

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**NANOSTRUTTURE INORGANICHE FUNZIONALI VIA
MINIEMULSIONE: SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E
FUNZIONALIZZAZIONE**

Relatore: Dott.ssa Silvia Gross

Controrelatore: Prof. Leonard Prins

LAUREANDA: Giulia Morgese

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

Indice

Abbreviazioni ed acronimi	Pag. 1
Introduzione e obiettivi della tesi	Pag. 5
Capitolo 1 – Miniemulsioni	Pag. 9
1.1 – Definizione e classificazione	Pag. 9
1.2 – Tensioattivi	Pag. 10
1.3 – Modalità di preparazione	Pag. 14
1.4 – Stabilità delle miniemulsioni	Pag. 15
1.5 – Miniemulsioni come nanoreattori in chimica inorganica	Pag. 16
Capitolo 2 – Nanosistemi inorganici	Pag. 19
2.1 – Solfuro di rame(II) nanostrutturato	Pag. 21
2.1.1 – Proprietà chimico-fisiche e strutturali	Pag. 21
2.1.2 – Metodologie di sintesi (stato dell'arte)	Pag. 22
2.1.3 – Applicazioni	Pag. 24
2.2 – Solfuro di manganese(II) nanostrutturato	Pag. 27
2.2.1 – Proprietà chimico-fisiche e strutturali	Pag. 28
2.2.2 – Metodologie di sintesi (stato dell'arte)	Pag. 28
2.2.3 – Applicazioni	Pag. 29
Capitolo 3 – <i>Bioimaging</i>	Pag. 31
3.1 – <i>Imaging</i> molecolare	Pag. 31
3.1.1 – Requisiti dei fluorofori	Pag. 32
3.1.2 – Fluorofori organici e <i>quantum dots</i> inorganici	Pag. 34

3.1.3 – Drogaggio con ioni dei lantanidi e luminescenza	Pag. 37
Capitolo 4 – Funzionalizzazione superficiale dei nanosistemi	Pag. 41
4.1 – Introduzione	Pag. 41
4.2 – Leganti	Pag. 43
4.2.1 – Caratteristiche chimico-fisiche e strutturali	Pag. 43
4.2.2 – Tipologie	Pag. 44
4.2.2.1 – Molecole a basso peso molecolare	Pag. 44
4.2.2.2 – Lipidi	Pag. 48
4.2.2.3 – Silice	Pag. 49
4.2.2.4 – Polimeri	Pag. 49
4.3 – Strategie di funzionalizzazione	Pag. 52
4.3.1 – Scambio di leganti multistadio	Pag. 53
4.3.2 – Scambio di leganti diretto	Pag. 54
Capitolo 5 – Risultati sperimentali e discussione	Pag. 55
5.1 – Sintesi di solfuro di rame puro e drogato con miscela di tensioattivi (Brij-52 e Igepal-CO630)	Pag. 56
5.1.1 – Natura dei precursori	Pag. 56
5.1.2 – Rapporti molari dei precursori	Pag. 75
5.1.3 – Condizioni di sonicazione	Pag. 78
5.2 – Sintesi di solfuro di manganese con miscela di tensioattivi (Brij-52 e Igepal-CO630)	Pag. 81
5.2.1 – Natura dei precursori	Pag. 81
5.2.2 – Rapporti molari dei precursori	Pag. 84
5.3 – Funzionalizzazione delle nanoparticelle	Pag. 85

5.3.1 – Sintesi del legante	Pag. 85
5.3.2 – Caratterizzazione delle nanoparticelle funzionalizzate	Pag. 88
Capitolo 6 – Tecniche di caratterizzazione	Pag. 97
6.1 – Caratterizzazione chimico-fisica e strutturale	Pag. 97
6.1.1 – Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR)	Pag. 97
6.1.2 – Spettroscopia Micro-Raman	Pag. 97
6.1.3 – Spettroscopia NMR	Pag. 98
6.1.4 – Spettroscopia di assorbimento di raggi X (XAS)	Pag. 98
6.1.5 – Spettroscopia fotoelettronica di raggi X (XPS)	Pag. 99
6.1.6 – Diffrazione di raggi X (XRD)	Pag. 103
6.1.7 – Analisi termogravimetrica (TGA) e Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)	Pag. 105
6.1.8 – Spettroscopia di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)	Pag. 105
6.1.9 – <i>Dynamic Light Scattering (DLS)</i>	Pag. 106
6.1.10 – Microscopia elettronica in trasmissione (TEM)	Pag. 107
6.1.11 – Microscopia elettronica a scansione (SEM)	Pag. 108
6.1.12 – Microscopia di forza atomica (AFM)	Pag. 108
6.2 – Caratterizzazione funzionale	Pag. 109
6.2.1 – Fotoluminescenza	Pag. 109
Capitolo 7 – Parte sperimentale	Pag. 111
7.1 – Sintesi di CuS e CuS:M (M = Eu, Sm, Tb, Gd e Mn)	Pag. 112
7.2 – Sintesi di MnS	Pag. 113
7.3 – Sintesi di PMOXA-nitrodopamina	Pag. 113

7.4 – Protocollo di funzionalizzazione delle nanoparticelle	Pag. 115
Capitolo 8 – Conclusioni e prospettive	Pag. 117
Bibliografia	Pag. 119
Appendice	Pag. 129
Ringraziamenti	Pag. 135

Abbreviazioni ed acronimi

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
BE	<i>Binding Energy</i>
bp	<i>boiling point</i>
CBD	<i>Chemical Bath Deposition</i>
CCD	<i>Coupled Charge Device</i>
CMC	Concentrazione Micellare Critica
CT	<i>Computed Tomography</i>
CTAB	CetilTrimetilAmmonioBromuro
DCC	DiCicloesilCarbodiimmide
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	Dimetilformammide
DOPA	<i>DihydrOxyPhenylAlanine</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EDXS	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
ESCA	<i>Electron Spectroscopy for Chemical Analysis</i>
EXAFS	<i>Extended X-Ray Absorption Fine-Structure Spectroscopy</i>
FT-IR	<i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i>
FWHM	<i>Full Width at Half-Maximum</i>
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>
HRP	Enzima Horseradish Peroxidase
IC	Intervallo di Confidenza
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
IR	Infrarosso
KE	<i>Kinetic Energy</i>
LDH	Lattato deidrogenasi
LED	<i>Light Emitted Diode</i>

mp	<i>melting point</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NHS	N-idrossisuccinimide
NIR	<i>Near InfraRed</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NP	NanoParticella
o/w	<i>oil in water</i>
PAT	<i>PhotoAcoustic Tomography</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEG	PoliEtilenGlicole
PEOXA	Polietilossazolina
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PIT	<i>Phase Inversion Temperature</i>
PMOXA	Polimetilossazolina
POX	Poliossazoline
PTFE	Politetrafluoroetilene
PTT	<i>PhotoThermal Therapy</i>
QD	<i>Quantum Dot</i>
SAED	<i>Selected Area Electron Diffraction</i>
SDS	Sodio Dodecil Solfato
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
TA	Acido tioacetico
TAA	Tioacetammide
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TGA	<i>ThermoGravimetric Analysis</i>
THF	Tetraidrofurano
TMB	Tetrametilbenzidina
UHV	Ultra alto vuoto
UV	Ultravioletto

w/o	<i>water in oil</i>
XAFS	<i>X-ray Absorption Fine-structure Spectroscopy</i>
XANES	<i>X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy</i>
XAS	<i>X-ray Absorption Spectroscopy</i>
XPS	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>
ZPC	<i>Zero Point Charge</i>

Introduzione e obiettivi della tesi

I sistemi inorganici nanostrutturati sono materiali di natura inorganica costituiti da elementi con almeno una dimensione compresa tra 1 e 100 nm. L'interesse accademico e industriale per questi materiali deriva dalle loro proprietà chimico-fisiche, diverse da quelle dei sistemi di identica composizione, ma aventi dimensioni macroscopiche. Il passaggio da solidi "infinitamente estesi" a strutture costituite da un numero finito di atomi determina variazioni sostanziali di alcune proprietà, ad esempio quelle elettriche, ottiche, magnetiche e catalitiche dei sistemi, riconducibili a due fenomeni di natura diversa: il confinamento quantico e gli effetti superficiali. Il primo fenomeno determina modifiche nelle proprietà elettroniche dei materiali in quanto, riducendo la dimensione delle strutture alla scala nanometrica, gli elettroni risultano confinati in uno spazio ristretto e le bande elettroniche si convertono gradualmente a livelli discreti di energia. Il secondo, invece, influenza prevalentemente la reattività e le transizioni di fase dei sistemi perché, in strutture nanometriche, il numero di atomi superficiali e, con esso, il rapporto superficie/volume, sono molto elevati [Schubert, 2005].

In funzione delle dimensioni e della loro forma, i nanomateriali acquisiscono proprietà diverse che li rendono molto versatili e quindi utilizzabili in vari settori della scienza e della tecnologia quali l'energetica, la sensoristica, l'elettronica e la catalisi [Kulisch, 2009]. Negli ultimi decenni, nanostrutture inorganiche di metalli e di semiconduttori sono state ampiamente studiate per le loro proprietà ottiche e magnetiche, al fine di estenderne l'applicazione in campo biomedico come potenziali marcatori fluorescenti o agenti ottici di contrasto [Selvan, 2010].

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di tesi, che si propone l'obiettivo di sintetizzare nanostrutture di solfuri metallici (CuS e MnS) mediante il metodo di chimica umida (*wet-chemistry*) della miniemulsione e di drogarle con ioni luminescenti di lantanidi per valutarne l'eventuale applicazione nel campo del *bioimaging* ottico.

L'*imaging* biomedico si basa sulla visualizzazione e sul monitoraggio non invasivi delle attività di molecole biologiche, cellule e tessuti mediante utilizzo di sonde luminescenti o magnetiche molecolari o di dimensioni nanometriche [Hahn, 2011].

La metodologia adottata in questo lavoro di tesi per la sintesi garantisce controllo delle dimensioni dei prodotti finali in quanto permette la nucleazione e la crescita dei sistemi nello spazio confinato di una goccia, stabilizzata da opportuni tensioattivi. Questi rimangono fisisorbiti sulla superficie delle nanostrutture e possono essere sostituiti con molecole selezionate opportunamente in base all'utilizzo e/o alle proprietà da conferire ai prodotti finali. Poiché, per essere impiegate in campo biomedico, le nanoparticelle devono essere utilizzabili in ambiente fisiologico ed essere quindi disperdibili in acqua, obiettivo ulteriore di questo lavoro è quello di funzionalizzare i sistemi ottenuti con un legante polimerico idrofilico e verificarne la stabilità in fase acquosa.

La scelta dei solfuri deriva dalla volontà di estendere il metodo delle miniemulsioni alla sintesi di composti inorganici diversi da ossidi, fosfati, solfati e carbonati, ai quali la tecnica è stata applicata con successo [Dolcet, 2012; Dolcet, 2013; Muñoz-Espí, 2012; Nabih, 2011]. L'interesse per i solfuri metallici nanostrutturati deriva dalle loro interessanti proprietà ottiche, termoelettriche e semiconduttrici [Lai, 2012]. Come per altre tipologie di sistemi inorganici, le strategie sintetiche utilizzate per la preparazione di questi materiali ne influenzano morfologia, dimensioni e distribuzione dimensionale.

Il solfuro di rame(II), CuS, è un semiconduttore che trova applicazione come materiale costituente film conduttori trasparenti capaci di trasmettere solo la regione visibile dello spettro solare, come catalizzatore e come additivo per conferire conducibilità ai materiali polimerici [Armelaio, 2006]. Nanoparticelle di solfuro di rame sono inoltre oggetto di recente studio per applicazioni in campo biomedico in quanto rappresentano materiali promettenti per le terapie fototermiche dei tumori [Li, 2010] e potenziali agenti di contrasto per l'*imaging* dei tessuti profondi mediante tomografia fotoacustica [Ku, 2012].

Il solfuro di manganese(II), MnS, appartiene alla categoria dei semiconduttori di tipo p e viene utilizzato principalmente nei dispositivi optoelettronici e luminescenti e come materiale ottico *window/buffer* nelle celle solari [Pandey, 2011]. Le proprietà magnetiche di questo sistema vengono sfruttate in ambito biomedico per produrre sistemi utilizzabili come agenti di contrasto per la risonanza magnetica nucleare [Chilton, 1984].

Nanosistemi inorganici di questo tipo si possono ottenere mediante: i) metodi idro/solvotermali, ii) *chemical bath deposition*, iii) termolisi di precursori molecolari, iv) sintesi colloidale, v) microemulsione e vi) sintesi assistita da microonde [Cushing, 2004]. La tecnica delle miniemulsioni rappresenta un nuovo approccio sintetico con i vantaggi di garantire un elevato controllo delle dimensioni e della distribuzione dimensionale delle particelle e di permettere la produzione di sistemi nanocristallini a temperatura ambiente con basso dispendio di energia e di reagenti.

Una miniemulsione [Landfester, 2001; Landfester, 2003] è un sistema colloidale eterofasico "criticamente" stabilizzato, costituito da gocce di dimensioni nanometriche disperse in una fase continua non miscibile con esse. In base alla natura polare o apolare delle fasi dispersa e continua, le miniemulsioni si classificano in dirette (olio in acqua) o inverse (acqua in olio). La stabilità delle gocce nei confronti della collisione e della coalescenza è garantita dalla presenza di un tensioattivo; la degradazione per diffusione (*Ostwald ripening*) è invece impedita, o perlomeno rallentata, dall'introduzione nella fase dispersa di un co-stabilizzatore che, inducendo pressione osmotica circa uguale all'interno delle gocce, riduce il trasferimento di massa e mantiene costante la composizione delle gocce nel tempo. La distribuzione dimensionale stretta delle gocce in sospensione è resa possibile dall'ultrasonificazione che fornisce, tramite elevate forze di taglio, l'energia necessaria per creare gocce dimensionalmente omogenee grazie a continui processi di fusione e fissione che riducono progressivamente la polidispersione [Landfester, 2001].

Ogni goccia può essere considerata un nanoreattore indipendente: la nucleazione e la crescita del prodotto finale avvengono in uno spazio confinato garantendo elevato controllo delle dimensioni.

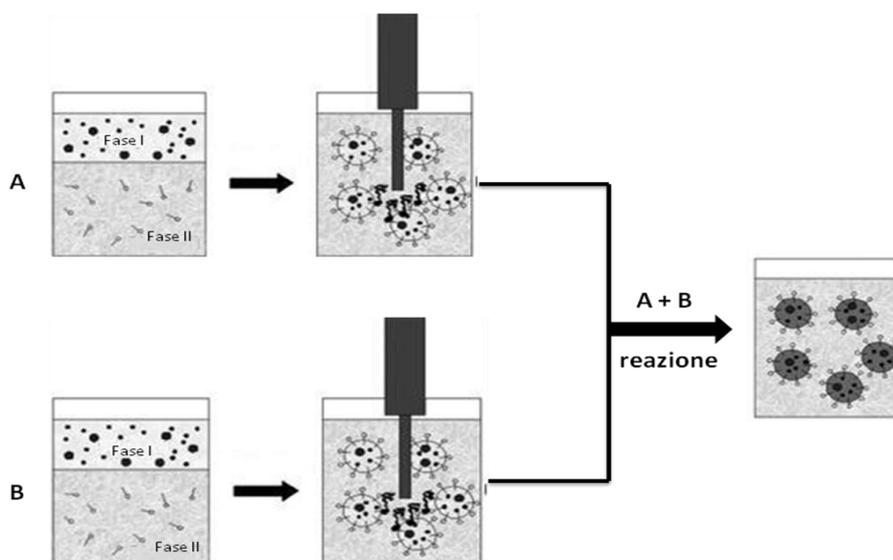
La tecnica delle miniemulsioni è stata ampiamente utilizzata per la sintesi di nanoparticelle polimeriche per via radicalica [Antonietti, 2002] e per la produzione di materiali ibridi costituiti da composti inorganici non idrosolubili incapsulati in una matrice organica polimerica [Holzapfel, 2006].

L'estensione della tecnica alle nanostrutture inorganiche, attualmente esplorata dal gruppo in cui tale tesi è stata svolta [Dolcet, 2012; Dolcet, 2013; Heutz, 2013; Hajir, 2012], si basa esclusivamente su miniemulsioni inverse e prevede sintesi via sol-gel, per decomposizione o per precipitazione. Il primo approccio è finalizzato alla produzione di nanoparticelle porose di ossidi metallici: i precursori sono in genere alcossidi metallici pre-idrolizzati e i prodotti finali, ossidi metallici, si formano per policondensazione [Rossmannith, 2008]. Il secondo approccio determina formazione di nanocompositi in seguito alla decomposizione di un singolo precursore labile [Heutz, 2013]. Infine, il terzo approccio permette la sintesi di metalli e composti binari nanostrutturati inducendone la precipitazione all'interno di ogni

goccia. In questo caso, i metalli precipitano in seguito a riduzione *in situ* di sali usando miniemulsioni inverse non acquose e costituite da solventi altobollenti [Crespy, 2009]. I composti binari, invece, precipitano: i) per diffusione di un reagente dalla fase continua alla goccia contenente l'agente precipitante (metodo in miniemulsione unica) o ii) per coalescenza di due gocce contenenti i reagenti di precipitazione (metodo in due miniemulsioni) [Muñoz-Espí, 2012; Hecht, 2012; Dolcet, 2012; Dolcet, 2013]. L'ultimo approccio descritto, usato nel presente lavoro di tesi per la sintesi dei nanosistemi, consiste nella preparazione di due emulsioni in cui le fasi disperse contengono ognuna un precursore e nel successivo mescolamento per ultrasonificazione (Schema 1).

Le forze di taglio fornite alle singole gocce inducono continui processi di fissione e fusione delle gocce contenenti il precursore metallico e l'agente precipitante, con conseguente reazione in spazio confinato a dare il prodotto finale di dimensioni nanometriche.

Le caratteristiche dei prodotti di precipitazione finali dipendono da una serie di fattori tra i quali la concentrazione dei reagenti nella micella, il rapporto acqua/tensioattivo, la natura della fase continua, la potenza degli ultrasuoni e il tempo di sonicazione [Landfester, 2006]. Ulteriore obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di verificare le variazioni di composizione, struttura e morfologia dei prodotti in funzione della natura chimica dei precursori, dei rapporti molari tra essi e delle condizioni di sonicazione.



Schema 1 Rappresentazione del metodo di preparazione di nanostrutture via miniemulsione.

La tesi si articola in 8 capitoli. Nel primo capitolo viene descritto il metodo delle miniemulsioni, soffermandosi principalmente sulle applicazioni in chimica inorganica; nel secondo capitolo si illustrano le proprietà chimico-fisiche e strutturali, le metodologie di sintesi e le applicazioni del solfuro di rame(II) e del solfuro di manganese(II) nanostrutturati, oggetto di questo lavoro di tesi. Il terzo capitolo è dedicato al *bioimaging* approfondendo, in particolare, vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di sistemi organici o inorganici luminescenti in questo campo. In particolare, si analizzano in dettaglio le applicazioni biomediche di nanosistemi di natura inorganica resi luminescenti mediante drogaggio con ioni di lantanidi. Il quarto capitolo ha come argomento la funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle: dopo una breve introduzione riguardante lo stato dell'arte, vengono presentate le metodologie di funzionalizzazione. Nel quinto capitolo si riportano e discutono i risultati ottenuti dalla caratterizzazione dei prodotti sintetizzati, mentre nel sesto capitolo

vengono descritte le tecniche analitiche utilizzate in questo lavoro per ottenere informazioni sulle caratteristiche chimico-fisiche, strutturali e funzionali delle nanostrutture finali. Nel settimo capitolo si presentano i dettagli sperimentali riguardanti le procedure e le condizioni delle sintesi e della funzionalizzazione dei nanosistemi. Infine l'ottavo capitolo ha lo scopo di trarre le conclusioni del lavoro svolto e di illustrarne i potenziali sviluppi futuri.

Capitolo 1

Miniemulsioni

La tecnica della miniemulsione rientra tra i metodi di sintesi basati sulla chimica dello stato colloidale e trova ampia applicazione nella preparazione di nanoparticelle polimeriche, inorganiche e ibride aventi una dimensione variabile compresa tra i 30 e i 300 nm [Landfester, 2000; Antonietti, 2002; Caruso, 2003; Rossmannith, 2008].

1.1 Definizione e classificazione

Il termine “miniemulsione” compare per la prima volta nella letteratura scientifica nel 1980 e si riferisce ad un sistema colloidale di goccioline molto piccole (30-300 nm) disperse in una fase continua, immiscibile con esse, ottenuto tramite applicazione di intense forze di taglio [Chou, 1980]. Si tratta, in particolare, di un sistema tricomponente costituito, oltre che da fase continua e fase dispersa, da un tensioattivo che conferisce stabilità all'emulsione. In base alla natura della fase continua, tutte le emulsioni si possono classificare in i) dirette o ii) inverse. Alla prima categoria appartengono i sistemi costituiti da una fase continua polare (in genere acquosa) e da una fase dispersa apolare e, per tale motivo, vengono anche definite emulsioni olio in acqua (*o/w*), mentre le seconde sono dette emulsioni acqua in olio (*w/o*), in quanto la fase continua è un solvente apolare e la fase dispersa è costituita da una solvente polare (Figura 1.1).

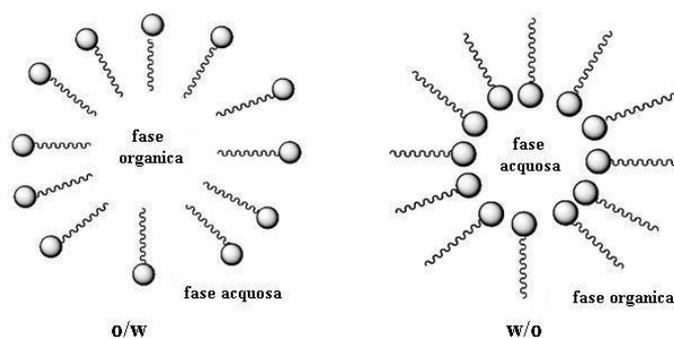


Figura 1.1 Rappresentazione di emulsione diretta (*o/w*) e inversa (*w/o*).

La principale differenza rispetto alle microemulsioni, ampiamente studiate per la sintesi di nanostrutture [Capek, 2004; Lee, 2005; Pal, 2007], riguarda la stabilità. Una microemulsione è definita, in generale, come una dispersione termodinamicamente stabile di due fluidi immiscibili in presenza di tensioattivi stabilizzanti. Si dice inversa quando la fase dispersa è acquosa e la sintesi di nanoparticelle inorganiche via microemulsione si basa tipicamente sulla preparazione di due microemulsioni, contenenti ciascuna un reagente, e nel loro successivo mescolamento. Poiché le microemulsioni sono sistemi dinamici, in esse i moti Browniani determinano collisione frequente e coalescenza delle gocce a formare dimeri in cui i due diversi contenuti entrano in contatto e reagiscono [Eastoe, 2006]. Il confinamento della reazione di nucleazione e crescita all'interno delle gocce permette elevato controllo dimensionale dei prodotti. La forma delle strutture finali, invece, dipende dal tipo di template e dalla natura degli ioni o delle molecole aggiunte al template. Queste specie vengono, infatti, adsorbite sulla superficie dei prodotti di reazione e inducono crescita

preferenziale in specifiche direzioni, promuovendo lo sviluppo di determinate forme sulle altre possibili [Pileni, 2003].

Una miniemulsione, invece, non è termodinamicamente stabile ma “criticamente” stabilizzata nei confronti della degradazione indotta dalla diffusione (*Ostwald ripening*) e della coalescenza causata dalla collisione e conseguente fusione delle due gocce [Landfester, 2003]. Il primo fenomeno risulta inibito mediante l’introduzione di un quarto componente, immiscibile con la fase continua e capace di generare, all’interno delle gocce disperse, una pressione osmotica tale da controbilanciare la pressione di Laplace che agisce sulle stesse. A seconda che la miniemulsione sia diretta o inversa si utilizzerà quindi rispettivamente un componente ultraidrofobo o un ultralipofobo [Landfester, 2010]. Il secondo fenomeno, invece, può essere controbilanciato scegliendo un opportuno tensioattivo al fine di stabilizzare le gocce dal punto di vista elettrostatico e/o sterico. Quest’ultimo, inoltre, viene aggiunto in quantità non elevate determinando un rivestimento superficiale delle gocce incompleto e influenzando criticamente la stabilità colloidale del sistema [Antonietti, 2002].

La sintesi di nanostrutture via microemulsione o miniemulsione può, come in questo caso, basarsi sulla formazione di gocce (*droplets*), contenenti ciascuna un reagente e nella loro successiva coalescenza al fine di permettere il verificarsi della reazione che determina ottenimento del prodotto. Le dimensioni e la polidispersione delle strutture ottenute dipendono dalla natura del solvente utilizzato, dal tipo di tensioattivi e cotensioattivi introdotti, dall’eventuale aggiunta di elettroliti e dalla concentrazione dei reagenti [Eastoe, 2006]. In particolare, solventi diversi influenzano la velocità di crescita delle particelle in quanto molecole di solvente di dimensioni ridotte si intercalano tra le code del tensioattivo, aumentando la rigidità di queste ultime e riducendo la velocità di crescita delle particelle. La variazione della dimensione finale, invece, deriva da interazioni forti tra solvente e tensioattivo che garantiscono stabilità alle particelle grandi, mentre la ridotta polidispersione si osserva per aumento della velocità di scambio intermicellare con conseguente prevalenza della crescita sulla nucleazione. Quest’ultimo fenomeno si verifica anche introducendo un cotensioattivo o aumentando la concentrazione dei reagenti [Uskokovic, 2005]. Infine, l’aggiunta di un elettrolita si traduce nella degradazione o nella modifica delle dimensioni iniziali delle particelle, senza influire su quelle finali [Kitchens, 2005].

