1919** (1), 224–232.
88. Anastas, P., e Warner, J. (2000) Green Chemistry: Theory and Practice. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York.
89. Sodio citrato tribasico diidrato CAS 6132-04-3 | 106432. [https://www.merckmillipore.com/IT/it/product/tri-Sodium-citrate-dihydrate,MDA\\_CHEM-106432](https://www.merckmillipore.com/IT/it/product/tri-Sodium-citrate-dihydrate,MDA_CHEM-106432)
90. Pillai, Z.S., e Kamat, P. V (2004) What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? *Journal of Physical Chemistry*, **108**, 945-951.
91. Lee, G.J., Shin, S. Il, Kim, Y.C., e Oh, S.G. (2004) Preparation of silver nanorods through the control of temperature and pH of reaction medium. *Materials. Chemistry Physics*, **84** (2–3), 197–204.
92. Lee, Y.-C., Chen, S.-J., e Huang, C.-L. (2010) Finding a Facile Method to Synthesize Decahedral Silver Nanoparticles through a Systematic Study of Temperature Effect on Photomediated Silver Nanostructure Growth. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **57** (3A), 325-331.
93. Jiang, X.C., Chen, W.M., Chen, C.Y., Xiong, S.X., e Yu, A.B. (2010) Role of Temperature in the Growth of Silver Nanoparticles Through a Synergetic Reduction Approach. *Nanoscale Research Letters*, **6**, 32.
94. Durán, N., Silveira, C.P., Durán, M., e Martinez, D.S.T. (2015) Silver nanoparticle protein corona and toxicity: A mini-review. *Journal of Nanobiotechnology*, **13** (1), 1–17.
95. Wuithschick, M., Birnbaum, A., Witte, S., Sztucki, M., Vainio, U., Pinna, N., Rademann, K., Emmerling, F., Kraehnert, R., e Polte, J. (2015) Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common

Gold Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano*, **9** (7), 7052–7071.

96. Gao, Y., e Torrente-Murciano, L. (2020) Mechanistic insights of the reduction of gold salts in the Turkevich protocol. *Nanoscale*, **12** (4), 2740–2751.
97. Schulz, F., Homolka, T., Bastús, N.G., Puentes, V., Weller, H., e Vossmeier, T. (2014) Little adjustments significantly improve the Turkevich synthesis of gold nanoparticles. *Langmuir*, **30** (35), 10779–10784.
98. Khlebtsov, N.G. (2008) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Analytical Chemistry*, **80** (17), 6620–6625.
99. Balasubramanian, S.K., Yang, L., Yung, L.Y.L., Ong, C.N., Ong, W.Y., e Yu, L.E. (2010) Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*, **31** (34), 9023–9030.
100. Kumar, S., Gandhi, K.S., e Kumar, R. (2007) Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method . *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **47** (10), 3128-3136.
101. Verma, H.N., Singh, P., e Chavan, R.M. (2014) Gold nanoparticle: Synthesis and characterization. *Veterinary World*, **7** (2), 72–77.
102. Yu, L., e Li, N. (2019) Noble metal nanoparticles-based colorimetric biosensor for visual quantification: A mini review. *Chemosensors*, **7** (4).
103. Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G.J., e Puentes, V. (2010) Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*, **4** (7), 3623–3632.
104. Burgess, C. (2007) Chapter 1 The basics of spectrophotometric measurement. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, **27**, 1–19.
105. Carvalho, P.M., Felício, M.R., Santos, N.C., Gonçalves, S., e Domingues, M.M. (2018) Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Frontiers in Chemistry*, **6**, 237.





# Ringraziamenti

Alla fine del mio percorso di Tesi desidero ringraziare la mia relatrice, la Prof.ssa Silvia Gross, per il suo entusiasmo, la sua fiducia e i preziosi consigli che mi hanno guidato lungo questo percorso di crescita professionale.

Desidero ringraziare anche la mia correlatrice, la Prof.ssa Maddalena Mognato per avermi seguita nel breve periodo trascorso con lei.

Un sentito grazie lo dedico a Susanna, Davide, Vincenzo, Rosa e tutti i ragazzi del gruppo AK colloidi, per avermi seguita, incoraggiata ed aiutata, senza mai farmi sentir sola.

Dei ringraziamenti speciali, infine, vanno alle persone che ho più a cuore, la mia famiglia e i miei amici, sia di vecchia data che non. Sono stata un po' assente, ma nonostante questo, mai mi avete fatto mancare il supporto e la fiducia, dimostrandomi sempre un grande affetto.