1.2 Tensioattivi

I tensioattivi sono molecole anfifiliche, in quanto costituite da una porzione idrofilica e una idrofobica che conferiscono ad essi affinità simultanea per composti polari e apolari [Goodwin, 2004]. Non tutte le molecole anfifiliche, però, possono essere usate come tensioattivi perché questi ultimi devono possedere anche proprietà tali da determinare attività superficiale e/o interfacciale. In particolare, la migrazione verso una superficie o un’interfaccia è tipica soltanto di molecole in cui le componenti idrofiliche e lipofiliche sono tra di loro equilibrate. Molecole in cui prevale una delle due tendono, infatti, a disporsi in una fase senza interagire con l’altra; mentre molecole in cui le due unità coesistono in modo equilibrato diminuiscono la tensione interfacciale, riducendo l’energia necessaria alla formazione di nuove superfici.

Le molecole anfifiliche, introdotte in un sistema eterofasico di tipo olio in acqua, si dispongono perfettamente orientate all’interfaccia in modo da minimizzare il contatto tra porzione idrofobica e fase acquosa. All’aumentare della quantità di tensioattivo aggiunto, però, si raggiunge saturazione con conseguente formazione di aggregati (micelle) di

tensioattivo inglobanti la fase dispersa (Figura 1.2); questo fenomeno si osserva qualora si superi la cosiddetta “concentrazione micellare critica” (CMC) del tensioattivo, dipendente dalle proprietà di quest’ultimo e da una serie di altri fattori quali temperatura, pressione e presenza di additivi (Tabella 1.1).

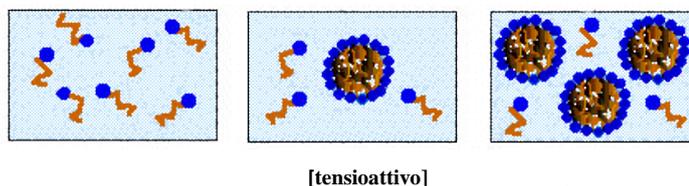


Figura 1.2 Rappresentazione della formazione di micelle.

Caratteristica del sistema	Effetto sulla CMC
lunghezza catena idrofobica	riduzione
ramificazione catena idrofobica	aumento
insaturazione catena idrofobica	aumento
numero gruppi idrofilici	aumento
presenza additivi	riduzione
temperatura	riduzione

Tabella 1.1 Influenza sulla concentrazione micellare critica (CMC) delle proprietà del sistema [modificata da Nagarajan, 1977].

Il raggiungimento della CMC induce ulteriori modifiche al sistema, alterandone la tensione superficiale all’interfaccia tra le due fasi, la conducibilità e la turbidità (Figura 1.3).

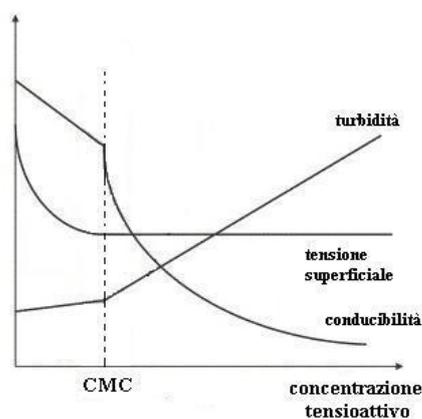


Figura 1.3 Variazione delle proprietà del sistema in funzione della concentrazione del tensioattivo [modificata da Tabazadeh, 2005].

La forma delle micelle può essere sferica, cilindrica, lamellare o vescicolare (Figura 1.4) e la prevalenza di una o dell’altra dipende da temperatura, concentrazione, natura del tensioattivo ed elettroliti presenti nel sistema. Indipendentemente dalla forma micellare, in emulsione diretta le teste polari si dispongono verso la fase continua e la porzione idrofobica si orienta verso l’interno della micella, mentre in quella inversa la disposizione è opposta.

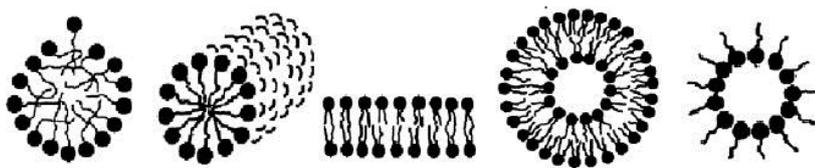


Figura 1.4 Rappresentazione delle possibili forme micellari.

I tensioattivi si possono classificare in base alla loro carica in ionici e non ionici. Alla prima classe appartengono tensioattivi cationici, anionici e zwitterionici, mentre alla seconda quelli neutri (Tabella 1.2). In soluzione acquosa, i tensioattivi ionici dissociano in ioni. In particolare, quelli anionici producono un anione anfifilico, controbilanciato da un catione di un metallo alcalino (Na^+ , K^+) o da uno ione ammonio quaternario, mentre quelli cationici dissociano in un catione anfifilico e in anione, spesso alogenuro. I tensioattivi zwitterionici, invece possono comportarsi in entrambi i modi appena descritti, dissociando cationi o anioni anfifilici. Infine, i tensioattivi non ionici non dissociano in acqua perché costituiti da gruppo idrofilico non dissociabile, in genere polietereo e da porzione idrofobica paraffinica [Schramm, 2003].

Classe	Nome	Struttura
Cationici	CetilTrimetilAmmonio Bromuro (CTAB)	
Anionici	Sodio Dodecil Solfato (SDS)	
Zwitterionici	Lecitina	
Non ionici	Brij	

Tabella 1.2 Esempi di tensioattivi ionici e non ionici.

Studi di citotossicità *in vitro* e *in vivo* dimostrano che i tensioattivi sono dannosi per cellule e tessuti perché in grado di distruggere la membrana cellulare [Jelinek, 1998]. Tale fenomeno si osserva in concentrazioni prossime alla CMC per i tensioattivi anionici, zwitterionici e non ionici e in concentrazioni molto più basse per quelli cationici. Questi ultimi sono considerati tossici, in misura dipendente dalla natura dei gruppi idrofilici [Inácio, 2011]. Poiché le caratteristiche elettrostatiche sono poco influenti sulla stabilità delle micelle, è necessario acquisire informazioni sulle proprietà dei tensioattivi come agenti di superficie. La grandezza che fornisce tali dati è il valore di equilibrio idrofilico-lipofilico (*Hydrophilic-Lipophilic Balance, HLB*). Si tratta di una grandezza semi-empirica che descrive il carattere idrofilico o lipofilico di un tensioattivo, è dipendente dalla sua struttura molecolare e può assumere valori compresi tra 0 e 40 [Goodwin, 2004]. In particolare, HLB bassi sono tipici di tensioattivi lipofilici e HLB alti sono propri di tensioattivi idrofilici: i primi sono, di conseguenza, ampiamente usati per stabilizzare emulsioni inverse, mentre i secondi sono adatti per le emulsioni dirette. In tabella 1.3 sono riportati i valori HLB richiesti per ottenere

il sistema desiderato. A livello numerico, il valore di HLB è calcolabile mediante la formula di Davies:

$$HLB = 7 + mHh + nHI$$

dove m e Hh sono rispettivamente il numero dei gruppi idrofilici e il loro valore, mentre n e HI sono i corrispettivi per i gruppi lipofili della molecola. I numeri di alcuni gruppi idrofilici/lipofili costituenti i tensioattivi sono elencati in tabella 1.4. Considerando una miscela di tensioattivi, l'HLB totale è dato dalla somma dei valori di HLB dei singoli tensioattivi, ognuno ponderato per la percentuale in peso, utilizzata per preparare la miscela [Davies, 1963].

Intervallo HLB	Applicazioni
4-6	emulsionanti w/o
7-9	agenti di bagnabilità
8-18	emulsionanti o/w
13-15	detergenti
10-18	solubilizzanti

Tabella 1.3 Classificazione dei tensioattivi in base al valore HLB.

Tali valori, però, indicano soltanto le caratteristiche emulsionanti di un tensioattivo senza fornire dati sulla sua efficienza. Quest'ultima dipende dalla temperatura, soprattutto per i tensioattivi non ionici ed è possibile definire una temperatura di inversione di fase (PIT), alla quale il tensioattivo si trasforma da stabilizzante per emulsioni dirette in stabilizzante per inverse o viceversa. Sperimentalmente, la dipendenza di azione del tensioattivo dalla temperatura può essere esclusa scegliendo un tensioattivo con PIT molto diversa dalla temperatura utilizzata per ottenere l'emulsione [Schramm, 2003].

Gruppi idrofilici	Numero
-SO ₄ ⁻ Na ⁺	38.7
-COO ⁻ K ⁺	21.1
-NR ₃ ⁺	9.4
-COOR	2.8
-COOH	2.1
-O-	1.3
Gruppi lipofili	Numero
-CH- -CH ₂ - CH ₃ - =CH-	-0.475
Gruppi derivati	Numero
-(CH ₂ -CH ₂ -O)-	0.33
-(CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O)-	-0.15

Tabella 1.4 Valori numerici assegnati a vari gruppi funzionali da Davies per il calcolo del valore di HLB.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati due tensioattivi non ionici in rapporto 3:1 in peso: il Brij-52 e l'Igepal-CO630, le cui strutture molecolari sono rappresentate in figura 1.5.

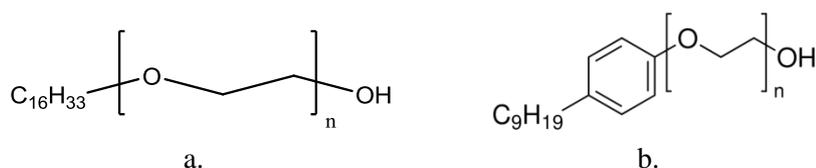


Figura 1.5 Struttura molecolare di Brij-52 (a.) e di Igepal-CO630 (b.).

Il Brij-52, polietilenglicole esadeciletere, ha peso molecolare medio di 617 Da ed è costituito da una porzione idrofilica di tipo poliglicolico e da una catena di sedici atomi di carbonio che forma il gruppo idrofobico. Il valore di HLB tabulato per questo tensioattivo è pari a 5. Anche l'Igepal-CO630 è un polietilenglicole che lega, via legame etereo, la porzione idrofobica della molecola. Quest'ultima è, però, costituita da un anello aromatico sostituito in para al legame etereo con una catena alchilica a nove atomi di carbonio. Il peso molecolare medio di questo tensioattivo è 330 Da e il relativo valore di HLB è 13. Calcolando il valore di HLB della miscela si ottiene che esso è pari a 7, in linea con quanto previsto per stabilizzare una miniemulsione inversa, necessaria per sintetizzare nanostrutture di natura inorganica. Poiché il meccanismo di stabilizzazione predominante nelle miniemulsioni inverse è di tipo sterico, la scelta di tali tensioattivi risulta anche funzionale ad impedire coalescenza delle gocce per repulsione dovuta all'ingombro superficiale.

1.3 Modalità di preparazione

Le emulsioni, convenzionalmente intese, si ottengono mescolando meccanicamente le fasi fluide contenenti i tensioattivi e l'omogeneità del sistema finale è dovuta a deformazione e distruzione delle gocce, con aumento dell'area superficiale specifica, e alla successiva stabilizzazione delle nuove interfacce da parte del tensioattivo. Tuttavia, l'energia trasferita mediante mezzi meccanici non è sufficiente a garantire la formazione di gocce di dimensioni ridotte (30-300 nm) e, per ottenere una miniemulsione, diventa necessario fornire al sistema energia molto più elevata rispetto alla differenza di energia superficiale $\gamma\Delta A$ (con γ pari alla tensione superficiale e ΔA corrispondente all'estensione della nuova interfaccia formata), in quanto gran parte dell'energia viene assorbita dalla resistenza viscosa del mezzo. Attualmente esistono due metodi di preparazione per le miniemulsioni, in cui la deformazione e la distruzione delle gocce è provocata rispettivamente da applicazione di ultrasuoni o omogeneizzazione ad alta pressione. Nel primo caso, l'ultrasonificazione garantisce energia elevata per la formazione di nuove superfici e genera flusso delle gocce sufficientemente turbolento da permettere alle molecole di tensioattivo di adsorbirsi sulle nuove interfacce. Il secondo approccio è invece utilizzato in ambito industriale per produzioni su larga scala e genera flusso turbolento analogo a quello prodotto dall'ultrasonificazione, ma la deformazione e la distruzione delle gocce è indotta da stress fluido-meccanici molto intensi derivanti dall'improvvisa caduta di pressione a cui è sottoposta l'emulsione [Tesch, 2003].

In entrambi i casi, il meccanismo di formazione e distruzione delle gocce è la cavitazione [Lauterborn, 1997] e, nella fase iniziale, si ottengono sistemi altamente polidispersi. Successivi processi di fusione e fissione continui, indotti dalle elevate forze di taglio fornite al sistema, determinano tuttavia riduzione della polidispersione fino al raggiungimento di uno stato pseudo-stazionario, caratterizzato da indipendenza delle dimensioni delle gocce dalla quantità di energia meccanica applicata (Figura 1.6 a.) [Landfester, 1999]. Si tratta di

uno stato di equilibrio in cui il sistema acquista omogeneità e il processo di omogeneizzazione può essere monitorato mediante misura di grandezze quali la turbidità e la tensione superficiale delle miniemulsioni in funzione del tempo di sonicazione (Figura 1.6 b.). Valori costanti delle grandezze considerate si ottengono in corrispondenza dello stato stazionario e, dai dati sperimentali [Landfester, 2001], si osserva che esso prevede tensioni superficiali molto elevate.

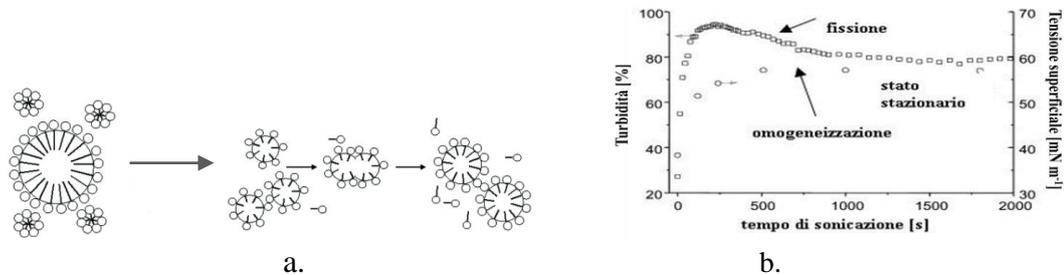


Figura 1.6 Rappresentazione del processo di omogeneizzazione di una miniemulsione (a.) e suo monitoraggio (b.).

Tali evidenze trovano spiegazione nella dipendenza della dimensione delle gocce dal tempo di sonicazione: all'aumentare di quest'ultimo, infatti, le gocce disperse risultano più piccole e l'interfaccia complessiva olio/acqua (o acqua/olio) aumenta, ma la quantità di tensioattivo presente nel sistema rimane invariata e, dovendo distribuirsi su un'area più grande, determina tensione interfacciale più elevata. La diretta conseguenza di quanto appena descritto consiste nell'incompleto rivestimento delle gocce da parte del tensioattivo e nella formazione di micelle che assumono le minime dimensioni possibili, nelle condizioni sperimentali, utilizzando il tensioattivo nel modo più efficiente. La dimensione della goccia può essere modificata cambiando tipo e quantità di tensioattivo, in quanto più le gocce sono piccole e più tensioattivo è richiesto per renderle stabili e l'utilizzo di tensioattivi ionici o non ionici permette formazione di gocce monodisperse di dimensioni comprese rispettivamente tra 30-200 nm e 100-300 nm [Landfester, 2001].

1.4 Stabilità delle miniemulsioni

La semplice agitazione meccanica di un fluido eterogeneo contenente un tensioattivo produce un'emulsione in cui la distribuzione dimensionale delle gocce risulta piuttosto ampia, in quanto il tensioattivo ha la funzione di ostacolare la collisione tra le gocce e la loro conseguente coalescenza, ma non inibisce la diffusione della fase dispersa attraverso la fase continua. Quest'ultimo processo è indotto dalla diversa pressione di Laplace (1), interna alle gocce e inversamente proporzionale alla loro dimensione, che determina il verificarsi del fenomeno di *Ostwald ripening*, secondo cui le goccioline più piccole scompaiono fondendosi con quelle più grandi, con conseguente aumento delle dimensioni medie delle gocce disperse (Figura 1.7).

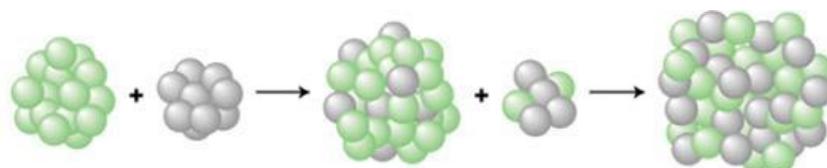


Figura 1.7 Rappresentazione del fenomeno di *Ostwald ripening*.

La velocità di questo fenomeno è influenzata dalla dimensione, dalla polidispersione e dalla solubilità della fase dispersa e l'emulsione diventa stabile quando la pressione osmotica delle specie incapsulate nelle gocce e la pressione di Laplace risultano bilanciate. Tale equilibrio può essere indotto introducendo nel sistema un ulteriore componente, osmoticamente attivo perché solubile esclusivamente nella fase dispersa. Al diminuire dell'affinità di questo componente per la fase continua esso tende infatti a rimanere intrappolato in una goccia, senza diffondere da una all'altra, incrementando la pressione osmotica interna al fine di renderla confrontabile con quella di Laplace. Queste due grandezze sono definite dalle seguenti equazioni:

$$p_{Laplace} = \frac{2\gamma_{ll}}{r} \quad (1)$$

$$\pi_{osm} = \frac{3nRT}{4\pi r^3} \quad (2)$$

dove γ_{ll} è la tensione interfacciale, r è la dimensione della goccia, n è il numero di moli di soluto interno alla goccia, R è la costante universale dei gas e T è la temperatura del sistema. Poiché (1) dipende da r^{-1} e (2) da r^{-3} , anche variazioni minime delle dimensioni modificano il bilancio tra le due grandezze. In miniemulsione, l'equilibrio tra la pressione di Laplace e la pressione osmotica non si raggiunge nemmeno quando il sistema si trova in stato stazionario, in quanto tale condizione implicherebbe diminuzione delle dimensioni delle gocce di due ordini di grandezza al raddoppiare della quantità del componente aggiuntivo introdotto in fase dispersa, non osservabile sperimentalmente. L'inibizione dell'*Ostwald ripening* si verifica, quindi, perché la pressione risulta uguale in ogni goccia. In realtà, tali conclusioni possono essere tratte per miniemulsioni dirette, ma non possono essere estese a quelle inverse. Anche in miniemulsione inversa, l'*Ostwald ripening* viene ostacolato introducendo nel sistema un componente altamente insolubile in fase continua (in questo caso ultralipofobo), ma la dimensione delle gocce in stato stazionario dipende dalla quantità di agente osmotico. La pressione di Laplace risulta, quindi, perfettamente bilanciata dalla pressione osmotica immediatamente dopo l'ultrasonificazione, determinando elevata stabilità delle miniemulsioni inverse che, contrariamente a quelle dirette, non risultano "criticamente" stabilizzate.

In miniemulsione, coalescenza e *Ostwald ripening* sono i fenomeni di destabilizzazione più diffusi: il primo è bimolecolare in quanto necessita di collisione tra due gocce, mentre il secondo è monomolecolare e, in genere, non si osserva nelle macroemulsioni poiché gocce grandi hanno pressione di Laplace ridotta. Entrambi determinano crescita irreversibile della dimensione delle gocce. In macroemulsione, la stabilità risulta invece compromessa anche da processi reversibili di flocculazione che evolvono in sedimentazione (per emulsioni w/o) e *creaming* (per emulsioni o/w), indotti dalla gravità [Damodaran, 2005]. Tali fenomeni non sono osservabili in miniemulsione per motivi cinetici, in quanto i moti Browniani prevalgono e la gravità non influenza la stabilità.

1.5 Miniemulsioni come nanoreattori in chimica inorganica

Le gocce di una miniemulsione possono essere considerate dei veri e propri reattori di dimensioni nanometriche, separati l'uno dall'altro dalla fase continua. In ognuna di esse è possibile far avvenire la reazione desiderata in modo parallelo e in spazio confinato,

garantendo elevato controllo sulle dimensioni e sulla polidispersione del prodotto finale [Landfester, 2001].

Il concetto di nanoreattore è alla base dell'utilizzo delle miniemulsioni per la sintesi di materiali nanostrutturati e, in ambito inorganico si ricorre alle miniemulsioni inverse ottenendo precipitazione del prodotto desiderato in fase acquosa, nello spazio confinato di una goccia. Le particelle sintetizzate possiedono dimensioni pari al massimo a quelle delle gocce disperse e composizione dettata dalla quantità di reagente contenuta in ogni goccia; la presenza dei tensioattivi limita i fenomeni di aggregazione incontrollata, ma la possibilità di reazioni simultanee all'interno della stessa goccia può determinare formazione di strutture miste e ibride [Muñoz-Espí, 2012]. Le modalità di sintesi per precipitazione in miniemulsione sono due: metodo in miniemulsione unica e metodo in due miniemulsioni. La prima possibilità consiste nella diffusione di un reagente dalla fase continua alla goccia contenente l'altra specie coinvolta nella reazione ed è stata utilizzata, ad esempio, per la sintesi di nanoparticelle di ossido di ferro, Fe_2O_3 [Willert, 2001]. In particolare, dopo la preparazione di una miniemulsione w/o di FeCl_3 in cicloesano, l'ossido viene ottenuto come prodotto, in seguito ad aggiunta esterna di una base (piridina o metossietilammina) e successiva ultrasonificazione. Il secondo approccio prevede invece la preparazione di due miniemulsioni aventi identica fase continua e medesimo tensioattivo, ma fase dispersa contenente in ogni miniemulsione un reagente diverso [Hecht, 2012; Dolcet, 2012; Dolcet, 2013]. Il mescolamento delle due miniemulsioni, per ultrasonificazione, determina fusione delle gocce e reazione tra le diverse specie in esse contenute (Figura 1.8).

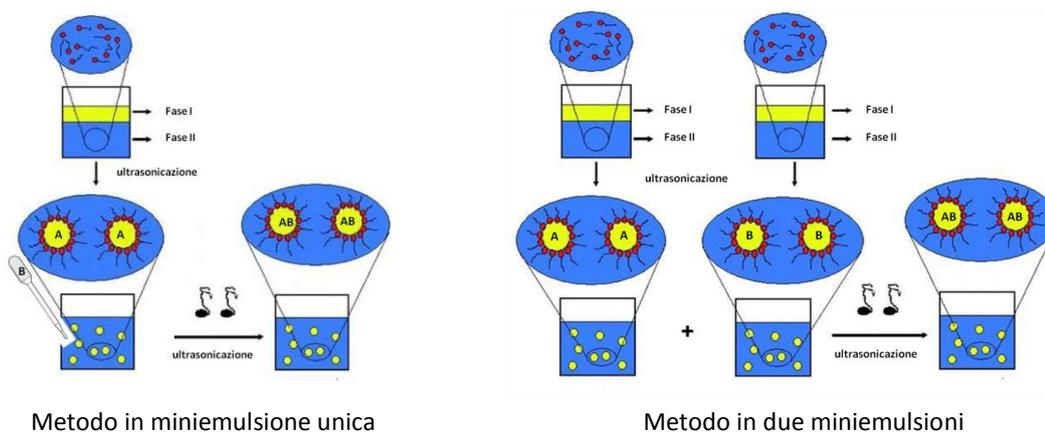


Figura 1.8 Rappresentazione delle due strategie di sintesi di nanostrutture via miniemulsione.

I precursori scelti per la sintesi di nanostrutture inorganiche sono caratterizzati da forza ionica, forze di coesione e tensioni superficiali molto elevate che rendono necessari tensioattivi stericamente ingombranti per conferire stabilità al sistema [Förster, 1998]. In letteratura sono riportati alcuni esempi di materiali inorganici sintetizzati via miniemulsione e, in base alla tipologia dei prodotti finali, la natura dei precursori varia. In particolare, nanoparticelle metalliche si ottengono a partire da sali o metalli bassofondenti fusi e miniemulsificati in solventi apolari, mentre composti binari derivano da soluzioni di sali [Taden, 2004; Willert, 2001; Saiwan, 2004; Dolcet, 2012; Dolcet, 2013]. Sempre in ambito inorganico, con la tecnica della miniemulsione inversa il nostro gruppo ha sintetizzato nanocompositi, quali Au/TiO_2 [Heutz, 2013], a partire da un singolo precursore fotolabile $(\text{AuCl}_4(\text{NH}_4)_7[\text{Ti}_2(\text{O}_2)_2(\text{Hcit})(\text{cit})]_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$. Il prodotto si ottiene per decomposizione di quest'ultimo, indotta da radiazione UV.

In tutti i casi citati, i prodotti di reazione ottenuti, poiché generati in spazio confinato, possiedono caratteristiche diverse da quelle dei medesimi prodotti massivi. Una caratteristica fondamentale è che nelle miniemulsioni la nucleazione è omogenea e la crescita risulta altamente orientata perché limitata dalle dimensioni della goccia [Montenegro, 2003]. Inoltre, il confinamento in gocce influenza anche la morfologia e la struttura dei cristalli e variazioni opportune dei parametri chimici del sistema permettono controllo sulle cinetiche di nucleazione e di crescita dei cristalli [Landfester, 2006].

Le miniemulsioni rappresentano, quindi, un approccio sintetico semplice, versatile e altamente riproducibile che garantisce, in molti casi, la formazione di prodotti cristallini a temperatura ambiente (Tabella 1.5), caratterizzati da elevata purezza e nanodimensionalità [Dolcet, 2012; Dolcet, 2013; Hajir, 2012; Muñoz-Espí, 2012; Heutz, 2013].

Categoria	Nanosistema	Riferimento bibliografico
Ossidi metallici	Fe_3O_4	Willert, 2001
	Fe_2O_3	Willert, 2001
	ZrO_2	Willert, 2001
	TiO_2	Munoz-Espí, 2012
	CeO_2	Munoz-Espí, 2012
	ZnO	Dolcet, 2012; Dolcet, 2013
	SiO_2	Schiller, 2009
Fosfori inorganici	$(\text{Y}_{0.94}\text{Eu}_{0.06})_2\text{O}_3$	Taden, 2004
	$\text{La}_{0.5}\text{Ce}_{0.3}\text{Tb}_{0.2}\text{PO}_4$	
	$\text{Ba}_{0.9}\text{Eu}_{0.1}\text{MgAl}_{10}\text{O}_{17}$	
Fosfati	$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$	Nabih, 2011
Solfati	BaSO_4	
Carbonati	CaCO_3	
Nanocompositi	Au/TiO_2	Heutz, 2013

Tabella 1.5 Specie inorganiche ottenute via miniemulsione.

Capitolo 2

Nanosistemi inorganici

I nanosistemi inorganici sono strutture di natura inorganica, caratterizzate da almeno una dimensione compresa nell'intervallo 1-100 nm. Rispetto ai materiali massivi che seguono le leggi della meccanica classica e alle molecole isolate che seguono le leggi della meccanica quantistica, i nanosistemi acquisiscono proprietà che differiscono da entrambi i regimi menzionati, in virtù di effetti geometrici e di confinamento quantico [Schubert, 2005].

Gli effetti geometrici derivano dall'elevato rapporto superficie/volume di queste strutture e dalla presenza superficiale di atomi sottocoordinati con energia media più elevata rispetto a quella degli atomi interni. Questa energia in eccesso determina instabilità termodinamica delle strutture, risolvibile mediante cambiamenti cristallografici quali modifiche morfologiche, contrazione o deformazione del reticolo cristallino e comparsa di difetti superficiali.

Il confinamento quantico si verifica quando le dimensioni globali delle strutture sono confrontabili con il raggio dell'eccitone di Bohr e si traduce in una discretizzazione dei livelli energetici accessibili agli elettroni e in una variazione dell'energia che separa banda di conduzione da banda di valenza (*energy gap*) dei materiali. In particolare, al diminuire delle dimensioni delle nanostrutture, nei metalli il confinamento quantico si traduce nella comparsa dell'*energy gap*, mentre nei semiconduttori determina aumento del *gap* intrinseco (Figura 2.1) [Mikrajuddin, 2000].

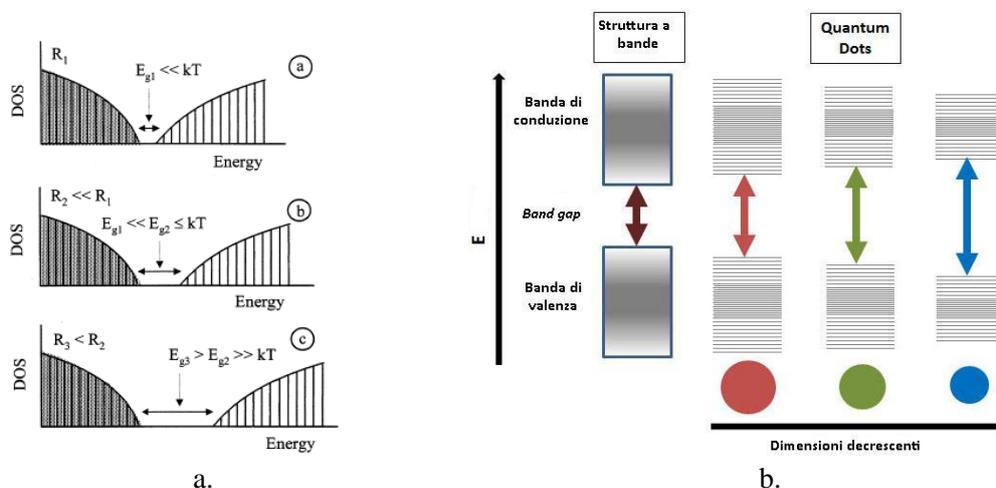


Figura 2.1 Variazione dell'*energy gap* di metalli (a.) e semiconduttori (b.) in funzione delle dimensioni delle nanostrutture.

Esistono due categorie di classificazione dei nanosistemi: la prima è basata sull'ordine gerarchico di dimensionalità e la seconda sulla metodologia di sintesi [Drexler, 1998].

Strutture zero-, mono-, bi- e tridimensionali si ottengono al variare dell'entità del confinamento quantico. Quando la dimensione del materiale è ridotta in tutte le direzioni, gli elettroni non possono muoversi liberamente e il sistema si dice zerodimensionale; all'aumentare del numero di direzioni permesse per il moto elettronico, gli oggetti ottenibili diventano rispettivamente mono-, bi- e tridimensionali. Esempi di nanostrutture di diversa dimensionalità sono rappresentati in figura 2.2.

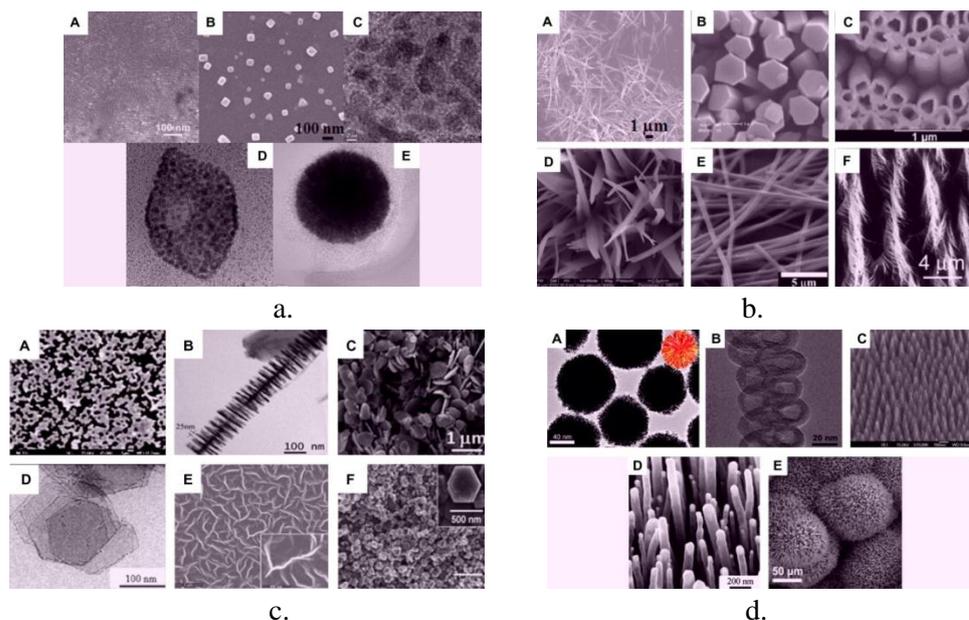


Figura 2.2 Esempi di nanostrutture 0D (a.), 1D (b.), 2D (c.) e 3D (d.) [da Tiwari, 2012].

Le principali metodologie di sintesi dei nanomateriali sono classificabili in due approcci generali, chiamati comunemente strategia *top-down* e strategia *bottom-up*.

I metodi *top-down* si basano su procedure di miniaturizzazione del materiale massivo (mediante, ad esempio, macinazione) al fine di ottenere oggetti nanodimensionali e gli svantaggi principali ad essi correlati risiedono nella formazione di difetti superficiali e nello scarso controllo dimensionale. I metodi *bottom-up*, invece, prevedono l'assemblaggio controllato ed ordinato di atomi o di molecole a produrre oggetti delle dimensioni volute, utilizzando opportune reazioni o interazioni chimiche (Figura 2.3). I materiali derivati da questo approccio sono caratterizzati da ridotte imperfezioni superficiali, composizione chimica omogenea e struttura ordinata [Psaro, 2008].

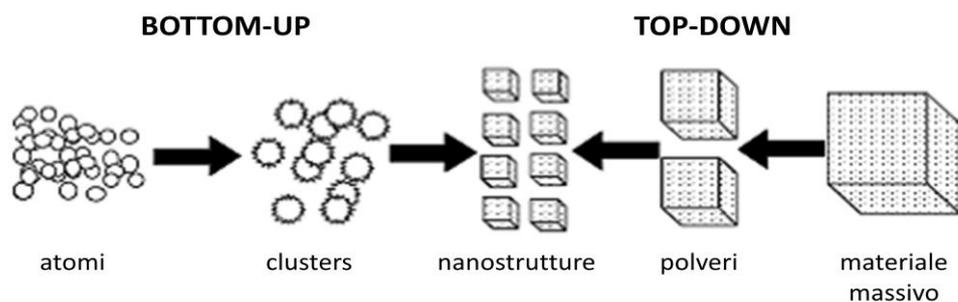


Figura 2.3 Rappresentazione schematica delle strategie *top-down* e *bottom-up*.

Strutture inorganiche nanocristalline si ottengono modulando opportunamente i fenomeni di nucleazione e di crescita che rappresentano gli stadi basilari della cristallizzazione.

La nucleazione si definisce eterogenea se avviene sulla superficie di specifici siti di nucleazione e omogenea se non è catalizzata da superfici [Cölfen, 2008]. La velocità di questi processi deriva dal bilancio tra velocità di diffusione e moti Browniani; poiché la diffusione prevale a basse temperature e i moti Browniani a temperature elevate, la nucleazione si osserva a temperature intermedie, dipendenti dal materiale considerato. Inoltre, la nucleazione eterogenea è favorita rispetto a quella omogenea perché sulla

superficie dei siti di nucleazione l'energia è ridotta e la barriera energetica per il fenomeno considerato diminuisce (Figura 2.4).

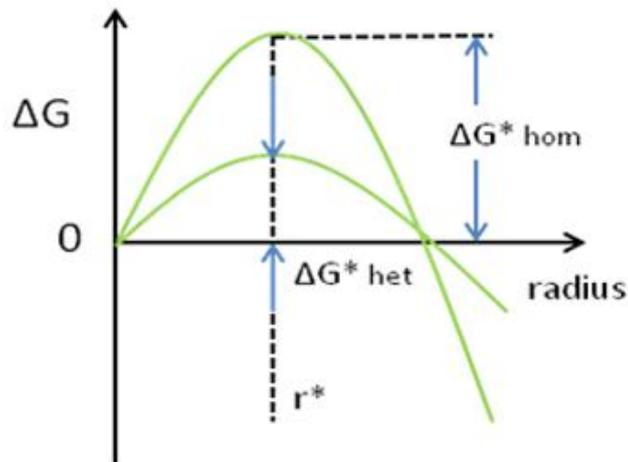


Figura 2.4 Differenza di energia di attivazione tra nucleazione omogenea e eterogenea.

La crescita consiste nell'attacco di atomi o molecole al nucleo formato nello stadio precedente e, in base alla direzione preferenziale, determina produzione di strutture aventi diversa morfologia. Poiché quest'ultima influenza le proprietà dei nanosistemi, il controllo delle dimensioni e della forma dei nanocristalli è diventato uno dei principali obiettivi della formulazione di nuove sintesi in campo nanotecnologico [Cölfen, 2005].

Nanorods, nanoplates, nanocube, nanowires, nanoparticles dello stesso materiale sono ottenibili modificando parametri sintetici quali solvente, temperatura, concentrazione dei reagenti, pH e tempi di reazione [Li, 1999].

2.1 Solfuro di rame(II) nanostrutturato

Il solfuro di rame(II) massivo, CuS, è noto per le sue proprietà di semiconduttore, catalizzatore, pigmento e indicatore per la nigrosina. Nanostrutture di questo materiale acquistano ulteriori proprietà, sfruttabili in un'ampia gamma di applicazioni.

2.1.1 Proprietà chimico-fisiche e strutturali

Il solfuro di rame(II) cristallizza in forma di covellite, solido nero-verde con struttura esagonale (gruppo spaziale $P6_3/mmc$) caratterizzata da strati di unità triangolari planari CuS_3 , circondate da arrangiamenti tetraedrici CuS_4 (Figura 2.5). Nella disposizione trigonale, il rame è in stato di ossidazione (II) e lo zolfo è in forma di anione solfuro S^{2-} , mentre nella coordinazione tetraedrica, le due specie costituenti sono Cu^+ e S_2^{2-} . In una cella unitaria sono contenute sei unità formula in cui, degli atomi di rame, quattro hanno geometria tetraedrica e due trigonale e, degli atomi di zolfo, quattro formano gruppi disolfuro e due sono anioni singoli. Gli strati della struttura sono uniti da legami zolfo-zolfo [Evans, 1976].

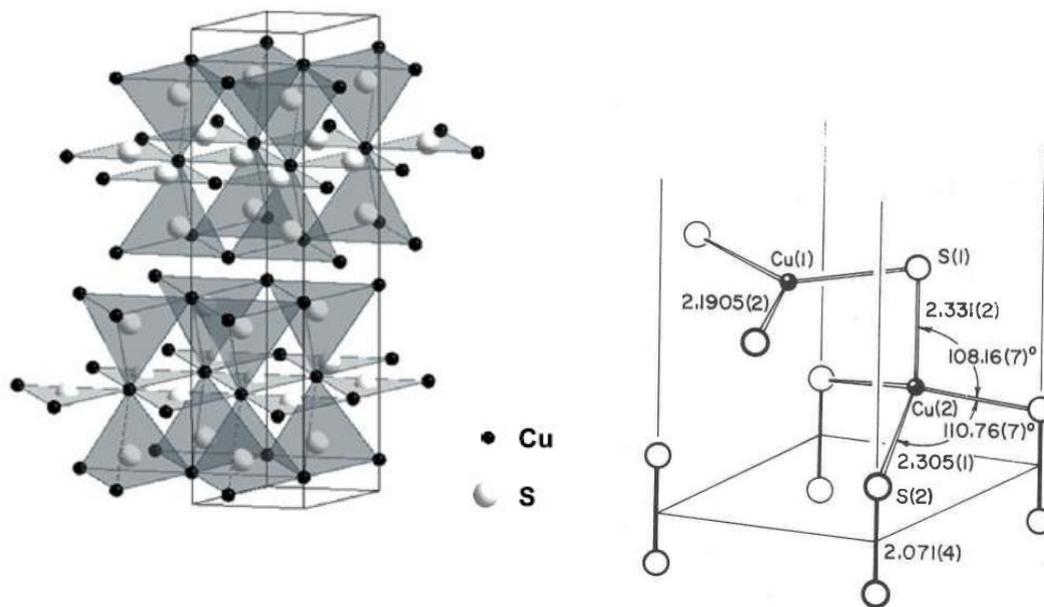


Figura 2.5 Struttura cristallografica della covellite, comprensiva di distanze e angoli di legame.

La covellite è un semiconduttore di tipo p con *energy gap* di 1.2-2.0 eV e resistività elettrica pari a $10^{-6} \Omega\text{m}$ che conferiscono al materiale carattere metallico, derivante dalla presenza di bande parzialmente vuote associate agli orbitali 3p dello zolfo costituente le unità trigonali. Le proprietà dipendono in misura consistente dalla temperatura: a 1.6 K la covellite si trasforma in un superconduttore di tipo I [Di Benedetto, 2006], a 55 K subisce una transizione di fase strutturale alla simmetria ortorombica per spostamento delle unità CuS_3 con conseguente ottimizzazione delle interazioni di van der Waals tra gli atomi di zolfo [Liang, 1993]. Infine, a temperature elevate mostra conduzione veloce degli ioni [Nair, 1989]. Questa proprietà consiste nella diffusione veloce degli ioni attraverso i difetti del reticolo cristallino e si verifica in solidi, tra cui la covellite, aventi caratteristiche specifiche quali numero elevato di ioni mobili e di siti disponibili per ognuno di essi e energia di attivazione per la mobilità degli ioni nelle tre dimensioni confrontabile con quella necessaria per creare difetti nel reticolo cristallino del solido [Worrell, 1973; Mcgeehin, 1977].

2.1.2 Metodologie di sintesi (stato dell'arte)

Nanostrutture di solfuro di rame(II) si ottengono convenzionalmente per reazione ad alta temperatura degli elementi costituenti in gas inerte o in vuoto. I prodotti di tale procedura di sintesi sono caratterizzati da distribuzione dimensionale ampia e composizione disomogenea. L'attenzione si è quindi focalizzata su metodi che permettessero il controllo delle dimensioni e della forma dei materiali da ottenere, conducendo alla formulazione di nuovi approcci sintetici. Questi ultimi differiscono dai metodi tradizionali anche per l'utilizzo di precursori molecolari del solfuro al posto di H_2S , che è altamente tossico.

In letteratura vengono riportati diversi metodi per la sintesi per via umida (*wet chemistry*) di nanostrutture di CuS e, tra i metodi che permettono di preparare nanosistemi di solfuro di rame(II) con particolare morfologia, vanno annoverate le reazioni in soluzione acquosa o in solvente organico mediante tecnica idro/solvotermale [Wan, 2004; Jiang, 2005]. La temperatura e la pressione vengono mantenute elevate per tutta la durata della reazione, utilizzando reattori chiusi (bombe). Poiché, in queste condizioni, il sistema è in uno stato di

non-equilibrio e il solvente è prossimo al suo punto critico, sono ottenibili prodotti non sintetizzabili per reazione in stato solido perché aventi basso punto di fusione o tensione di vapore alta.

Elevate temperature e riscaldamento efficiente possono essere raggiunti anche mediante utilizzo delle microonde; questa tecnica è semplice, veloce e garantisce formazione di particelle monodisperse, di piccole dimensioni e caratterizzate da elevati livelli di purezza. Il riscaldamento non avviene, come convenzionalmente, attraverso trasferimento di calore dall'esterno all'interno ma deriva dall'interazione tra i momenti di dipolo delle molecole o degli aggregati ionici con la componente oscillante del campo elettrico delle microonde. Ciò induce le molecole a ruotare per allineare il momento di dipolo con il campo elettrico, con conseguente produzione di energia termica e riscaldamento dell'ambiente di reazione. Poiché l'energia fornita dalle microonde viene trasferita alle molecole con velocità superiore a quella di rilassamento molecolare, il sistema è in stato di non-equilibrio e quindi possiede energia sufficiente a garantire superamento della barriera energetica della reazione [Hayes, 2002]. La sintesi di CuS nano- e microdimensionale mediante tale tecnica può essere condotta sia in soluzione acquosa che in solvente organico [Nafees, 2012; Thongtem, 2007] e produce strutture di morfologia diversa in funzione della natura dei precursori, della potenza e del tempo di irraggiamento.

Purezza, distribuzione dimensionale uniforme delle nanostrutture, elevato rapporto superficie/volume e stabilità termica sono le proprietà delle nanoparticelle di CuS ottenute mediante metodo sonochimico [Wang, 2002; Kristl, 2013]. L'applicazione degli ultrasuoni all'ambiente di reazione si traduce in processi di cavitazione acustica con produzione di condizioni di temperatura e pressione tali da permettere numerose reazioni chimiche. Il collasso delle bolle di cavitazione determina temperature locali di 5200 K e pressioni superiori ai 1800 kPa; da esperimenti di sonoluminescenza, inoltre, si può concludere che i tempi di vita delle bolle sono inferiori a 1 ns e, quindi, le velocità di riscaldamento e raffreddamento superano i 10^{10} K/s quando le bolle esplodono [Suslick, 1991].

Inoltre, sempre nell'ambito dei metodi di sintesi per via umida, nanoparticelle e film sottili di CuS sono stati ottenuti a partire da acido tioacetico e carbossilati di rame(II), usando come solventi acidi carbossilici al fine di controllare la nucleazione e rallentare la crescita delle strutture finali, sfruttando l'elevata viscosità del mezzo [Armelaio, 2006].

Nanostrutture monodimensionali di CuS, quali *nanowires*, sono stati ottenuti per deposizione elettrochimica [Wu, 2008], mentre *nanorods* sono sintetizzabili sfruttando la disposizione ordinata degli ioni rame(II) coordinati ai leganti organici che fungono da templanti [Lu, 2003].

Molti approcci sintetici sono infatti caratterizzati dalla presenza di opportuni templanti, che facilitano l'ottenimento dei prodotti di forma e morfologia volute. I liquidi ionici, ad esempio, sono introdotti come co-solventi per sintesi a temperatura ambiente di nanoparticelle di CuS [Xu, 2008]. In virtù della loro capacità di formare legami a idrogeno, i liquidi ionici sono considerati solventi strutturati. Poiché la strutturazione del solvente è alla base di una serie di processi di auto-organizzazione, essa agisce come *driving force* per la formazione di nanostrutture ordinate. Inoltre, le basse tensioni interfacciali di questi solventi determinano formazione di nanoparticelle molto piccole, soggette a fenomeni di *Ostwald ripening* rallentati [Antonietti, 2004].

Al fine di ottenere solfuro di rame(II) attraverso procedure in linea con quanto previsto dalla *green chemistry*, recentemente sono state formulate sintesi in soluzione acquosa e a temperatura ambiente che permettessero, analogamente alle tecniche precedentemente descritte, elevato controllo delle dimensioni e della forma dei prodotti finali. Anche in questo

caso si utilizzano specifici templanti, quali tensioattivi o leganti organici (*capping agents*) e la metodologia più utilizzata attualmente è la microemulsione inversa *w/o* (*water in oil*) [Gao, 2004; Tolia, 2012].

Per aumentarne le possibili applicazioni, le nanoparticelle di CuS sono state sintetizzate anche come sfere cave [Jiang, 2012] o utilizzate come additivi dopo incapsulamento in nanofibre polimeriche mediante *electrospinning* [Xu, 2008]. Quest'ultimo è un metodo semplice e a basso costo, basato sull'applicazione di una forza elettrostatica ad un capillare contenente una soluzione del polimero. Questo viene depositato per attrazione su un piatto di raccolta, avente carica opposta, come materiale fibroso, in quanto il solvente durante il tragitto evapora (Figura 2.6).

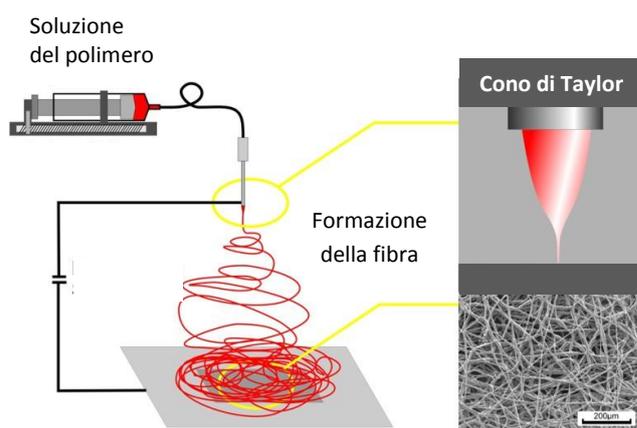


Figura 2.6 Rappresentazione della tecnica di *electrospinning*.

2.1.3 Applicazioni

Nanocristalli di solfuri metallici sono oggetto di numerosi studi, in quanto possiedono proprietà termoelettriche, semiconduttrici e ottiche tali da permettere la loro applicazione in vari settori della scienza e della tecnologia. Tra questi, il solfuro di rame(II), CuS, mostra caratteristiche interessanti ed è stato applicato ampiamente in ambito industriale (Figura 2.7) come costituente dei catodi nelle batterie ricaricabili al litio [Lai, 2010], come fosforo a banda di emissione larga nei diodi a luce emittente (LED) [Song, 2012], come fotocatalizzatore della degradazione degli inquinanti organici [Basu, 2010; Zou, 2011] e, infine, come marcatore biologico *in vivo* [Ku, 2012]. Nanoparticelle di CuS sono anche dei potenziali materiali per applicazioni come sensori IR [Tseng, 2013]. Misurare la radiazione infrarossa emessa da specifici oggetti è di particolare importanza in ambito energetico, ambientale e biomedico. I materiali più diffusi come sensori IR sono film sottili di nanotubi di carbonio mentre recenti studi hanno dimostrato che la decorazione di questi composti con nanoparticelle di altra natura determina aumento di efficienza in termini di sensibilità e resistenza all'ossidazione [Eder, 2010]. Sono stati, quindi, sintetizzati ibridi nanotubi/nanoparticelle utilizzando principalmente composti binari nanodimensionali quali CdSe, CdS e PbS [Li, 2010; Ratanatawanate, 2011]. Poiché questi materiali contengono elementi tossici e risultano più adatti per assorbimenti nell'UV e nel visibile, sono state scelte, come alternativa, le nanoparticelle di CuS, in quanto ecocompatibili, poco costose e soprattutto caratterizzate da assorbimento nel NIR a lunghezze d'onda comprese tra gli 800 e i 1400 nm [Tseng, 2012]. L'utilizzo di nanoparticelle di solfuro di rame(II) come additivi non è limitato al caso dei sensori IR. Esse vengono introdotte, dopo funzionalizzazione superficiale, in matrici polimeriche per migliorarne le proprietà tribologiche. La

funzionalizzazione ha l'unico obiettivo di evitare l'aggregazione delle nanoparticelle, in quanto essa compromette le proprietà tribologiche legate alle dimensioni nanometriche. Un esempio è dato dall'introduzione di tali nanostrutture in ibridi di politetrafluoroetilene (PTFE) e Kevlar con conseguente aumento delle capacità antiusura [Zhang, 2010].

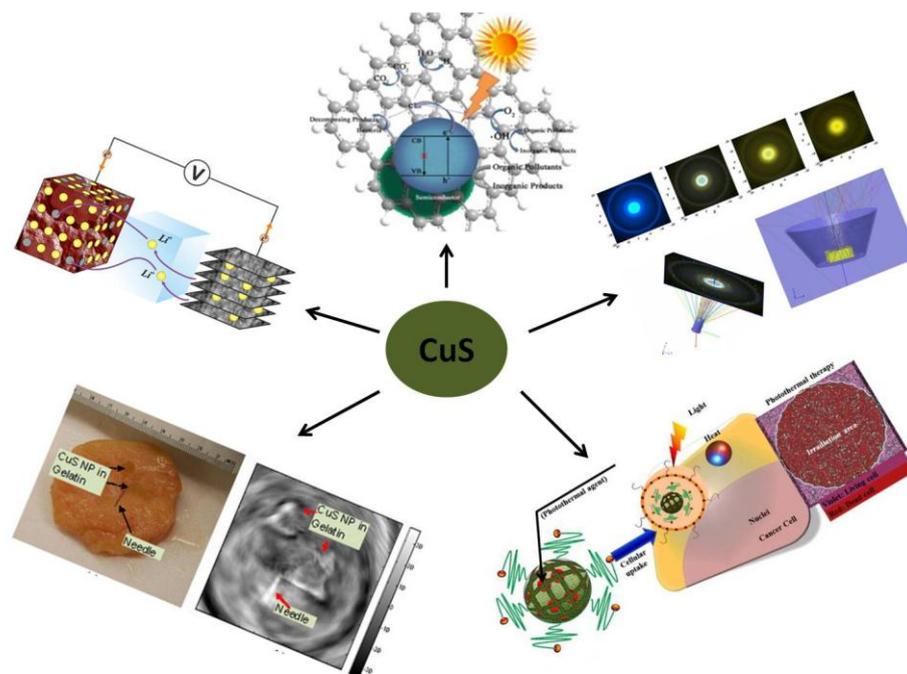


Figura 2.7 Rappresentazione delle applicazioni di CuS nanostrutturato.

Tra le applicazioni citate, la catalisi è un ambito di elevato interesse e il solfuro di rame(II) nanodimensionale viene utilizzato per catalizzare reazioni di riduzione e di ossidazione di composti organici, ma anche come elettrocatalizzatore. In particolare, sono note le capacità catalitiche di nanoparticelle aventi diametro medio non superiore ai 10 nm nella reazione di ossidazione dello ione HS^- in soluzione acquosa da parte dell'ossigeno. Questo ione rappresenta un'impurezza delle acque di scarto industriali e viene facilmente rimosso per ossidazione [Zakhalyavko, 1987]. Tale reazione avviene per processo radicalico a catena e lo stadio iniziale di formazione dei radicali $\text{HS}\cdot$ e $\text{O}_2\cdot^-$ per attacco dell'ossigeno agli ioni HS^- è lento in assenza di catalizzatore. La presenza di buche delocalizzate nella banda di valenza del CuS rende possibile l'ossidazione di substrati adsorbiti sulla superficie delle nanoparticelle di questo materiale. In questo modo, lo stadio iniziale della reazione radicalica di ossidazione degli ioni HS^- avviene sulla superficie delle nanoparticelle di CuS, per poi proseguire in soluzione acquosa con la formazione di ioni tiosolfato e solfato, come prodotti finali (Figura 2.8) [Raevskaya, 2004]. Anche la reazione di riduzione del cloruro di 1,1'-dimetil-4,4' bipiridinio (metilviologeno), MV^{2+} , a radicale catione $\text{MV}^{\cdot+}$ da parte degli ioni HS^- risulta accelerata in presenza di nanoparticelle di CuS, che fungono da catalizzatori eterogenei. Questa coppia redox è utilizzata per il trasporto di elettroni in reazioni quali la fotoreduzione dell'acqua o in sensori per H_2O_2 [Kuchmii, 2001].

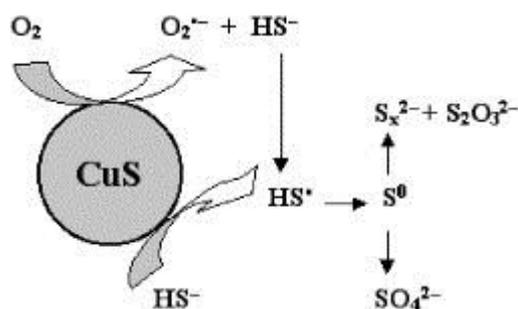
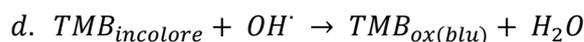
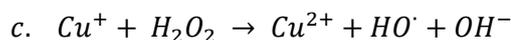
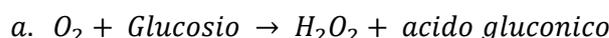


Figura 2.8 Rappresentazione dell'ossidazione degli ioni HS⁻ catalizzata da CuS.

Le proprietà catalitiche del solfuro di rame(II) nanostrutturato vengono sfruttate anche in ambito biomedico, in quanto esso mostra capacità di mimare l'enzima perossidasi HRP, comunemente utilizzato per la rivelazione del glucosio sanguigno tramite metodo colorimetrico in pazienti affetti da diabete mellito [Gill, 2008]. Tale enzima è tuttavia caratterizzato da scarsa stabilità, da elevata tendenza alla denaturazione in ambiente acido, basico e ad alta temperatura e da difficoltà di produzione su larga scala a causa dei metodi di preparazione e purificazione lunghi e costosi. Numerosi materiali inorganici nanodimensionali sono stati sintetizzati come potenziali perossidasi-mimetici [Gao, 2007; Asati, 2009] e, tra questi, CuS risulta semplice da sintetizzare, non degradabile e non soggetto a denaturazione. L'attività mimetica consiste in un'accelerazione dell'ossidazione del TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), substrato della perossidasi, in presenza di H₂O₂ a dare un prodotto di colore blu [Josephy, 1982]. La reazione viene monitorata attraverso misure spettroscopiche e il meccanismo prevede reazione di Fenton da parte dello ione Cu²⁺ (Schema 2 b-c) con produzione di radicali ossidrilici che vanno ad ossidare il substrato. Test di confronto tra l'attività delle nanoparticelle dopo rilascio indotto degli ioni Cu²⁺ e quella delle nanoparticelle integre mostrano i medesimi risultati: ciò permette di concludere che la reazione di Fenton è catalizzata da CuS in quanto tale. Poiché H₂O₂ viene prodotta dall'ossidazione del glucosio da parte dell'ossigeno in presenza dell'enzima glucosio-ossidasi, il cambio di colore del TMB risulta correlato alla quantità di glucosio presente nel sangue (Schema 2 a-d), permettendone efficace rivelazione [Dutta, 2013].



Schema 2 Reazione di ossidazione del TMB.

Infine, sempre in ambito biomedico, il solfuro di rame(II) nanodimensionale, opportunamente funzionalizzato in superficie, trova impiego anche come mezzo sia diagnostico che terapeutico e l'applicazione più rilevante del CuS per gli obiettivi di questa tesi è nel campo dell'*imaging* biomedico.

Sfruttando la minima tossicità delle nanoparticelle di CuS e il loro assorbimento, che cade nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 900 e 1100 nm, è possibile utilizzarle come agenti di contrasto nella tomografia fotoacustica per la visualizzazione (*imaging*) dei tessuti

profondi [Ku, 2012]. Nella tomografia fotoacustica (PAT) vengono misurati gli ultrasuoni prodotti dai tessuti biologici, dopo assorbimento di impulsi laser non invasivi. Poiché la presenza di cromofori nei tessuti induce attenuazione dell'intensità del segnale, la lunghezza d'onda di eccitazione del laser deve essere scelta nell'intervallo di lunghezze d'onda del vicino infrarosso, in cui i tessuti biologici hanno bassi coefficienti di assorbimento e di *scattering* [Kruger, 1994]. L'efficienza massima della tecnica, in ambito clinico, si ottiene quando l'agente di contrasto assorbe ad una lunghezza d'onda prossima a quella della sorgente laser utilizzata e, poiché tra i laser utilizzati per il vicino infrarosso, il più diffuso emette a 1064 nm, CuS rappresenta un eccellente agente di contrasto per la tomografia fotoacustica.

In virtù del loro intervallo di assorbimento, queste nanoparticelle trovano applicazione anche nella terapia fototermica dei tumori. La terapia fototermica (PTT) è una tecnica non invasiva in cui il tessuto biologico viene colpito da una radiazione elettromagnetica che si traduce in calore capace di distruggere le cellule dei tumori senza danneggiare quelle sane [Fiedler, 2001]. La sorgente di radiazione, nel caso del solfuro di rame(II) nanodimensionale, è un laser che emette nel vicino infrarosso (808 nm) e che determina riscaldamento di una soluzione acquosa di nanoparticelle, inducendo la distruzione delle cellule appartenenti al ceppo HeLa [Li, 2010].

Recenti sviluppi [Zha, 2013] in questo ambito hanno condotto alla sintesi di nanoparticelle di CuS multifunzionali, capaci di *imaging* fotoacustico, terapia fototermica e chemioterapia tumore-selettiva simultanei. Si tratta di nanostrutture funzionalizzate con gelatina legata covalentemente al farmaco da somministrare; la gelatina viene degradata dall'enzima gelatinasi, presente in quantità abbondanti nei tessuti tumorali e il rilascio del farmaco avviene in maniera specifica in questi tessuti, previo riconoscimento molecolare da parte di un enzima (Figura 2.9).

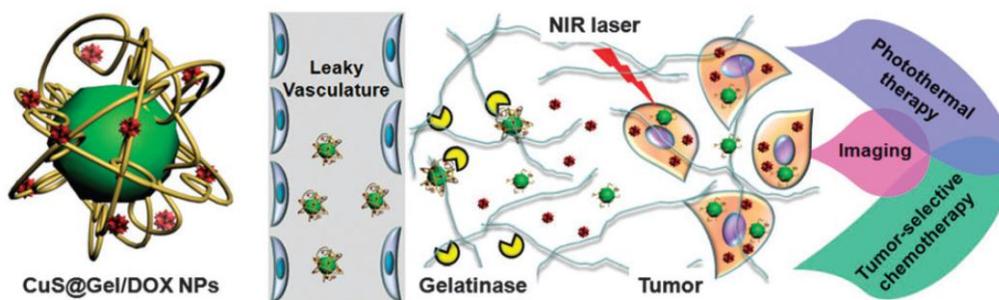


Figura 2.9 Meccanismo di azione delle nanoparticelle di CuS multifunzionali.

2.2 Solfuro di manganese(II) nanostrutturato

Il solfuro di manganese(II) è un semiconduttore magnetico che trova applicazione in celle solari e in dispositivi optoelettronici [Lokhande, 1998]. La sintesi di nanostrutture di questo materiale permette l'estensione delle applicazioni ad altri settori della scienza e della tecnologia, in virtù delle nuove proprietà acquisite nel passaggio a dimensioni nanometriche.

2.2.1 Proprietà chimico-fisiche e strutturali

Il solfuro di manganese(II) esiste in tre polimorfi, aventi proprietà ottiche, elettriche e magnetiche diverse: α -MnS, β -MnS e γ -MnS [Sombuthawee, 1978]. La prima forma (alabandite) è verde, termodinamicamente stabile e, per motivi cinetici, cristallizza solo ad alte temperature assumendo la struttura di NaCl (gruppo spaziale $Fm\bar{3}m$); le altre due forme (rispettivamente sfalerite e wurtzite) sono entrambe rosa e metastabili in quanto, ad alte temperature (> 200 °C), si trasformano nella forma α . La struttura di queste ultime è tetraedrica ma la forma β appartiene al gruppo spaziale $F43m$, mentre il gruppo spaziale della forma γ è $P6_3mc$ (Figura 2.10) [Michel, 2006]. In tutti i casi, ogni catione Mn^{2+} ha 12 primi vicini Mn^{2+} , ma cambia il numero di anioni S^{2-} dell'intorno. Nell'alabandite, Mn^{2+} è legato ai cationi primi vicini per sovrapposizione orbitale a 180° con gli orbitali p dello zolfo, mentre nelle altre due strutture il legame è tetraedrico [Pearce, 2006].

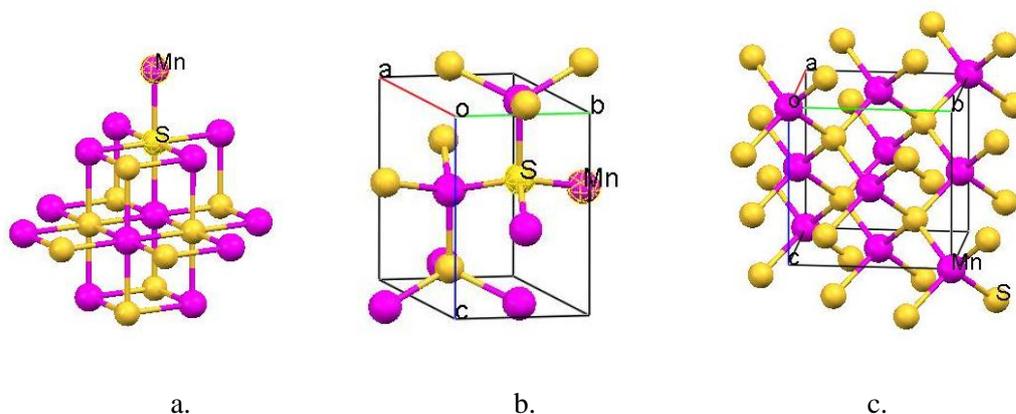


Figura 2.10 Struttura cristallografica di MnS in forma di alabandite (a.), wurtzite (b.) e sfalerite (c.).

Il solfuro di manganese(II) è un semiconduttore di tipo p e possiede *energy gap* di 3.7 eV [Goede, 1988]. Tutte e tre le forme godono di antiferromagnetismo ma questa proprietà deriva da interazioni di diversa natura: nell'alabandite l'accoppiamento antiferromagnetico si verifica per superscambio in quanto i cationi primi vicini sono separati tra loro dalla presenza dello zolfo. Nelle altre due forme, invece, l'accoppiamento elettronico è diretto [Pearce, 2006]. Alla temperatura di Néel, MnS si trasforma in un cristallo ionico con comportamento ferromagnetico.

2.2.2 Metodologie di sintesi (stato dell'arte)

Le procedure di sintesi di solfuro di manganese(II) nanodimensionale sono numerose e, in base alle condizioni di reazione, si verifica la formazione di uno dei tre polimorfi. La cinetica di precipitazione risulta, infatti, in misura rilevante influenzata dalla polarità del solvente, dalle differenze di tensione superficiale delle tre forme cristalline e dal tempo della reazione. Questi parametri influenzano anche la morfologia dei prodotti ottenuti in quanto, al variare di essi, cambia la direzione preferenziale di crescita dei cristalli [Mu, 2008].

I metodi tradizionali si basano sulla reazione dei singoli elementi ad alta temperatura [Clendenen, 1966] o sulla decomposizione di opportuni precursori organometallici [Nomura, 1989].

Film sottili di γ -MnS si sintetizzano per *chemical bath deposition (CBD)* o per *spray pyrolysis*. Il primo approccio è poco costoso, semplice e basato sulla formazione di film su substrati immersi in soluzioni contenenti ioni Mn^{2+} e S^{2-} [Fan, 2003; Dhanam, 2010]. Il secondo prevede formazione del film per contatto di una soluzione acquosa contenente i precursori dei singoli elementi con un substrato riscaldato a 220 °C [Chowdhury, 2011]. La coesistenza di specie quali MnO e $Mn(OH)_2$, riscontrabile nei film ottenuti per CBD, si evita con il secondo approccio, ma anche adottando procedure di sintesi di tipo idro/solvotermale [Zhang, 2003; Biswas, 2005]. Quest'ultimo metodo permette di sintetizzare anche nanoparticelle, *nanorods* e nanotubi di MnS e la forma dei cristalli ottenuti dipende dalle quantità relative dei precursori, dal tipo di solvente e dall'energia fornita al sistema [Biswas, 2007].

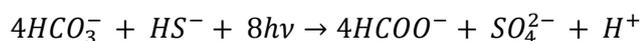
Recentemente [Yu, 2013], film sottili di γ -MnS sono stati prodotti mediante metodo idrotermale combinato con le microonde, che ha il vantaggio di aumentare la velocità di cristallizzazione per interazione della radiazione elettromagnetica ad alta frequenza con le molecole reagenti.

Infine, nanoparticelle di MnS sono ottenibili per decomposizione termica di ditiocarbammati o alchilxantati di manganese(II), individuati come precursori di entrambi gli elementi, in ammine [Jun, 2002; Pradhan, 2003] oppure per reazione ad alta temperatura (300 °C) di due precursori distinti quali dioleato di manganese(II) e zolfo in solvente organico [Puglisi, 2010].

2.2.3 Applicazioni

Le nanostrutture di solfuro di manganese(II) trovano principalmente impiego come materiali *window/buffer* o rivestimenti selettivi nelle celle solari, come materiali optoelettronici, come elettrodi nelle batterie a litio e come catalizzatori. Considerando l'utilizzo di questi sistemi come anodi nelle batterie a litio, va sottolineato come le proprietà elettrochimiche varino al variare delle condizioni in cui la sintesi viene condotta. Mediante tecnica solvotermale, al diminuire della temperatura di reazione e delle dimensioni delle nanoparticelle, aumentano infatti le capacità di interazione con lo ione Li^+ per maggiore rapporto superficie/volume [Zhang, 2008].

Le applicazioni in catalisi si limitano alla fotoriduzione del bicarbonato a formiato [Zhang, 2004]. Una sospensione acquosa colloidale di MnS viene irradiata con luce ultravioletta in presenza di HCO_3^- e HS^- e MnS catalizza la seguente reazione di riduzione:



Il meccanismo della reazione catalitica (Figura 2.11) sfrutta le proprietà semiconduttrici del solfuro di manganese(II), in quanto l'*energy-gap* è bilanciata da un voltaggio di -1.19 V che, confrontato con il potenziale di riduzione della coppia $CO_2/HCOO^-$ (pari a -0.29 V), determina fotoriduzione rapida. Gli elettroni prodotti sono quindi sufficientemente energetici da indurre la riduzione della CO_2 .

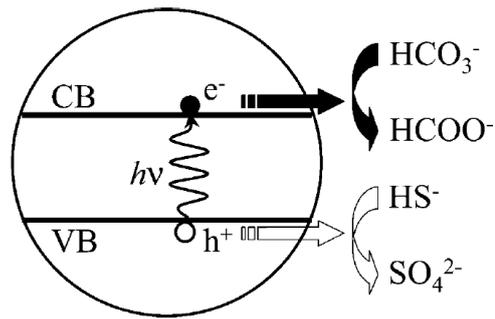


Figura 2.11 Meccanismo di fotoreduzione del bicarbonato.

Infine, le proprietà magnetiche del solfuro di manganese(II) ne permettono l'applicazione in risonanza magnetica nucleare, come agenti di contrasto per l'*imaging* del sistema reticoloendoteliale. La somministrazione intravenosa di soluzioni colloidali di MnS determina, infatti, alterazione dei tempi di rilassamento *spin-lattice* (T_1), aumentando il contrasto per la visualizzazione dei tessuti [Chilton, 1984].

Capitolo 3 Bioimaging

L'*imaging* biomedico (*bioimaging*) è una tecnica di rivelazione, caratterizzazione e misura *in vivo* dei processi biologici a livello molecolare e/o cellulare, dei tessuti, degli organi e anche dell'intero organismo [Weissleder, 2001]. I singoli approcci non sono competitivi ma complementari e differiscono per la complessità, la sensibilità e la risoluzione, il tempo di acquisizione dei dati e i costi. Le informazioni che si ricavano su tali comparti biologici si estendono alle quattro dimensioni (spaziali e temporale), permettendo di monitorare la distribuzione spazio-temporale dei singoli processi studiati. La tecnica trova ampia applicazione nella diagnosi e nella terapia delle malattie in quanto non invasiva e, nel corso dell'ultimo decennio, sono stati sviluppati vari metodi di *imaging*, caratterizzati dall'utilizzo di sorgenti di eccitazione a diversa energia. Ad esempio, la risonanza magnetica (MRI) si effettua usando la radiofrequenza, la microscopia ottica si serve della luce visibile, la tomografia computerizzata (CT) utilizza i raggi X e, infine, per la tomografia a emissione di positroni (PET) si usano i raggi gamma (Figura 3.1) [Weissleder, 2003; Conn, 2009].

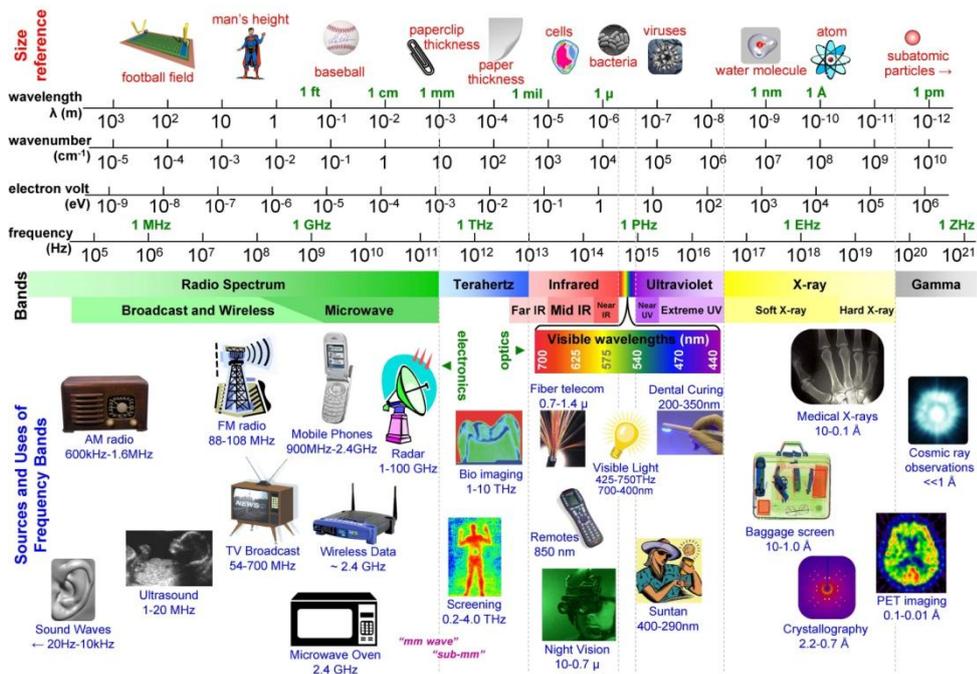


Figura 3.1 Spettro elettromagnetico

[Southeastern Universities Research Association - www.sura.org -].

3.1 *Imaging* molecolare

Con il termine *imaging* molecolare ci si riferisce a tutte le tecniche di *imaging* non invasive, quantitative e ripetibili effettuate su macromolecole bersaglio e processi biologici all'interno di organismi viventi [Herschman, 2003]. Le molecole bersaglio vengono identificate con miglior efficacia mediante *imaging* ottico o tramite utilizzo di radionuclidi. Nel primo caso, si utilizzano sonde fluorescenti che emettono nel vicino infrarosso, mentre il secondo approccio rende le molecole da studiare rilevabili a seguito dell'introduzione di radioisotopi. Questi ultimi hanno tempi di vita brevi, emettono radiazioni ionizzanti all'interno

dell'organismo e impediscono una buona risoluzione spaziale e temporale che risulta invece garantita dall'*imaging* ottico. Le due sonde descritte differiscono, oltre che per la composizione, anche per il tipo di segnale emesso: i radionuclidi emettono in modo continuo per decadimento isotopico, indipendentemente dall'interazione con le molecole bersaglio, mentre le sonde fluorescenti emettono selettivamente quando interagiscono con la molecola da studiare. Inoltre le sonde possono essere classificate come dirette o indirette, a seconda che diano informazioni sulla concentrazione delle molecole analizzate o ne riflettano l'attività [Massoud, 2003].

3.1.1 Requisiti dei fluorofori

La microscopia di fluorescenza sembra essere la tecnica più potente e versatile per l'*imaging* ottico e permette di ottenere immagini di cellule biologiche in attività legando ad esse molecole fluorescenti e misurando la distribuzione di intensità della fluorescenza. Il meccanismo della fluorescenza è descritto dai diagrammi di Jablonski (Figura 3.2) e, in ambito biomedico, il marcatore, legato alla molecola di interesse, assorbe l'energia fornita da una sorgente esterna di luce e la riemette ad energia minore.

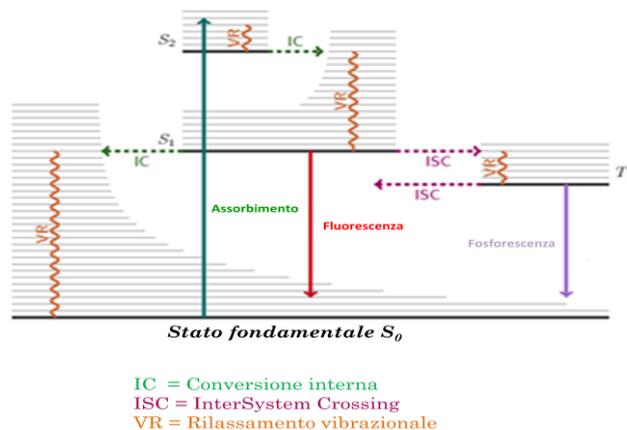


Figura 3.2 Diagramma di Jablonski.

Un buon marcatore per applicazioni *in vivo* e *in vitro* deve avere specifiche proprietà intrinseche, quali elevate efficienza quantica e sezione d'urto per i fotoni. L'efficienza quantica è determinata dal numero di fotoni emessi per fluorescenza rispetto ai fotoni assorbiti e permette di valutare l'entità dell'emissione; la sezione d'urto elevata, a sua volta, garantisce il passaggio allo stato eccitato di numerosi elettroni con conseguente emissione di fotoni in quantità tale da produrre un segnale rivelabile. Inoltre il marcatore deve essere stabile e non essere soggetto a perdita di fluorescenza in seguito a danni irreversibili indotti dall'eccitazione (*photobleaching*), non deve alterare le funzionalità dell'organismo né essere tossico. Infine, deve essere stabile chimicamente e l'emissione deve essere possibile in seguito ad eccitazione a lunghezze d'onda non troppo energetiche al fine di evitare danni ai tessuti. L'emissione deve avvenire nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 650 e 900 nm (*Near InfraRed window*) e deve essere possibile disperdere il fluoroforo in ambiente biologico. Oltre alla lunghezza d'onda di emissione, è necessario controllare l'energia della radiazione incidente, in quanto essa influenza la profondità di penetrazione. Poiché negli strati superficiali dei tessuti (da pochi μm fino a 1mm) sono presenti molti cromofori (Figura

3.3), i fotoni della regione UV-visibile vengono assorbiti da questi e non danno informazioni sugli strati più profondi; la radiazione da fornire per evitare tali assorbimenti cade nell'intervallo NIR.

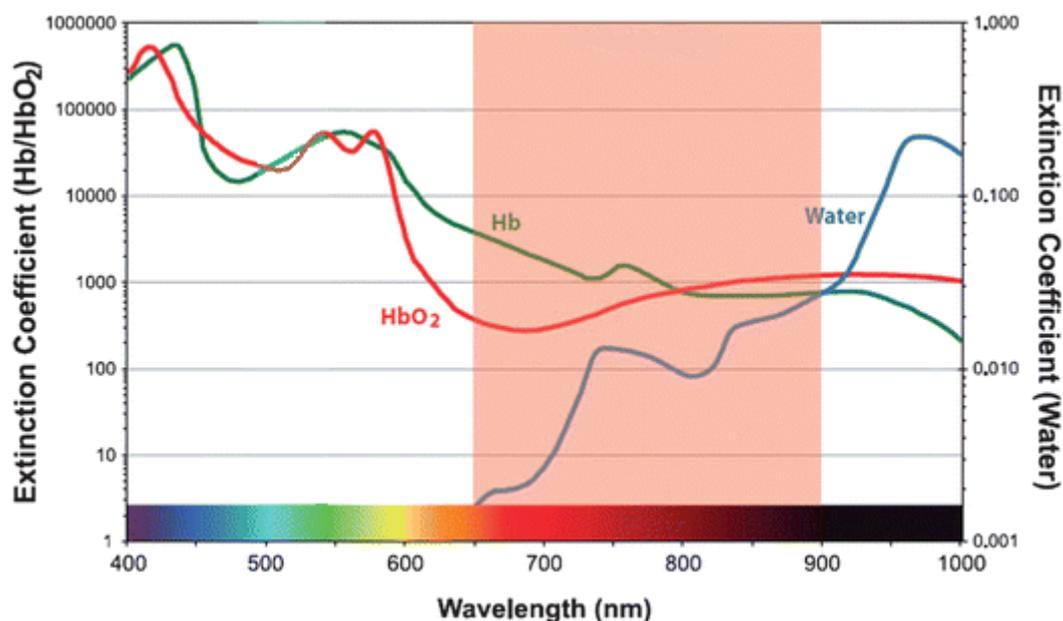


Figura 3.3 Assorbimento di emoglobina in forma ossi (HbO₂) e deossi (Hb) e acqua [modificato da Kobayashi, 2010].

Al fine di evitare l'assorbimento della radiazione da parte dei tessuti, un'altra soluzione consiste nell'utilizzo della microscopia di fluorescenza per eccitazione a tre fotoni in cui il fluoroforo viene eccitato per simultaneo assorbimento di tre fotoni. La radiazione fornita ha quindi lunghezza d'onda circa tripla rispetto a quella di assorbimento del fluoroforo considerato e permette di eccitare i tessuti utilizzando radiazioni IR meno energetiche di quelle usate comunemente, perché aventi lunghezze d'onda comprese tra i 1000 e i 1200 nm (Figura 3.4).

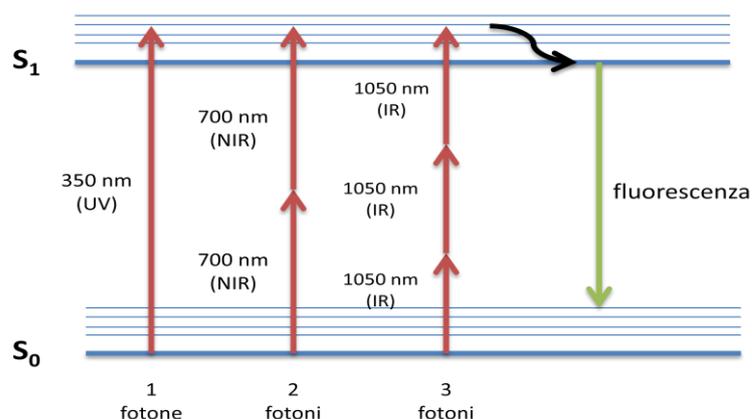


Figura 3.4 Diagramma di Jablonski della fluorescenza per eccitazione a uno, due e tre fotoni.

Poiché i livelli di eccitazione dipendono dal cubo della potenza di eccitazione, tale tecnica garantisce migliore risoluzione rispetto alla fluorescenza a singolo fotone, soprattutto in profondità (Figura 3.5). Studi recenti [Xu, 2013] dimostrano che la microscopia di fluorescenza a tre fotoni permette di visualizzare strutture poste a oltre 3.5 mm di profondità.

In questo modo diventa ad esempio possibile investigare meccanismi che avvengono oltre la materia bianca del cervello, superando i limiti della microscopia a due fotoni.

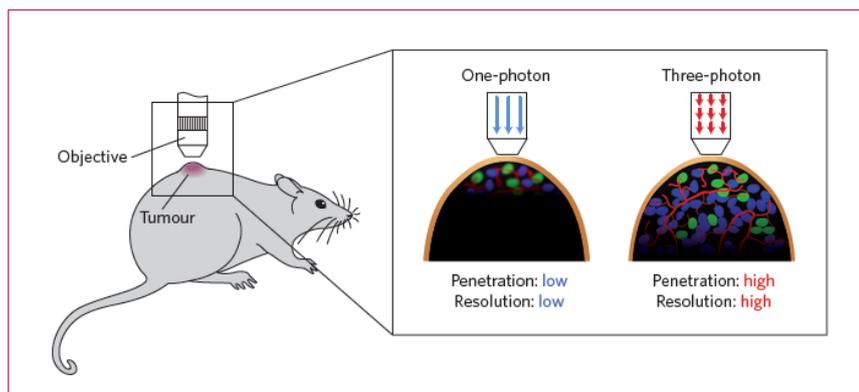


Figura 3.5 Differenza di penetrazione e risoluzione tra fluorescenza a singolo e a triplo fotone.

L'assorbimento della radiazione incidente non è l'unica causa di attenuazione dell'intensità della fluorescenza *in vivo*, in quanto essa è indotta anche dalla diffusione (*scattering*) che si osserva quando i fotoni deviano dall'asse parallelo del loro percorso. In particolare tale fenomeno può avvenire quando la disomogeneità del tessuto si presenta su una scala dimensionale ridotta rispetto alla lunghezza d'onda (*scattering* di Rayleigh) o comparabile ad essa (*scattering* di Mie) (Figura 3.6).

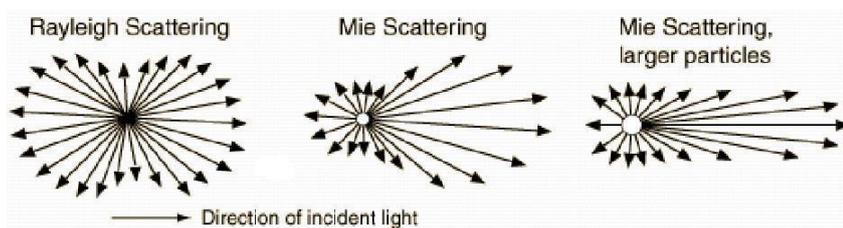


Figura 3.6 Diverse tipologie di *scattering*.

Considerando i tessuti degli organismi viventi, lo *scattering* dei fotoni può essere dipendente o meno dalla lunghezza d'onda, in quanto esso risulta fortemente influenzato dalla composizione del tessuto stesso. Poiché la diffusione dei fotoni risulta trascurabile nella regione dello spettro compresa tra i 700 e i 1000 nm, la scelta di fluorofori che emettano in questo intervallo di lunghezze d'onda garantisce minima riduzione dell'intensità della fluorescenza [Frangioni, 2003].

3.1.2 Fluorofori organici e *quantum dots* inorganici

Le caratteristiche intrinseche di un buon marcatore per il *bioimaging* ottico sono riscontrabili in fluorofori sia di natura organica che di natura inorganica (nanoparticelle e *quantum dots*). I fluorofori organici si legano in modo covalente o non covalente al campione da analizzare formando complessi capaci di emettere fluorescenza. Le molecole più utilizzate a tale scopo emettono nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra i 500 nm e i 900 nm e comprendono la cumarina, la fluoresceina, la rodamina, la squaraina e la cianina (Figura 3.7 a-e). Recentemente, l'attenzione si è focalizzata su molecole organiche aventi emissione di fluorescenza a lunghezze d'onda minori di 500 nm, tra cui i 3-ossobenzopirani, gli

oligotiofeni, i fanchinoni, i benzoossadiazoli e i derivati del naftalene (Figura 3.7 f-h). I due gruppi di molecole differiscono per il tipo di transizione elettronica che ne determina le proprietà ottiche: nel primo caso l'emissione è generata dalla transizione ottica delocalizzata sull'intero cromoforo, mentre nel secondo da una transizione intramolecolare a trasferimento di carica.

I fluorofori più comuni appartengono al primo gruppo in quanto sono caratterizzati da coefficienti di assorbimento molare e efficienza quantica superiori ma sono soggetti, analogamente a quelli del secondo gruppo, a rapido *photobleaching* e a decomposizione per scarsa stabilità fotochimica. Il tempo di vita della fluorescenza si riduce considerevolmente, anche in funzione del pH [Genger, 2008].

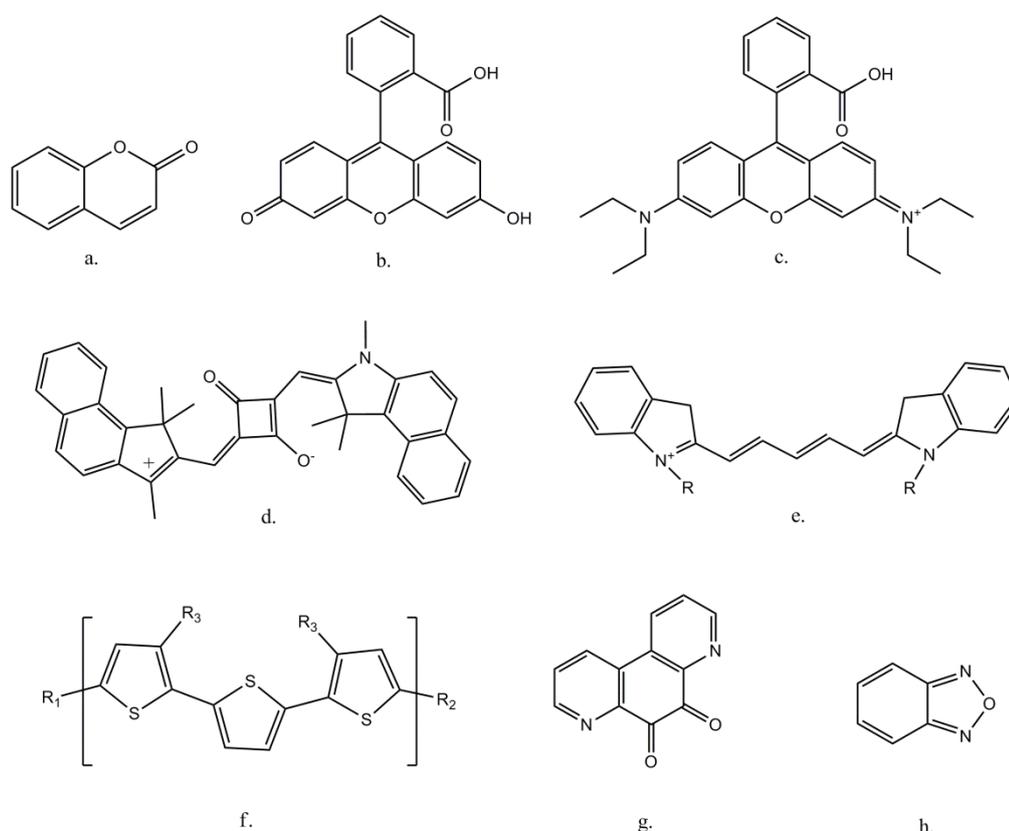


Figura 3.7 Esempi di fluorofori organici: cumarina (a.), fluoresceina (b.), rodamina B (c.), squaraina (d.), cianina (e.), oligotiofene (f.), fanchinone (g.), benzoossadiazolo (h.).

Tra i fluorofori inorganici, i *quantum dots* rappresentano la categoria più ampiamente studiata [Alivisatos, 2005]. Si tratta di particelle di semiconduttori quasi sferiche con diametro compreso tra 2 e 10 nm e caratterizzate da proprietà ottiche dipendenti dalle dimensioni. Sono costituiti generalmente da un *core* semiconduttore (ad esempio CdSe) e da un guscio di materiale atossico (ad esempio ZnS), rivestiti da molecole idrofiliche al fine di rendere la particella disperdibile in soluzione acquosa e nei tamponi biologici (Figura 3.8). In seguito ad eccitazione, gli elettroni della banda di valenza del *quantum dot* passano nella banda di conduzione e il loro rilassamento determina emissione di fotoni con conseguente produzione di fluorescenza. Il colore emesso dipende da dimensioni, forma, composizione chimica e distanza relativa dei fluorofori.

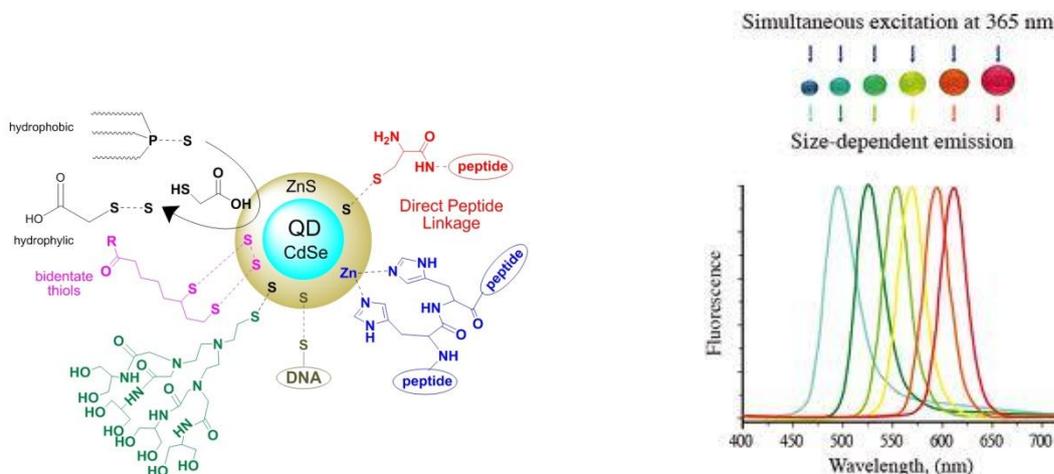


Figura 3.8 Quantum dot e dipendenza dell'emissione di fluorescenza dalla dimensione.

I *quantum dots* sono stati utilizzati per la prima volta in *bioimaging* nel 1998 [Bruchez, 1998] in quanto dotati, rispetto ai classici fluorofori organici, di proprietà molto vantaggiose, derivanti dai fenomeni di confinamento quantico.

L'esposizione alla luce, ad esempio, induce degradazione delle molecole organiche, mentre il *core* inorganico dei *quantum dots* è fotoresistente (Figura 3.9) e l'emissione di fluorescenza è osservabile anche dopo cicli di eccitazione/riassorbimento ripetuti nel tempo. La cinetica mono-esponenziale di decadimento della fluorescenza nel caso dei *quantum dots* permette di discriminare il segnale dall'autofluorescenza cellulare e dai fenomeni di *scattering*, aumentando la sensibilità del marcatore. Infine, le differenze in efficienza quantica, sezione d'urto di assorbimento e intensità di saturazione rendono i fluorofori inorganici capaci di emissioni più intense per le indagini *in vivo*. A differenza delle molecole organiche, infatti, i *quantum dots* trovano applicazione sia su cellule o tessuti fissati sia su cellule vive [Thurn, 2007; Smith, 2008; Rizvi, 2010].

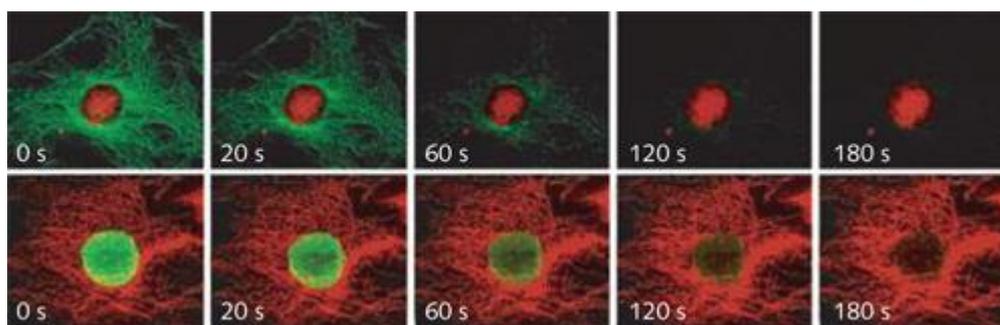


Figura 3.9 Riduzione del *photobleaching* nell'*imaging* cellulare mediante *quantum dots* (rosso), confrontata con fluorofori organici (verde).

L'utilizzo di questi fluorofori in campo biomedico rimane ancora limitato a causa della tossicità dei *quantum dots*, attribuibile al *core* inorganico che contiene metalli pesanti, al rivestimento e alle dimensioni. Infine, ulteriori svantaggi derivano dalle cariche presenti sulla superficie delle particelle, che inducono alternanza tra stato emittente e stato non-emittente e aumento dell'intensità della fluorescenza dopo eccitazione, apportando errori nella quantificazione dell'emissione. Tali limitazioni possono essere superate modificando le procedure di sintesi dei *quantum dots* o ricorrendo all'utilizzo di fluorofori inorganici di

diversa natura. Una strategia che permette di impiegare i *quantum dots* in *bioimaging* consiste nel rivestirne la superficie con un guscio (*shell*) di un materiale avente *band gap* elevato, al fine di permettere il confinamento degli eccitoni nel *core* costituito dal *quantum dot* [Steckel, 2004]. Nanocristalli, cosiddetti *core-shell*, di (CdS)ZnS sono oggetto di numerosi studi [Korgel, 2000; Zhong, 2003; Yang, 2006] e le loro proprietà li rendono potenziali agenti di contrasto in CT; un eventuale drogaggio del *core* con ioni Mn^{2+} permette ulteriore utilizzo di tali composti come agenti di contrasto in MRI [Santra, 2005]. Tra i fluorofori inorganici di altra natura in *bioimaging* sono utilizzate le nanoparticelle di silice, in quanto otticamente trasparenti, disperdibili in acqua, inerti biologicamente e modificabili in superficie al fine di legare le molecole bersaglio. La fluorescenza, in questo caso, viene emessa da opportuni coloranti organici introdotti all'interno delle particelle come droganti, che acquistano maggiore fotostabilità e ridotta tossicità perché schermati dalla silice [Hahn, 2011; Mancin, 2006]. Tali vantaggi sono propri anche dei sistemi ottenuti drogando le nanoparticelle di silice con i *quantum dots*; nanocompositi CdS/SiO₂ presentano ad esempio proprietà derivanti dalla combinazione delle caratteristiche dei due componenti e la presenza del guscio esterno di silice ne permette l'introduzione in ambiente fisiologico, senza indurre danni a cellule e tessuti [Schlecht, 2007]. In altri lavori riportati in letteratura [Yu, 2008; Capobianco, 2010], nanomateriali drogati per emettere fluorescenza sono descritti come potenziali *markers* biologici. Si tratta di matrici di ossidi o fluoruri, drogati con ioni dei lantanidi che assorbono nel vicino infrarosso (980 nm) ed emettono a energia più alta con tempi di vita della fluorescenza compresi tra i μs e i ms. Essi prendono il nome di *up-converting nanomaterials* in quanto l'*up-conversion* è il fenomeno caratterizzato da assorbimento successivo di due o più fotoni a bassa energia (IR) e da emissione di un singolo fotone ad alta energia (visibile).

3.1.3 Drogaggio con ioni dei lantanidi e luminescenza

Il drogaggio con ioni dei lantanidi conferisce ai materiali proprietà luminescenti derivanti da transizioni elettroniche radiative interne al guscio 4f degli ioni trivalenti di questi elementi. Se la matrice ospitante gli ioni è di natura inorganica, l'efficienza quantica della luminescenza in genere aumenta, in quanto le vibrazioni altamente energetiche dei legami chimici di matrici organiche attenuano notevolmente la luminescenza dei lantanidi. Materiali luminescenti, ottenuti per drogaggio con ioni dei lantanidi, trovano applicazione come emettitori a fosfori, amplificatori ottici, lasers e *displays* [Becker, 1999; Feldmann, 2003]. L'estensione del loro utilizzo al *bioimaging* richiede approfondimento in quanto prevede analisi di citotossicità e biocompatibilità sui materiali ottenuti.

I lantanidi sono gli elementi che si collocano dopo il lantanio nella tavola periodica e sono caratterizzati dal progressivo riempimento degli orbitali 4f, spostandosi da sinistra a destra lungo il periodo. La reattività e la chimica di coordinazione non variano molto da elemento a elemento in quanto gli elettroni del guscio 4f sono schermati dai gusci pieni 5s e 5p e quindi la configurazione elettronica non varia considerando tutti gli elementi della serie. Per lo stesso motivo, la separazione degli orbitali prevista dalla teoria del campo cristallino (pari a circa 100 cm^{-1}) ha un minimo effetto sull'energia dei termini atomici, che risulta fortemente influenzata dall'accoppiamento spin-orbita. Le costanti di accoppiamento sono dell'ordine dei 2000 cm^{-1} , fatta eccezione per l'europio e il samario in cui le costanti assumono valori prossimi all'energia di agitazione termica (kT), rendendo possibile la popolazione degli stati aventi energia immediatamente superiore allo stato fondamentale. In figura 3.10 si riportano le energie dei termini atomici delle configurazioni elettroniche degli ioni trivalenti dei

Il drogaggio con ioni dei lantanidi interessa principalmente matrici isolanti e semiconduttrici; nell'ultimo decennio l'attenzione si è focalizzata sulla preparazione di nanostrutture drogate al fine di permetterne l'utilizzo in campo biomedico come marcatori fluorescenti inorganici [Bünzli, 2005].

Nanoparticelle inorganiche di diversa natura vengono attualmente utilizzate per il *bioimaging* diagnostico e terapeutico e tale applicazione comporta esposizione delle particelle e conseguentemente delle cellule cui sono legate a stimoli esterni (radiazioni) che potrebbero modificare la natura chimica dei fluorofori inducendo potenziale tossicità o compromettere l'omeostasi cellulare.

Tra i requisiti dei marcatori fluorescenti biologici, descritti nel paragrafo 3.1.1, la biocompatibilità e la bassa tossicità sono fondamentali per il loro effettivo utilizzo in *bioimaging*. Con il termine biocompatibilità ci si riferisce alla capacità del materiale di svolgere la sua funzione in ambiente fisiologico senza subire o causare modifiche al sistema; una sostanza viene definita, invece, tossica se provoca danni fisiologici all'organismo [Williams, 2008].

Non esistono protocolli universalmente riconosciuti per lo studio della tossicità *in vitro* e *in vivo* delle nanoparticelle perché, in base alle dimensioni, alla carica superficiale e all'eventuale rivestimento i parametri da considerare cambiano. Inoltre, a seconda della tecnica di visualizzazione e della natura del tessuto da analizzare, le dimensioni opportune variano e diventa importante valutare gli effetti a lungo termine dell'interazione con i singoli comparti biologici.

Recentemente è stato proposto un modello per ottimizzare gli studi di tossicità cellulare delle nanoparticelle [Soenen, 2011]. I parametri da controllare nella sintesi di potenziali marcatori biologici nanostrutturati riguardano dimensioni, forma, purezza e carica superficiale. Sebbene i meccanismi di penetrazione (*uptake*) delle particelle nelle cellule e il loro trasporto intracellulare siano ancora oggetto di studio, il processo più plausibile consiste nell'endocitosi che prevede la formazione di un'invaginazione della membrana atta ad inglobare in una vescicola la sostanza da introdurre per poi trasportarla nel plasma. Qui la vescicola si fonde con altri organelli, detti lisosomi, che digeriscono le sostanze inglobate e rilasciano i detriti nello spazio extracellulare mediante fusione con la membrana cellulare.

La fagocitosi e la pinocitosi sono altre tecniche di penetrazione delle sostanze all'interno delle cellule e si riferiscono rispettivamente all'*uptake* di particelle di grandi dimensioni ($> 0.5 \mu\text{m}$) e all'inglobamento di fluido extracellulare con conseguente apporto di tutte le sostanze disperse [Silverstein, 1977]. L'*uptake* cellulare dipende fortemente dalle dimensioni dei sistemi entranti che non devono essere inferiori ai 5 nm in quanto rischierebbero di penetrare nel nucleo e non devono superare i 200 nm poiché l'*uptake* diverrebbe meno efficiente e con esso la possibilità di ricavare le informazioni desiderate. Anche la forma influenza la penetrazione all'interno delle cellule che risulta massima per particelle sferiche [Hauck, 2008]. La vitalità cellulare risulta invece compromessa dalla presenza di impurezze introdotte nelle cellule unitamente alle nanoparticelle. Ioni metallici o stabilizzanti organici in eccesso, utilizzati nella sintesi, devono essere rimossi mediante dialisi contro tampone fisiologico prima dell'*uptake*. Infine la carica superficiale impedisce l'aggregazione delle particelle e ne influenza la stabilità, mentre la composizione superficiale può avere effetti sulla tossicità, in misura dipendente dal tipo di gruppi funzionali utilizzati [Mailänder, 2009]. I fattori determinanti la tossicità non riguardano unicamente le proprietà intrinseche dei nanomateriali, ma comprendono anche le procedure sintetiche per la preparazione delle nanoparticelle e il tipo di ceppo cellulare analizzato. Di conseguenza, nanoparticelle atossiche per specifiche cellule potrebbero indurre apoptosi o danni ad altre tipologie

cellulari. Inoltre, metodi diversi usati per valutare la citotossicità dei medesimi sistemi sembrano dare esiti discordanti. Molti tests sono infatti di tipo colorimetrico e nanoparticelle capaci di assorbire o emettere luce potrebbero dare segnali falsi positivi inficiando l'esattezza dei risultati [Choi, 2011]. Tutti i tests *in vivo* e *in vitro* noti si effettuano esponendo le cellule al nanomateriale in ambiente biologico. A tale scopo, le nanoparticelle inorganiche vengono sempre rivestite, tramite opportuni protocolli di funzionalizzazione, da molecole che le rendano disperdibili in acqua o in tamponi fisiologici.

Capitolo 4

Funzionalizzazione superficiale dei nanosistemi

4.1 Introduzione

Le tecniche moderne di *bioimaging* sfruttano, *inter alia*, nanoparticelle in grado di legarsi in maniera specifica alle molecole biologiche da visualizzare. Per acquisire questa proprietà, detta bioconiugazione, la superficie delle nanostrutture viene opportunamente modificata per fisisorbimento o chemisorbimento di molecole terminanti con gruppi funzionali capaci di formare legami con i sistemi biologici bersaglio (anticorpi, oligonucleotidi o proteine) (Figura 4.1) [Sperling, 2010].

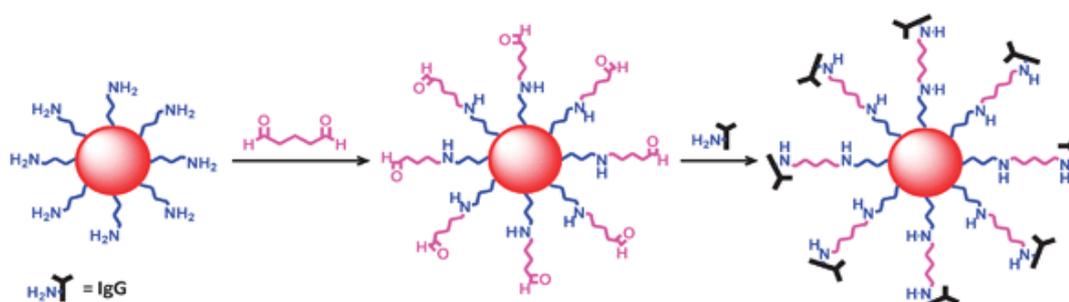


Figura 4.1 Schema rappresentativo della bioconiugazione.

L'interazione con tali strutture può essere di tipo covalente o non covalente (Tabella 4.1) producendo nanoparticelle bioconiugate stabili, nel primo caso, e soggette a disaccoppiamento in ambiente salino, nel secondo caso. L'approccio più diretto è il primo e prevede chemisorbimento delle biomolecole sulla superficie delle nanoparticelle o formazione di legami per reazione con leganti bifunzionali atti a coordinare ad un'estremità la nanoparticella e all'altra la biomolecola. Per aumentare la stabilità delle biomolecole e minimizzare l'adsorbimento non specifico di altre strutture, spesso come leganti vengono scelti dei polimeri. L'interazione non covalente prevede in genere fisisorbimento tramite legame a idrogeno o per attrazione elettrostatica tra la superficie carica delle nanoparticelle e una carica presente sulle biomolecole bersaglio [Selvan, 2010]. Tra queste, le proteine rappresentano la categoria maggiormente coinvolta, anche se l'adsorbimento può determinarne denaturazione con conseguente perdita delle proprietà biologiche. Studi di fluorescenza e dicroismo circolare sui prodotti di bioconiugazione permettono di valutare le eventuali variazioni nella struttura nativa delle proteine adsorbite [Erathodiyil, 2011].

La bioconiugazione avviene in seguito ad introduzione delle nanoparticelle in ambiente fisiologico; la superficie di questi sistemi deve quindi essere opportunamente funzionalizzata e la scelta dei leganti deve ricadere su molecole che, ancorandosi alla superficie, rendano le nanoparticelle disperdibili in acqua o in tamponi biologici. La produzione di nanosistemi stabili in soluzione acquosa non è sufficiente per l'applicazione al *bioimaging*, in quanto essi, una volta introdotti nell'organismo, non devono indurre tossicità e non devono essere degradati o rigettati prima di raggiungere la molecola bersaglio. La funzionalizzazione superficiale ha, quindi, l'ulteriore obiettivo di produrre strutture biocompatibili e invisibili al sistema immunitario (*stealth nanoparticles*).

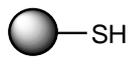
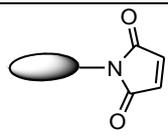
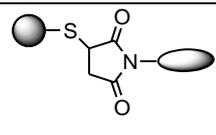
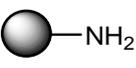
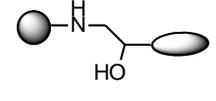
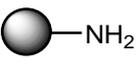
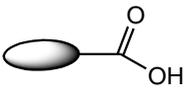
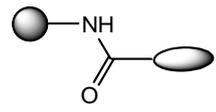
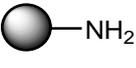
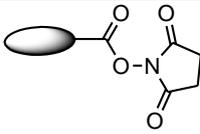
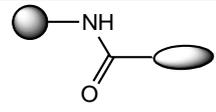
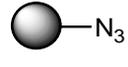
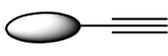
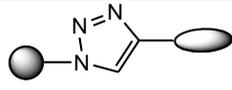
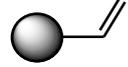
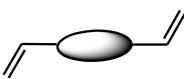
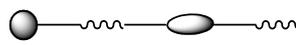
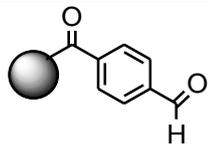
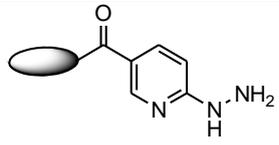
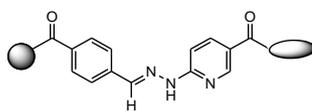
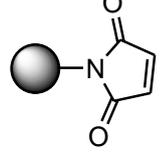
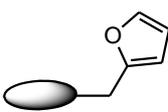
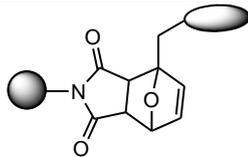
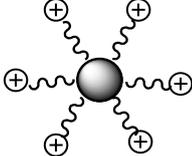
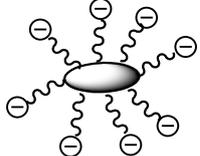
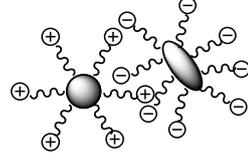
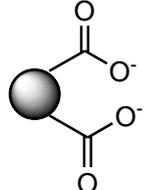
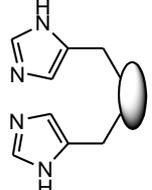
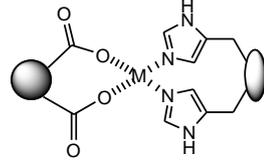
Legante	Substrato	Reazione	Nanoparticella bioconiugata	Interazione
		Addizione di Michael		covalente
		Apertura di epossido		covalente
		Formazione di legame ammidico		covalente
		Ammidazione		covalente
		Click chemistry		covalente
		Polimerizzazione via metatesi		covalente
		Formazione di un idrazone		covalente
		Reazione di Diels-Alder		covalente
		Interazione elettrostatica		non covalente
		Coordinazione metallica		non covalente

Tabella 4.1 Esempi di chimica di bioconiugazione delle nanoparticelle inorganiche [modificato da Erathodiyil, 2011].

Opportuni leganti polimerici inducono aumento del tempo di circolazione delle nanoparticelle nei tessuti e riducono l'affinità con le opsonine (proteine del siero che, legandosi ai corpi esogeni, aumentano l'efficienza della fagocitosi) mediante repulsione sterica. Quest'ultima deriva dalla formazione da parte dei polimeri di un denso guscio idratato intorno alla nanoparticella che rende entropicamente ed energeticamente sfavorevole ogni interazione con le opsonine e rallenta il conseguente riconoscimento da parte del sistema immunitario [Berger, 2010].

Come già descritto nel Capitolo 3, tra i sistemi inorganici che più frequentemente sono stati utilizzati per il *bioimaging*, vi sono sistemi di nanostrutture a base di *quantum dots*. Questi sono nanoparticelle di semiconduttori drogate con ioni dei lantanidi o con coloranti organici, stabili in soluzioni acquose o in solventi apolari, in quanto le tecniche di preparazione prevedono l'utilizzo di stabilizzanti colloidali, in genere tensioattivi, che inibiscono la coalescenza e/o l'aggregazione delle strutture. Se la sintesi di questi sistemi viene condotta in solvente organico, il loro trasferimento in acqua o in tamponi biologici induce precipitazione [Valizadeh, 2012]. Questo fenomeno si può evitare sottoponendo i prodotti di sintesi ad una serie di reazioni atte a renderli disperdibili in acqua senza alterarne le proprietà di luminescenza. Esistono numerose strategie di funzionalizzazione e la preferenza di una sulle altre dipende dal tipo di molecola idrofilica da introdurre nel sistema, dalla composizione e dalle proprietà intrinseche dei nanosistemi da disperdere, dalle caratteristiche dello strato di tensioattivo adsorbito sulla superficie delle strutture al termine della sintesi e, infine, dalla natura del substrato bersaglio [Sperling, 2010; Erathodiyil, 2011; Nam, 2013].

4.2 Leganti

In generale, le nanoparticelle interagiscono con le cellule, gli organelli cellulari e le proteine attraverso le molecole collocate sulla loro superficie. Modifiche superficiali inducono nuove funzionalità chimiche e permettono la formazione di legami con biomolecole di diversa natura.

4.2.1 Caratteristiche chimico-fisiche e strutturali

Le molecole legate alla superficie delle nanoparticelle ne controllano la crescita e ne prevengono l'aggregazione durante la sintesi. Esse vengono scelte opportunamente in base alla composizione dei nanomateriali e al tipo di solvente che funge da fase disperdente, con l'obiettivo di garantire la formazione di sospensioni stabili.

Ogni legante deve quindi possedere affinità per la superficie delle nanoparticelle, ma anche per il solvente e tali requisiti sono caratteristici di molecole bifunzionali con gruppi capaci di interagire simultaneamente con entrambe le specie. Per disperdere le nanostrutture in soluzione acquosa, la scelta dei leganti ricade su molecole cariche o polari, mentre leganti costituiti da lunghe catene alifatiche sono adatti per stabilizzare le nanoparticelle in solventi apolari. In superficie possono ancorarsi anche specie anfifiliche, determinando solubilità in mezzi aventi polarità intermedia tra l'acqua e i solventi lipofili (Figura 4.2).

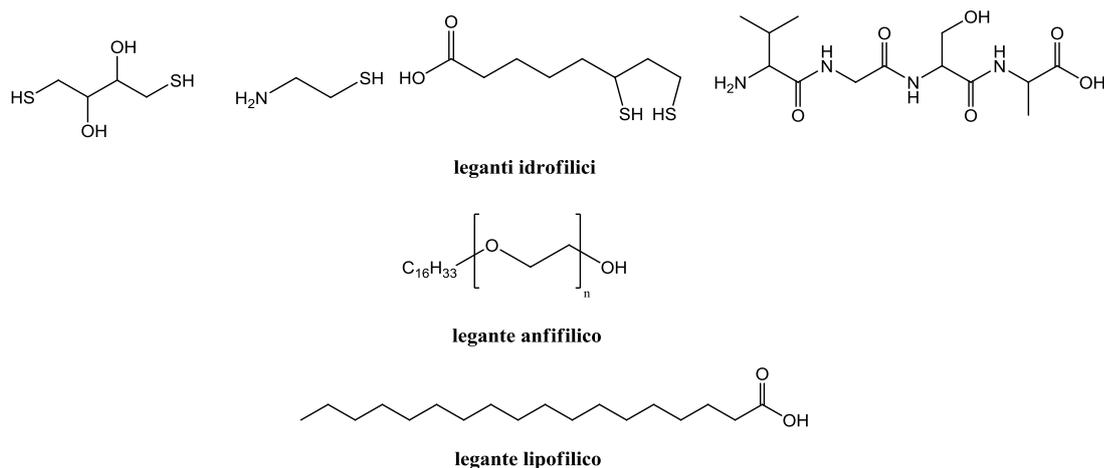


Figura 4.2 Esempi di leganti idrofilici, lipofilici e anfifilici.

La stabilità delle sospensioni prodotte dipende anche dal grado di affinità tra leganti e superficie, in quanto molecole fortemente legate formano strati di rivestimento delle particelle densi che migliorano la stabilità, anche in presenza di alte concentrazioni di sali disciolti nel mezzo disperdente [Sakura, 2005]. L'impaccamento delle molecole di legante sulla superficie dipende tuttavia dalla relazione tra la geometria e la conformazione del legante stesso e il diametro delle particelle: anche le dimensioni delle strutture sintetizzate influenzano la stabilità colloidale [Nam, 2013].

Un buon legante per la funzionalizzazione deve tuttavia possedere anche altre caratteristiche quali: i) facilità di sintesi in quantità elevata, ii) dimensioni molecolari ridotte per evitare di produrre nanoparticelle di diametro idrodinamico troppo grande, iii) presenza di un'estremità modificabile per garantire bioconiugazione, iv) minima interazione con molecole biologiche diverse da quelle bersaglio, v) scarsa o assente tossicità *in vivo* e infine vi) conservazione delle proprietà intrinseche delle nanoparticelle dopo funzionalizzazione.

4.2.2 Tipologie

In base alla composizione delle nanoparticelle, alla natura del mezzo disperdente e alla concentrazione di specie disciolte in esso, la scelta del legante opportuno può ricadere su: molecole a basso peso molecolare, lipidi, silice e polimeri.

La prima categoria di molecole ha applicazioni limitate rispetto alle altre perché specie piccole possono essere desorbite facilmente dalla superficie delle nanoparticelle compromettendone la stabilità. Inoltre, la loro affinità per la superficie dipende dalla composizione delle particelle e molecole specifiche andrebbero ricercate per ogni tipo di sistema sintetizzato. Le specie appartenenti alle altre tre categorie, invece, legandosi mediante interazioni di van der Waals alle molecole presenti sulla superficie delle nanoparticelle, non vengono allontanate facilmente e non alterano le proprietà delle nanoparticelle indipendentemente dalla composizione di queste ultime.

4.2.2.1 Molecole a basso peso molecolare

La sostituzione del rivestimento originario delle nanoparticelle con molecole a basso peso molecolare è la tecnica di funzionalizzazione superficiale più semplice e prevede legame diretto con la superficie. La scelta delle molecole da ancorare dipende molto dalla

composizione delle particelle: ammine, tioli e fosfine risultano adatte a coordinare metalli nobili, mentre acidi carbossilici, acidi fosfonici e catecoli formano legami forti con gli ossidi metallici (Figura 4.3).

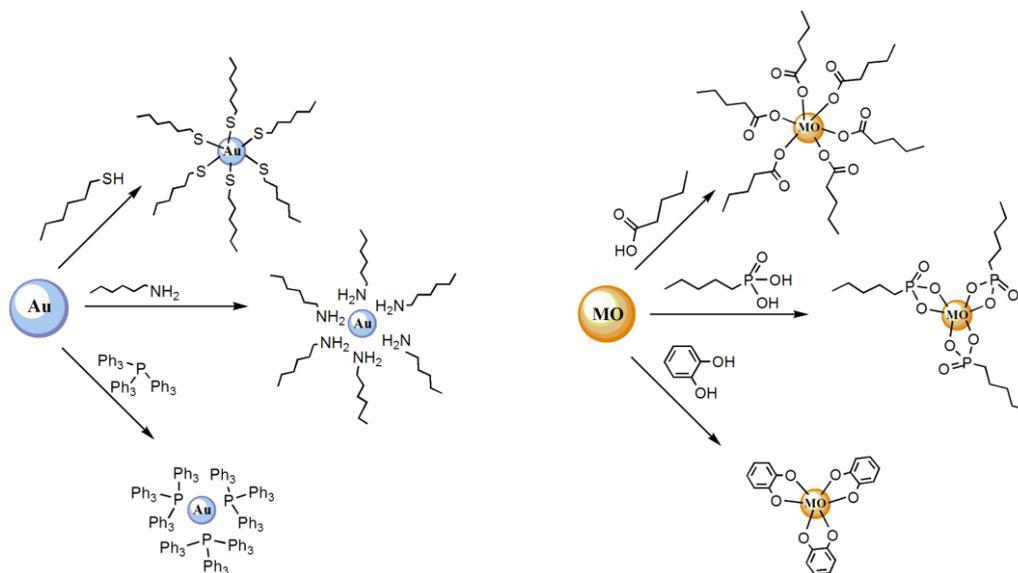


Figura 4.3 Nanoparticelle d'oro e di ossidi funzionalizzate con leganti opportuni.

Il vantaggio nell'utilizzo di tali specie consiste nella conservazione di un diametro idrodinamico limitato, ma il basso peso molecolare e le interazioni dinamiche con la superficie rendono questi leganti suscettibili di desorbimento e ossidazione. Ciò provoca fenomeni di aggregazione e instabilità colloidale delle nanoparticelle che possono essere controllati e evitati mediante utilizzo di derivati multidentati e dendroni delle molecole stesse (Figura 4.4) [Gillich, 2011]. I leganti aventi strutture flessibili interagiscono con la superficie più velocemente dei rispettivi derivati chelanti o stericamente ingombrati ma, altrettanto rapidamente, si allontanano da essa. La chelazione e l'ingombro sterico rallentano la coordinazione superficiale da parte dei leganti, ma garantiscono maggiore stabilità della struttura finale. Polimeri con ramificazioni costituite da imidazoli, ad esempio, grazie alla loro capacità di coordinare la superficie in modo multidentato, conferiscono ai *quantum dots* elevata stabilità colloidale nell'intervallo di pH compreso tra 5 e 10.5, diametro idrodinamico limitato e efficienza quantica di fotoluminescenza maggiore del 50%. Inoltre, si ossidano meno facilmente dei tiolati [Liu, 2009].

Gli acidi carbossilici conferiscono stabilità alla sospensione colloidale grazie alla repulsione elettrostatica ma, poiché questa dipende dal pH e dalla forza ionica, in alcuni casi specifici la stabilità può risultare compromessa. L'utilizzo di molecole funzionalizzate con ammine quaternarie per ottenere elevata carica superficiale permette di superare il problema.

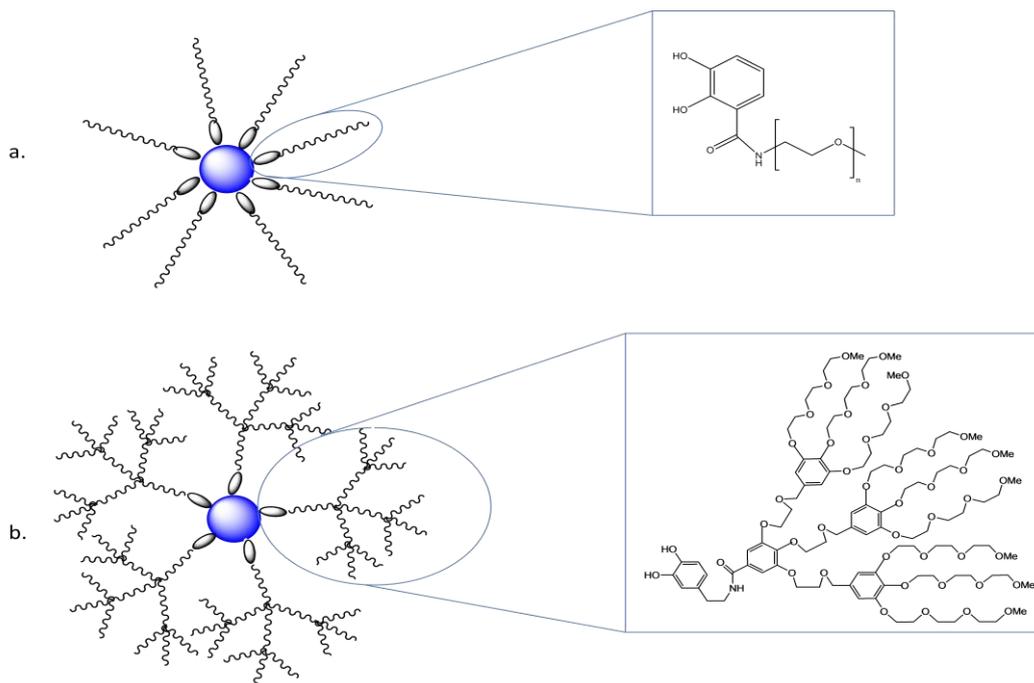


Figura 4.4 Esempio di leganti a singola catena (a.) e dendroni (b.).

I leganti donatori all'ossigeno mostrano affinità per le nanoparticelle di ossidi metallici e, anche in questo caso, la capacità di dare chelazione aumenta la stabilità colloidale dei sistemi finali. Tra le molecole aventi tali requisiti, i catecoli sono ampiamente utilizzati ad esempio per stabilizzare nanoparticelle magnetiche di ossido di ferro in acqua e in tamponi fisiologici [Amstad, 2009]. Queste molecole formano per chelazione con gli atomi metallici in superficie dei cicli a 5 membri, molto più stabili dei cicli a 4 membri, tipici della coordinazione degli acidi carbossilici. La molecola più piccola, utilizzata a tale scopo e appartenente alla categoria, è la dopamina. Si tratta di un derivato dell'amminoacido L-DOPA (*L-3,4-dihydroxyphenilalanine*) che è abbondante nella proteina che permette adesione dei molluschi della specie *Mytilus edulis* agli scogli (Figura 4.5). Da studi spettroscopici XANES (*X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy*) e XAFS (*X-ray Absorption Fine Spectroscopy*) [Chen, 2002], si può dedurre che la dopamina forma legami forti con gli atomi di ferro sottocoordinati presenti sulla superficie delle nanoparticelle, in quanto la chelazione determina coordinazione ottaedrica intorno al ferro, tipica del *bulk*. Tale risultato è confermato dalla termodinamica dei processi di adsorbimento e desorbimento in quanto il primo risulta energeticamente favorito e può essere esteso anche a nanoparticelle di ossidi metallici diversi da Fe_2O_3 , quali TiO_2 e ZrO_2 [Rajh, 2002]. Film e nanoparticelle di TiO_2 sono funzionalizzabili infatti non solo con derivati monomerici del catecolo, ma anche con catecolati trimerici al fine di conferire al legame con la superficie maggiore stabilità termica e meccanica [Franzmann, 2011].

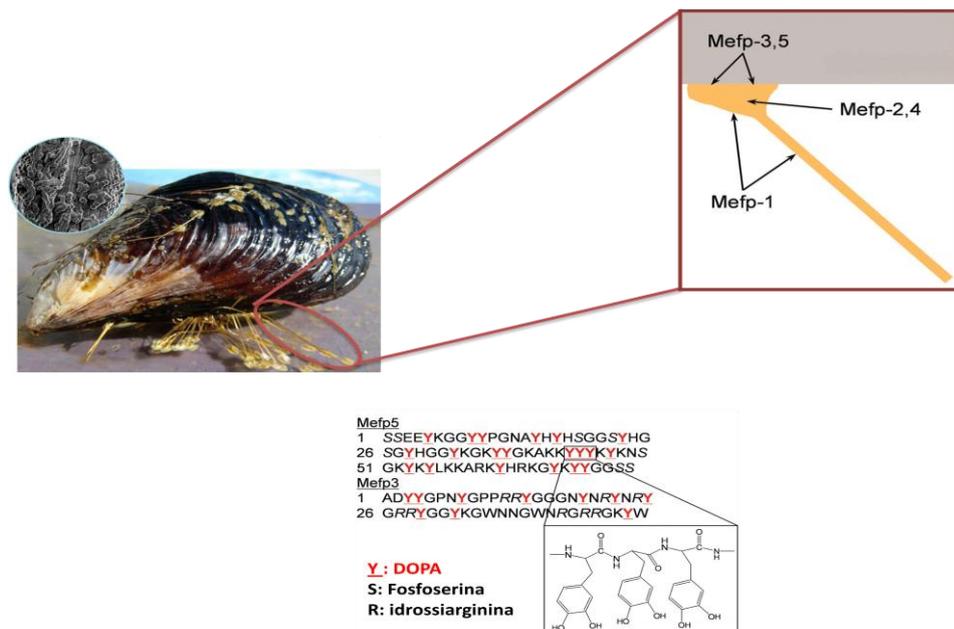


Figura 4.5 Proteina della specie *Mytilus edulis* da cui si ricava l'amminoacido L-DOPA.

Nei casi considerati, la stabilità del sistema finale deriva anche dalla formazione di un metallaciclo a 5 membri per chelazione e la presenza del gruppo amminico terminale permette ulteriore funzionalizzazione. La dopamina sembra però essere soggetta a ossidazione da parte dello ione Fe^{3+} e la reazione con esso determina anche degradazione delle nanoparticelle. Il verificarsi delle reazioni illustrate in figura 4.6 è stato dimostrato da studi spettroscopici e magnetici [Shultz, 2006] e, unitamente alla ridotta stabilizzazione delle nanoparticelle in condizioni di temperatura prossime a quella corporea, ha portato alla formulazione di nuove molecole, derivate dalla dopamina, ma capaci di conferire alle nanostrutture elevata stabilità.

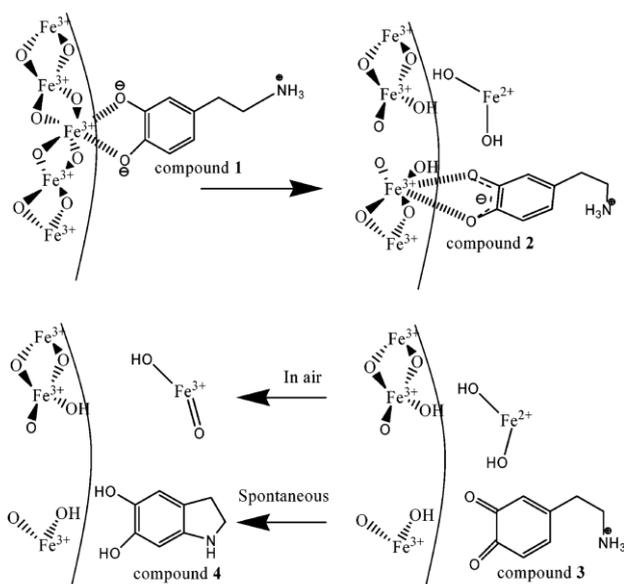


Figura 4.6 Schema delle reazioni di degradazione della dopamina e delle nanoparticelle in soluzione acquosa [da Shultz, 2006].

In particolare sono stati sintetizzati leganti costituiti da catene polimeriche di polietilenglicole (PEG) terminanti con catecoli di diversa natura [Amstad, 2009]. Confrontando la stabilità delle nanoparticelle funzionalizzate con dopamina, L-DOPA, idrossidopamina, idrossipiridina e mimosina con quelle leganti nitrodopamina o nitroDOPA si osserva che queste ultime rendono le sospensioni stabili anche dopo cicli ripetuti di filtrazione e ridispersione. La presenza del gruppo nitro inibisce i processi ossidativi e non determina agglomerazione irreversibile delle nanoparticelle a temperature prossime al *cloud point* (temperatura alla quale la soluzione del polimero diventa torbida e si assiste a separazione di fase); fenomeni entrambi osservabili con gruppi terminali privi del gruppo NO₂ [Pang, 2000]. Tali differenze sono imputabili alla forza dei legami di interazione tra gruppo terminale della catena polimerica e superficie delle nanoparticelle. La pK_a dei catecoli assume, infatti, valori superiori a 9, mentre i nitrocatecoli, avendo un gruppo elettronattrattore sull'anello, risultano molto più acidi (pK_a ≈ 6.5) e, di conseguenza, formano legami più stabili con la superficie, rendendo il desorbimento meno probabile. Poiché l'affinità del legame aumenta quando la pK_a del legante approssima il punto di carica zero (*zero point charge*, ZPC) dell'ossido che costituisce la nanoparticella, la scelta delle molecole da introdurre in superficie mediante le strategie di funzionalizzazione deve tener conto anche di questo fattore.

4.2.2.2 Lipidi

Nanoparticelle inorganiche funzionalizzate possono essere incapsulate in un doppio strato lipidico costituito da molecole aventi estremità idrofobica interagente con le molecole superficiali delle nanoparticelle e estremità idrofilica esterna volta a garantire stabilità colloidale in soluzione acquosa.

Le metodologie di sintesi sono essenzialmente due: i) microemulsione diretta e ii) idratazione di un film lipidico (Figura 4.7). Il primo approccio prevede aggiunta di una soluzione acquosa del tensioattivo alla fase organica contenente le nanoparticelle, seguita da vigorosa agitazione meccanica. Le nanostrutture funzionalizzate si ricavano per evaporazione del solvente. La seconda procedura consiste invece nel mescolare nanoparticelle e fosfolipidi in un solvente organico. L'evaporazione del solvente, in questo caso, produce un film di nanoparticelle funzionalizzate che viene idratato per aggiunta di acqua producendo una sospensione stabile.

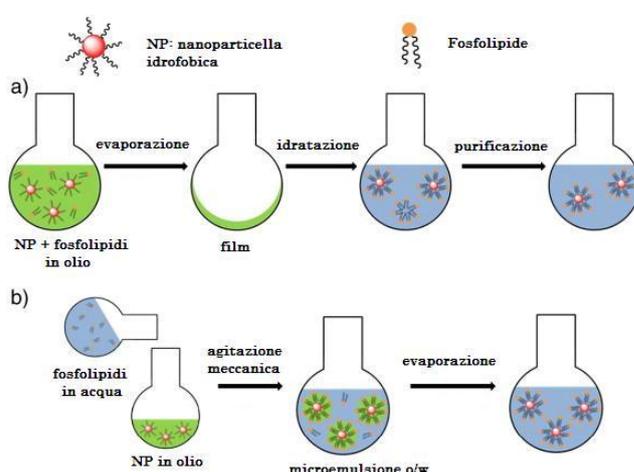


Figura 4.7 Metodologie di sintesi di nanoparticelle inorganiche incapsulate in doppio strato lipidico.

4.2.2.3 Silice

Il rivestimento delle nanoparticelle con la silice rappresenta uno dei metodi di funzionalizzazione superficiale più diffusi, in quanto essa forma uno strato robusto e inerte contro la degradazione e conferisce alle strutture rivestite solubilità in acqua. *Quantum dots* rivestiti di silice si ottengono per microemulsione inversa w/o [Koole, 2008]: essi si collocano in fase organica e l'aggiunta di una base, in presenza di un opportuno tensioattivo, produce la microemulsione. L'introduzione nel sistema di un silano e le sue successive idrolisi e condensazione all'interfaccia acqua/olio determinano la formazione di un guscio che ingloba i *quantum dots*.

La procedura descritta può essere estesa anche a nanoparticelle diverse dai *quantum dots* e la solubilità in acqua delle strutture finali può essere aumentata notevolmente legando al guscio di silice catene di polietilenglicole (PEG). Studi di citotossicità su nanoparticelle ricoperte di silice dimostrano elevata vitalità cellulare anche a concentrazioni alle quali, in presenza di rivestimenti di altra natura, si osserva morte delle cellule [Selvan, 2005; Mancin, 2010]. Sulla base di questa proprietà, la silice può essere facilmente funzionalizzata al fine di coordinare biomolecole (Figura 4.8) e trovare applicazione, sfruttando le proprietà ottiche dei *quantum dots*, nella diagnosi e nella terapia delle malattie [Kumar, 2008; Wang, 2009].

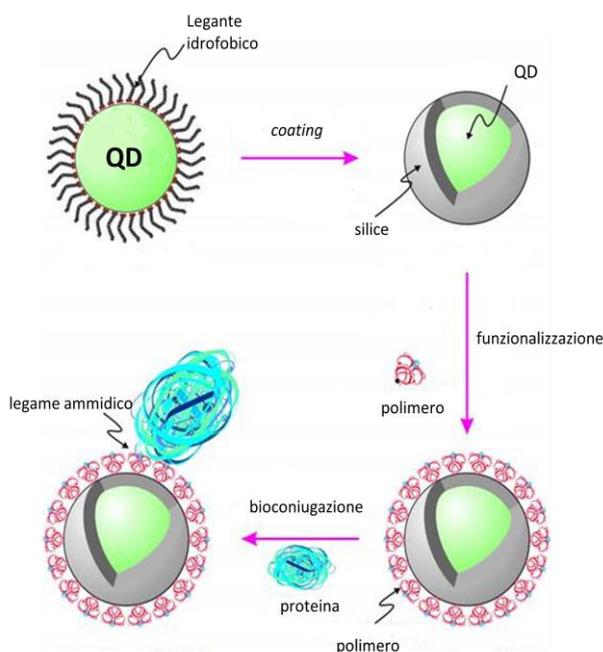


Figura 4.8 Funzionalizzazione e bioconiugazione di nanoparticelle rivestite di silice.

4.2.2.4 Polimeri

Le macromolecole rappresentano una categoria molto ampia di potenziali leganti di funzionalizzazione, anche se i prodotti finali di sintesi sono nanoparticelle con diametro idrodinamico grande. La conseguente ridotta accessibilità ai comparti cellulari limita le applicazioni biologiche di questi materiali, ma la scelta di polimeri aventi gruppi funzionali zwitterionici e l'utilizzo di strategie di funzionalizzazione con scambio dei leganti permettono di superare il problema [Susumu, 2011]. La presenza di gruppi zwitterionici, infatti, inibisce l'adsorbimento superficiale delle proteine del siero che indurrebbe ulteriore

aumento delle dimensioni delle nanoparticelle, compromettendone la *clearance* renale. I leganti polimerici risultano, in ogni caso, vantaggiosi rispetto alle molecole a basso peso molecolare, ai lipidi e alla silice poiché aumentano la stabilità delle sospensioni colloidali. L'applicazione delle nanoparticelle funzionalizzate in ambito biomedico restringe le tipologie di polimeri utilizzabili a quelli biocompatibili e capaci di produrre superfici resistenti all'adsorbimento non specifico di proteine (*antifouling surfaces*). Tra questi i più diffusi sono il polietilenglicole (PEG), i polisaccaridi, i polimeri peptidomimetici e le poliossazoline (POX) (Figura 4.9).

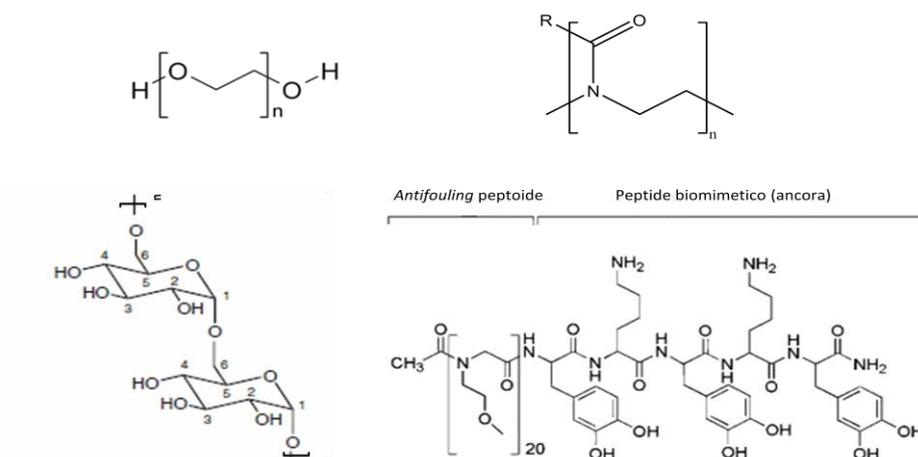


Figura 4.9 Principali polimeri che conferiscono biocompatibilità e biopassività alle superfici.

La coniugazione nanoparticelle-polimeri può avvenire mediante due metodi principali, definiti come “*grafting-from*” o “*grafting-to*”: la prima tecnica consiste in una polimerizzazione indotta a partire dalla superficie, mentre nella seconda catene polimeriche funzionalizzate vengono fatte reagire con il substrato precedentemente attivato (Figura 4.10). Quest’ultimo approccio è più semplice ed essendo compatibile con substrati che si estendono nelle tre dimensioni riguarda anche la funzionalizzazione delle nanoparticelle.

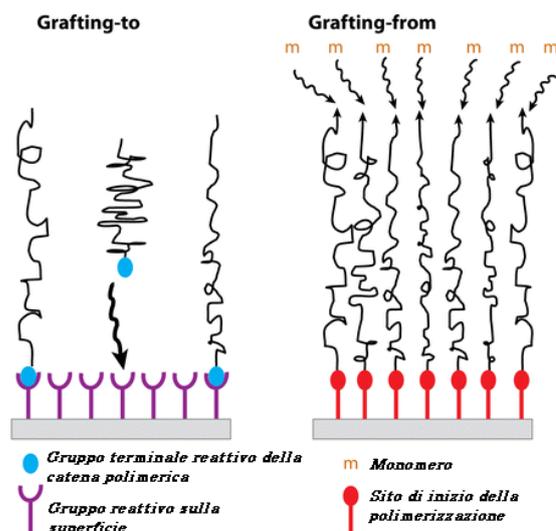


Figura 4.10 Rappresentazione delle differenze tra le tecniche “*grafting-to*” e “*grafting-from*”.

I rivestimenti in PEG mostrano elevate proprietà *antifouling*, soprattutto quando assumono conformazione a spazzola (*brush conformation*), ma sono soggetti a degradazione termica e si autoossidano in presenza di ossigeno e di ioni dei metalli di transizione. Inoltre, perdono la loro funzione in applicazioni *in vivo* in quanto i gruppi ossidrilici vengono ossidati ad aldeidi e acidi dagli enzimi [Herold, 1989].

Nel corso degli anni, l'attenzione si è quindi spostata su polimeri capaci di mimare le proprietà biologiche delle membrane cellulari, in quanto anch'esse *antifouling*. Queste ultime, infatti, contengono molecole glicosilate che permettono il riconoscimento tra cellule interagenti e contribuiscono alla repulsione sterica volta ad impedire l'adesione non specifica alla membrana di altre molecole o cellule. Tra i carboidrati, il destrano può essere considerato una valida alternativa al PEG. Si tratta di un polisaccaride costituito da unità di D-glucosio legate tramite legame α -1,6 glicosidico e avente catene laterali legate alle posizioni 3 delle unità di glucosio dello scheletro. Tale composto non è tossico, non subisce ossidazione e mostra buone proprietà *antifouling*. Nei lavori riportati in letteratura [Holland, 1998; Perrino, 2008], molecole di destrano vengono ancorate a scheletri polimerici di diversa natura, formandone le catene laterali. In questi casi, la struttura del polimero interagisce con la superficie delle nanoparticelle mediante interazioni idrofobiche o elettrostatiche, mentre le catene laterali, idrofiliche, garantiscono solubilità del sistema in soluzione acquosa (Figura 4.11).

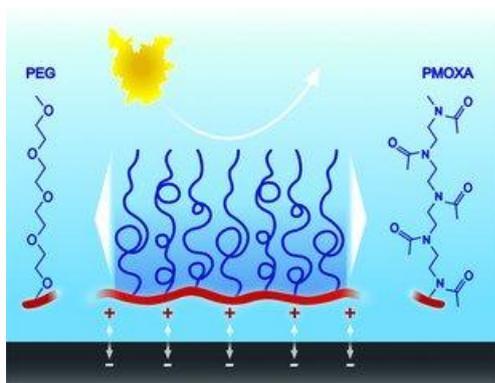


Figura 4.11 Rappresentazione di una superficie *antifouling* ottenuta a partire da PEG e POX [da Konradi, 2012].

Nell'ultimo decennio, le polioossazoline (POX), di cui in figura 4.12 si riporta un esempio, sono state studiate come polimeri altamente idrosolubili e biorepellenti, in alternativa al PEG [Adams, 2007]. Sono polimeri costituiti da uno scheletro polietileneimminico, i cui derivati mostrano catene laterali di diversa natura legate mediante legame ammidico all'interno dell'unità monomerica. La struttura è simile a quella del PEG e isomerica con quella dei polipeptidi; la degradazione risulta quindi ridotta dalle proprietà peptidomimetiche e dalla presenza dell'ammina terziaria che, non potendo essere riconosciuta dagli enzimi idrolitici, garantisce stabilità in ambiente biologico. La sintesi delle POX prevede polimerizzazione cationica vivente per apertura di anello e i prodotti ottenuti hanno distribuzioni strette dei pesi molecolari medi [Konradi, 2008]. La versatilità di questo metodo di sintesi permette copolimerizzazione di monomeri diversi al fine di conferire ai prodotti finali le proprietà desiderate.

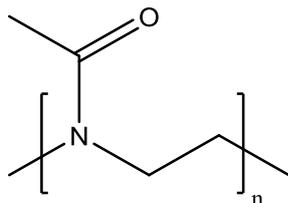


Figura 4.12 Struttura chimica di una poliossazolina (POX).

Le applicazioni in ambito biomedico di questa categoria di polimeri e dei suoi derivati sono in continuo sviluppo [Hoogenboom, 2009]. Copolimeri anfifilici costituiti da poli-2-metilossazoline (PMOXA) e poli-2-butil-2-ossazoline sono stati testati come vettori (*carriers*) di farmaci idrofobici mostrando bassa tossicità, elevata biocompatibilità, buona biodistribuzione e velocità di eliminazione dall'organismo tale da permettere azione biologica specifica senza indurre accumulo negli organi [Luxenhofer, 2010]. Studi di citotossicità *in vitro* mostrano assenza di effetti tossici sui globuli rossi del sangue e confermano l'elevato potenziale di questi materiali in applicazioni biomediche [Bauer, 2013].

Infine, l'*uptake* cellulare delle nanoparticelle polimeriche dipende dal tipo di materiale polimerico utilizzato e la velocità di tale fenomeno varia da polimero a polimero. Ad esempio, rivestimenti di poliisoprene accelerano l'attraversamento della membrana cellulare se confrontati con quelli di polistirene. L'utilizzo di copolimeri permette di modulare la velocità di *uptake* variando le percentuali relative dei monomeri [Mailänder, 2009].

4.3. Strategie di funzionalizzazione

La funzionalizzazione superficiale dei nanosistemi avviene generalmente per scambio dei leganti (*ligand-exchange*) e consiste nella sostituzione dei leganti originari con specie progettate in modo da conferire alla struttura finale le proprietà desiderate. Tecniche alternative che non prevedono scambio sono basate sulla coordinazione di molecole anfifiliche ai leganti posti in superficie mediante interazioni idrofobiche di tipo van der Waals o tramite legami covalenti (Figura 4.13).

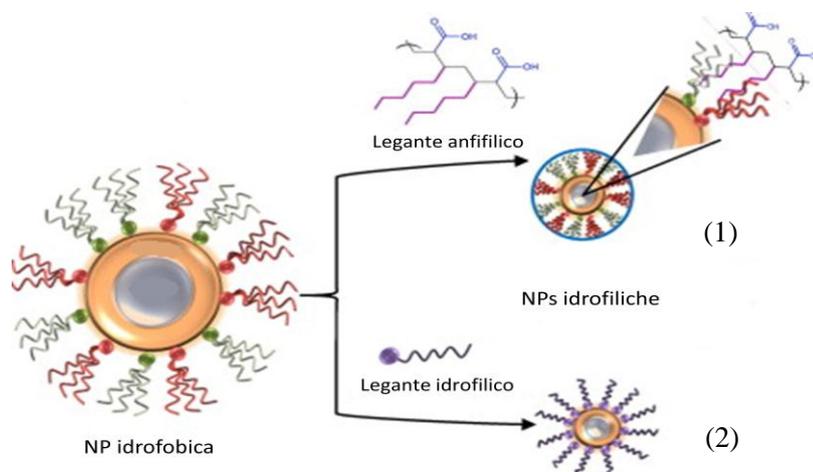


Figura 4.13 Esempi di funzionalizzazione “*non-ligand exchange*” (1) e “*ligand exchange*” (2) dei nanosistemi.

La sintesi delle nanoparticelle può essere condotta in solventi polari o non polari, come descritto nel paragrafo 4.1. In base alle potenziali applicazioni, i prodotti di sintesi spesso necessitano trasferimento da ambiente idrofobico a ambiente idrofilico o viceversa. Molte strategie di funzionalizzazione, utilizzate a tale scopo, prevedono reazioni irreversibili dei leganti con la superficie delle nanoparticelle garantendo completa sostituzione delle molecole superficiali originarie, ma impedendo ulteriori modifiche. Le tecniche che permettono trasferimento di fase reversibile utilizzano leganti sensibili alla temperatura e al pH o capaci di formare complessi *host-guest*. Poiché le proprietà ottiche delle nanoparticelle sono influenzate dalle condizioni sperimentali e queste strategie danno esiti di reversibilità limitati ad un numero ridotto di cicli acqua/solvente, ad esse si preferiscono metodi efficaci a temperatura ambiente e pH neutro. Un esempio [Wei, 2010; Dong, 2010] consiste nella sostituzione del legante originario idrofobico con uno bifunzionale, avente un'estremità affine alla superficie della nanoparticella e l'altra terminante con un gruppo idrofilico. Quest'ultimo, a pH favorevole, determina formazione di una superficie carica negativamente e la successiva ridispersione in solvente non polare è resa possibile dall'aggiunta di un sale caratterizzato da un catione costituito da catene alifatiche (idrofobiche): l'interazione elettrostatica tra il catione salino e la nanoparticella ne determina trasferimento in fase organica (Figura 4.14). Modulando le interazioni elettrostatiche tra le specie introdotte nel sistema, i trasferimenti di fase acqua/solvente e viceversa possono essere ripetuti ciclicamente.

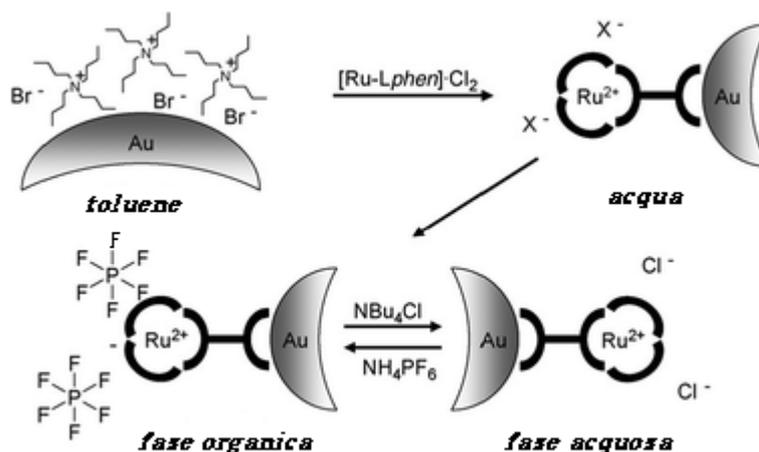


Figura 4.14 Esempio di trasferimento di fase reversibile.

Sono stati formulati protocolli di funzionalizzazione che differiscono principalmente per il numero di stadi che conducono alla formazione della nanoparticella con le nuove caratteristiche superficiali. L'avvenuto scambio dei leganti è facilmente dimostrabile mediante analisi di spettroscopia infrarossa.

4.3.1 Scambio di leganti multistadio

Lo scambio di leganti multistadio è anche detto "*stripping protocol*" (Figura 4.15) in quanto prevede un primo passaggio in cui i leganti adsorbiti originariamente sulla nanoparticella vengono eliminati totalmente mediante opportuni lavaggi. Lo stadio successivo della reazione consiste nell'introduzione del nuovo legante che, non dovendo competere con le molecole originarie, può avere qualsiasi grado di affinità per la superficie.

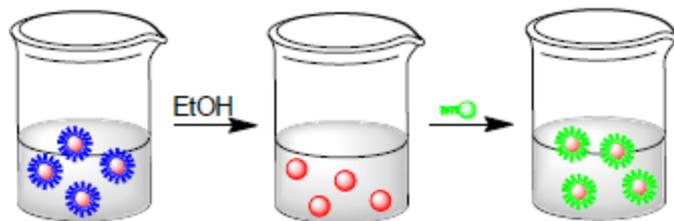


Figura 4.15 Rappresentazione dello scambio di leganti per “*stripping protocol*”.

Eventuali fenomeni di ossidazione o agglomerazione, coinvolgenti le particelle durante l’eliminazione del legante originario, sono generalmente irreversibili.

4.3.2 Scambio di leganti diretto

Lo scambio di leganti diretto (Figura 4.16), invece, è detto “*biphasic protocol*” e consiste nell’aggiunta alla fase organica contenente le nanoparticelle da funzionalizzare, di una soluzione acquosa in cui è disciolto il nuovo legante. Quest’ultimo, poichè deve competere con le molecole originariamente adsorbite sulla superficie delle particelle ed essere in grado di sostituirsi ad esse, viene scelto tra specie aventi gruppi funzionali particolarmente affini alla superficie. Mediante semplice agitazione o sonicazione, le fasi organica e acquosa si mescolano permettendo scambio dei leganti. L’avvenuta funzionalizzazione è, in questo caso, evidente per trasferimento delle nanoparticelle in acqua, mentre le molecole superficiali originarie rimangono nel solvente organico. L’unico svantaggio relativo a quest’approccio riguarda l’impossibilità di essere esteso a tutti i leganti, in quanto questi devono avere affinità per la superficie maggiore di quella delle molecole adsorbite durante la sintesi. Contrariamente a quanto ottenibile con la strategia multistadio, la procedura diretta porta alla formazione di nanoparticelle piccole, monodisperse e caratterizzate da elevata stabilità [Smolensky, 2011].

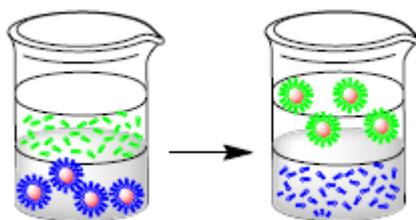


Figura 4.16 Rappresentazione dello scambio di leganti per “*biphasic protocol*”.

Capitolo 5

Risultati sperimentali e discussione

Questo lavoro di tesi ha come obiettivo primario la sintesi di solfuro di rame(II) CuS e solfuro di manganese(II) MnS nanostrutturati mediante miniemulsione inversa per applicazioni in *bioimaging*. Il primo sistema è stato ottenuto sia puro sia drogato con ioni di metalli di transizione (Mn^{2+}) e di lantanidi (Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+}). Per il secondo sistema si è tentata unicamente la sintesi del composto puro senza tuttavia ottenere il risultato desiderato. Come descritto estesamente nel paragrafo 7.1, soluzioni acquose del precursore metallico e del precursore di solfuro sono state disperse in cicloesano e stabilizzate da una miscela di tensioattivi non ionici (Brij-52 e Igepal-CO630). Mantenendo costanti natura e quantità relative della miscela di tensioattivi, fase continua e rapporto acqua/tensioattivi, sono state valutate le conseguenze della variazione di natura chimica e rapporti molari dei precursori sulla composizione e sulla morfologia dei nanosistemi finali.

Inoltre, sono stati analizzati gli effetti delle condizioni di sonicazione sulla stabilità delle miniemulsioni e sulle dimensioni delle gocce di fase dispersa.

Le potenziali applicazioni nel settore biomedico delle nanoparticelle sintetizzate richiede, come ampiamente descritto nel Capitolo 4, i) elevata stabilità colloidale di queste strutture nei confronti dell'agglomerazione, ii) possibilità di dispersione in ambiente fisiologico e iii) capacità di interazione con cellule o tessuti specifici [Gillich, 2013].

Queste proprietà non sono intrinseche delle particelle ottenute mediante la tecnica della miniemulsione, utilizzata in questo lavoro di tesi, e vengono acquisite dalle strutture mediante post-funzionalizzazione della superficie con molecole idrosolubili ad essa affini e covalentemente legate ad un biopolimero di lunghezza variabile.

Lavori di letteratura [Gillich, 2011; Amstad, 2011] riportano la funzionalizzazione di superfici e nanoparticelle di TiO_2 e Fe_3O_4 , con polimeri terminanti con derivati della dopamina, in quanto questa categoria di composti dimostra elevata capacità di adesione superficiale [Waite, 1981] e affinità per gli ossidi metallici [Dalsin, 2005]. Sulla base di questi studi, nel presente progetto di tesi, si è estesa la funzionalizzazione alla superficie di nanoparticelle di ossido di zinco, ZnO, ottenute via miniemulsione in maniera analoga a quelle di CuS. Il polimero scelto per raggiungere tale scopo è la poli(2-metilossazolina) (PMOXA), che presenta come termine della catena un gruppo nitrodopaminico. Quest'ultimo derivato catecolico ha la capacità di formare legami forti con la superficie di ossidi metallici (v. Capitolo 4) e perciò si sostituisce ai tensioattivi superficiali residui conferendo stabilità alle nanostrutture disperse in ambiente fisiologico.

Per applicazioni in campo biomedico, inoltre, i composti utilizzati non devono indurre danni ai tessuti e alle cellule: le nanoparticelle di ZnO sintetizzate possono essere considerate non citotossiche poiché non danneggiano i fibroblasti umani, analizzati mediante test di attività con lattato deidrogenasi (LDH) [Dolcet, 2013] e la categoria delle polimetilossazoline (POX) è definita biocompatibile in quanto studi di citotossicità *in vitro* [Kronek, 2011] dimostrano che questi polimeri non influenzano la crescita e la proliferazione delle cellule. In particolare, la vitalità cellulare rimane invariata dopo periodi di incubazione di 48 h, anche ad alte concentrazioni [Luxenhofer, 2011], indicando non citotossicità. Inoltre, valutando l'*uptake* cellulare [Gaertner, 2007], si osserva che, all'aumentare della massa molecolare del polimero, aumenta il tempo di circolazione nel sangue e, conseguentemente, diminuisce la velocità di escrezione da parte dei reni. Infine, studi di tossicità *in vivo* [Viegas, 2011] sono stati effettuati sulle polietilossazoline (PEOXA): iniezioni intravenose in ratti non inducono

effetti nocivi sulla salute degli animali e nemmeno modificazioni istologiche. Analoghi studi non sono stati condotti sulle PMOXA ma gli esiti ottenuti per PEOXA possono essere estesi anche a queste ultime, in quanto citotossicità e biodistribuzione delle due classi di polimeri sono confrontabili [Luxenhofer, 2011; Gaertner, 2007].

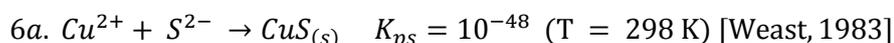
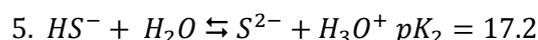
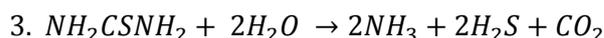
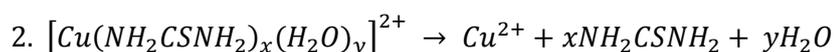
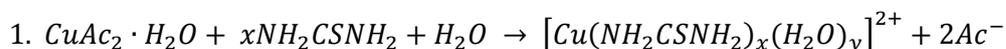
5.1 Sintesi di solfuro di rame puro e drogato con miscela di tensioattivi (Brij-52 e Igepal-CO630)

5.1.1 Natura dei precursori

Come descritto in precedenza (v. Capitolo 2), i solfuri metallici nanostrutturati si ottengono mediante numerose metodologie sintetiche che si differenziano le une dalle altre non solo per la procedura, ma anche per le fonti di metallo e di solfuro utilizzate. Nel presente lavoro di tesi, nanostrutture di CuS sono state ottenute per reazione di precipitazione in spazio confinato a partire da due miniemulsioni, una contenente un sale di rame(II) e l'altra un precursore di solfuro, S^{2-} , come agente precipitante.

Sono state prese in considerazione diverse fonti di rame(II) e di solfuro: come precursori metallici sono stati utilizzati il nitrato, $Cu(NO_3)_2$, e il cloruro, $CuCl_2$, mentre tra le fonti di ioni solfuro sono stati studiati composti organici e inorganici quali la tiourea (NH_2CSNH_2), la tioacetammide (CH_3CSNH_2), l'acido tioacetico (CH_3COSH), il tioglicolato di ammonio ($SHCH_2COONH_4$) e il solfuro di sodio (Na_2S).

Al variare del precursore di ioni solfuro, cambiano i meccanismi di interazione tra i reagenti che influiscono sulla velocità di nucleazione e di crescita dei nanocristalli [Soltani, 2012]. Tutte le fonti di solfuro citate sono state utilizzate in precedenza per la sintesi di nanosistemi di solfuro di rame(II), tranne il tioglicolato di ammonio, da cui sono state ottenute esclusivamente nanoparticelle di solfuro di cadmio (CdS) [Wang, 2011; Pan, 2011]. Il solfuro di sodio è una fonte diretta di ioni S^{2-} e viene ampiamente utilizzato come agente precipitante nella sintesi di solfuri metallici a temperatura ambiente; i composti solforati organici, invece, necessitano di definite condizioni di reazione per rilasciare tali anioni. In letteratura [Dutta, 2008], nanocristalli di CuS sono stati ottenuti a partire da acetato di rame(II) monoidrato ($CuAc_2 \cdot H_2O$) e tiourea (NH_2CSNH_2) in soluzione acquosa. La reazione procede a stadi coinvolgendo una serie di equilibri:



La formazione del prodotto finale per precipitazione può seguire la reazione 6a. o 6b. a seconda delle condizioni sperimentali. La quantità relativa delle specie H_2S , HS^- e S^{2-} in soluzione dipende, infatti, dal pH (Figura 5.1): in ambiente neutro, HS^- è presente al 50% e solo a $pH \geq 9$ diventa la specie prevalente. Nel caso considerato, la precipitazione del solfuro di rame(II) non si osserva per valori di pH inferiori a 8 e nemmeno a temperatura ambiente in quanto l'idrolisi della tiourea (3.), con conseguente rilascio degli ioni S^{2-} , avviene per catalisi basica o per decomposizione termica. La temperatura agisce sulla cinetica della reazione di idrolisi; l'ambiente basico, invece, promuove la formazione di ioni solfuro favorendo la precipitazione di CuS [Zhang, 2011].

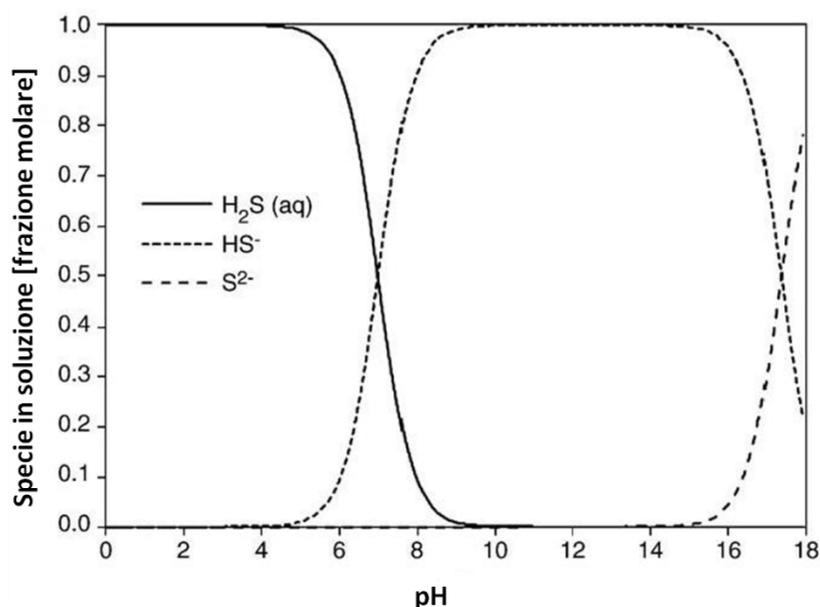
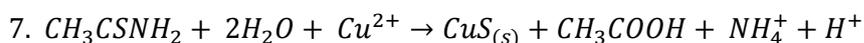
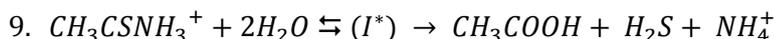
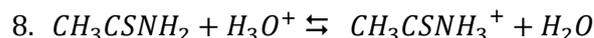


Figura 5.1 Dipendenza dal pH della concentrazione delle specie di solfuro in soluzione [Lewis, 2010].

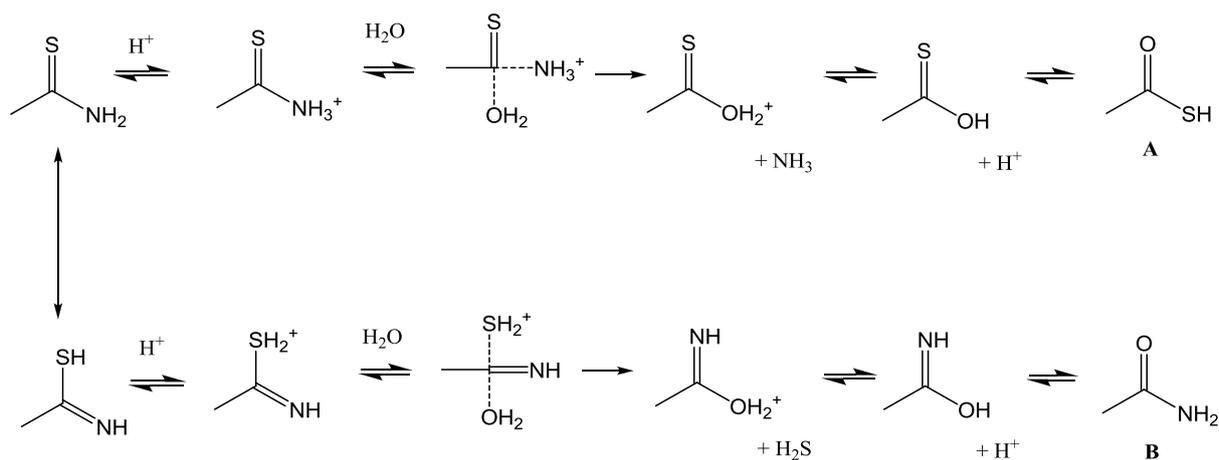
Nanoparticelle, *nanowires* e *nanorods* di CuS sono sintetizzabili anche utilizzando la tioacetammide come fonte di solfuro [Gao, 2004]. La reazione di precipitazione del prodotto finale è data da:



e può avvenire per idrolisi della tioacetammide e conseguente reazione dello ione metallico con H_2S liberato in soluzione o per formazione di intermedi metallo-tioacetammide che successivamente decompongono a solfuro metallico [Rosenthal, 1960]. In entrambi i casi, le reazioni coinvolte risultano favorite da temperature comprese tra 60 e 80 °C e da ambiente acido ($pH < 4$), in quanto, in tali condizioni, l'idrolisi della tioacetammide è accelerata, le collisioni tra le specie interagenti aumentano e i complessi che gli ioni rame(II) formano con la tioacetammide, poichè caratterizzati da interazioni deboli, possono essere facilmente dissociati. La reazione di idrolisi della tioacetammide (8.; 9.) può procedere attraverso due meccanismi competitivi [Rosenthal, 1957], coinvolgenti intermedi diversi (I^*) quali acido tioacetico (Schema 3A) o acetammide (Schema 3B):



In soluzione acquosa, la tioacetammide è presente in due forme tautomeriche: la protonazione da parte dell'acido e il successivo attacco dell'acqua possono interessare entrambe, determinando formazione di uno o dell'altro intermedio (Schema 3).



Schema 3 Formazione dei due intermedi di reazione a partire dalle due forme tautomeriche della tioacetammide.

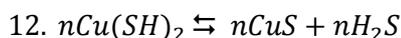
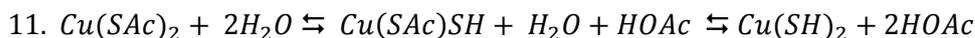
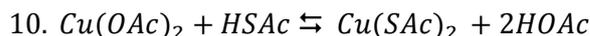
L'idrolisi della tioacetammide segue una legge cinetica del secondo ordine globale in quanto di primo ordine in tioacetammide e ioni H_3O^+ [Nomura, 2000; Houšková, 2007]:

$$-\frac{d[\text{CH}_3\text{CSNH}_2]}{dt} = k[\text{H}_3\text{O}^+][\text{CH}_3\text{CSNH}_2]$$

con costante di velocità k pari a $1.95 \cdot 10^9 e^{-\frac{8.17 \cdot 10^4}{RT}} \text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$.

In base alla temperatura e al pH dell'ambiente di reazione, la velocità di rilascio di ioni S^{2-} in soluzione cambia e la precipitazione del solfuro di rame(II) avviene quando $[\text{S}^{2-}][\text{Cu}^{2+}] = K_{\text{ps}}$.

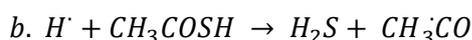
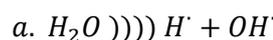
Dalla reazione di acido tioacetico, HSAC, e carbossilato (acetato o propionato) di rame(II), $\text{Cu}(\text{OOR})_2$, in presenza di acqua, usando come solventi i corrispondenti acidi carbossilici (acetico o propionico) sono stati ottenuti nanoparticelle e film sottili di CuS [Armelaio, 2006]:



L'acido tioacetico, in questo caso, non fornisce al sistema ioni solfuro, ma induce la formazione di un complesso rame(II)-tioacetato che decompone dando il solfuro metallico. L'utilizzo di acidi carbossilici come solventi permette di condurre la sintesi in ambiente acido, promuovendo la nucleazione delle nanostrutture e rallentandone la crescita.

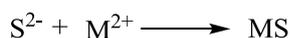
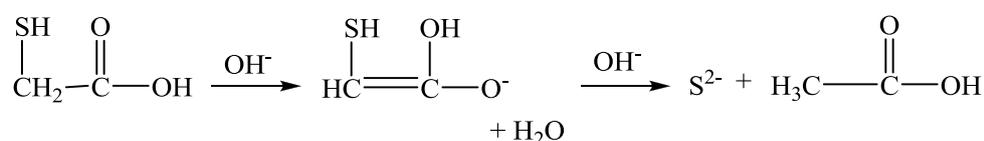
Quest'ultima risulta ulteriormente controllata dall'elevata viscosità del mezzo, che riduce le collisioni tra le particelle in sospensione.

Esempi di sintesi di solfuri metallici nanostrutturati (MoS_2 , Ag_2S) usando come reagenti acido tioacetico e soluzioni acquose di sali metallici sono riportati in letteratura [Sostaric, 1997; Uzcanga, 2005; Emadi, 2011]. In entrambi i casi, la procedura sintetica prevede l'utilizzo degli ultrasuoni; l'idrolisi dell'acido tioacetico a H_2S e CH_3COOH (Schema 4) risulta, così, indotta dai radicali primari $\text{H}\cdot$ prodotti dalla decomposizione dell'acqua, resa possibile dalle condizioni di elevata temperatura e elevata pressione che si generano all'interno delle bolle di cavitazione.



Schema 4 Produzione di H_2S da acido tioacetico per attacco radicalico.

Infine, l'utilizzo del tioglicolato di ammonio come fonte di ioni solfuro è piuttosto limitato in quanto si preferisce ad esso l'acido tioglicolico. Quest'ultimo viene aggiunto ad una soluzione acquosa di un sale metallico e, in condizioni alcaline (pH 11), risulta doppiamente deprotonato favorendo il rilascio di ioni S^{2-} che reagiscono con i cationi metallici (M^{2+}) a formare i solfuri nanostrutturati (MS) (Schema 5).



Schema 5 Precipitazione di solfuri metallici da decomposizione di acido tioglicolico.

Se l'utilizzo di uno o dell'altro sale metallico non influisce sulla formazione del solfuro di rame(II) nanocristallino, la scelta della fonte di solfuro è invece un fattore determinante la composizione, la purezza e la cristallinità del prodotto finale di precipitazione. In particolare, nelle condizioni di reazione utilizzate, il solfuro di sodio, la tioacetammide e l'acido tioacetico risultano i migliori donatori di solfuro. Il tioglicolato di ammonio non rilascia ioni S^{2-} e, dall'analisi di diffrazione da raggi X del prodotto di precipitazione ottenuto da un singolo esperimento effettuato aggiungendo la miniemulsione di tioglicolato ad una di nitrato di rame(II) e sonicando l'emulsione finale, non è stato possibile risalire alla composizione. Nella tabella 5.1 sono riassunti i vari esperimenti condotti, con i relativi esiti.

Esperimento	Precursore Cu ²⁺	Precursore S ²⁻	Prodotto di precipitazione	Fase/i cristallina/e	Dimensione media dei cristalliti
<i>CuS_1</i>	Cu(NO ₃) ₂	Na ₂ S	CuS	covellite	14 nm
<i>CuS_2</i>		CH ₃ CSNH ₂	CuS	covellite	13 nm
<i>CuS_3</i>		CH ₃ COSH	CuS	covellite	15 nm
<i>CuS_4</i>		SHCH ₂ COONH ₄	-	non identificabile	-
<i>CuS_5</i>		NH ₂ CSNH ₂	-	non identificabile	-
<i>CuS_6</i>	CuCl ₂	Na ₂ S	CuS	covellite	12 nm
<i>CuS_7</i>		CH ₃ CSNH ₂	-	coesistenza di covellite con altre fasi	-

Tabella 5.1 Nanosistemi sintetizzati al variare della natura dei precursori di rame(II) e di solfuro.

La reazione del sale metallico con la tiourea porta invece alla precipitazione di un composto di colore diverso dalle aspettative, contenente residui di reagente evidenziati da spettroscopia FT-IR e non identificabile per diffrazione da raggi X. L'idrolisi della tiourea risulta inibita dall'utilizzo di precursori di rame(II), quali Cu(NO₃)₂ e CuCl₂, che creano ambiente sfavorevole (pH pari a 2.5-3.0) al rilascio degli ioni solfuro e impediscono la formazione del prodotto desiderato [Kristl, 2013]. I prodotti sintetizzati usando come precursori metallici Cu(NO₃)₂ e CuCl₂ e come agente precipitante solfuro di sodio (CuS_1 e CuS_6), isolati dalla sospensione ed accuratamente lavati, sono stati analizzati mediante diffrazione da raggi X (XRD) per valutare la formazione del solfuro e l'eventuale struttura cristallina. Dai diffrattogrammi riportati in Figura 5.2 si osservano i riflessi caratteristici del solfuro di rame(II) in forma di covellite (PDF N. 00-001-1281; 2θ = 27.3, 29.5, 31.8, 48.1, 52.9, 59.2). L'assenza di riflessi attribuibili ad altre forme cristalline è indice di purezza del composto ottenuto. Mediante miniemulsione è quindi possibile ottenere composti cristallini a temperatura ambiente e le dimensioni medie dei cristalliti sono calcolabili dai dati XRD mediante formula di Scherrer applicata al riflesso avente intensità massima (110) e risultano 12 nm per il sistema ottenuto da cloruro di rame(II) e 14 nm per il prodotto sintetizzato da nitrato di rame(II).

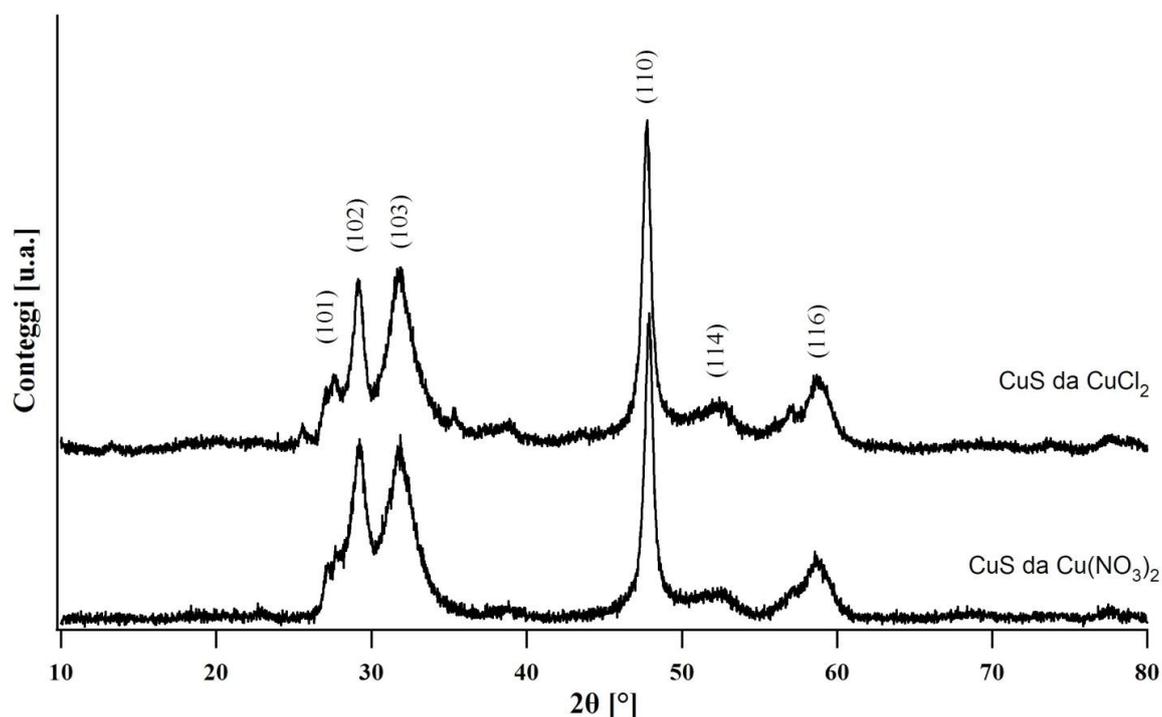


Figura 5.2 Diffratogrammi di CuS ottenuto via miniemulsione a partire da nitrato di rame(II) (CuS_1) e da cloruro di rame(II) (CuS_6) e da Na_2S .

Analogamente, dalle analisi XRD dei prodotti sintetizzati a partire da $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ usando come fonte di solfuro tioacetammide, solfuro di sodio e acido tioacetico (Figura 5.3) si confermano la purezza e la forma cristallina (covellite) del composto ottenuto. I riflessi a valori di 2θ inferiori a 27.3° , osservabili unicamente nel diffratogramma relativo al prodotto derivato dall'acido tioacetico (CuS_3), non rappresentano impurezze in quanto riscontrabili nella covellite (PDF N. 00-001-1281). Le dimensioni medie dei cristalliti, calcolate mediante formula di Scherrer, sono pari a 13 nm, 14 nm e 15 nm usando rispettivamente tioacetammide, solfuro di sodio e acido tioacetico.

Il prodotto ottenuto usando come precursore del metallo CuCl_2 e come fonte di solfuro la tioacetammide (CuS_7) non è invece puro: i riflessi relativi alla covellite sono identificabili dal diffratogramma (Figura 5.4), ma si osserva coesistenza di fasi cristalline diverse, quindi la covellite non è l'unico prodotto della reazione.

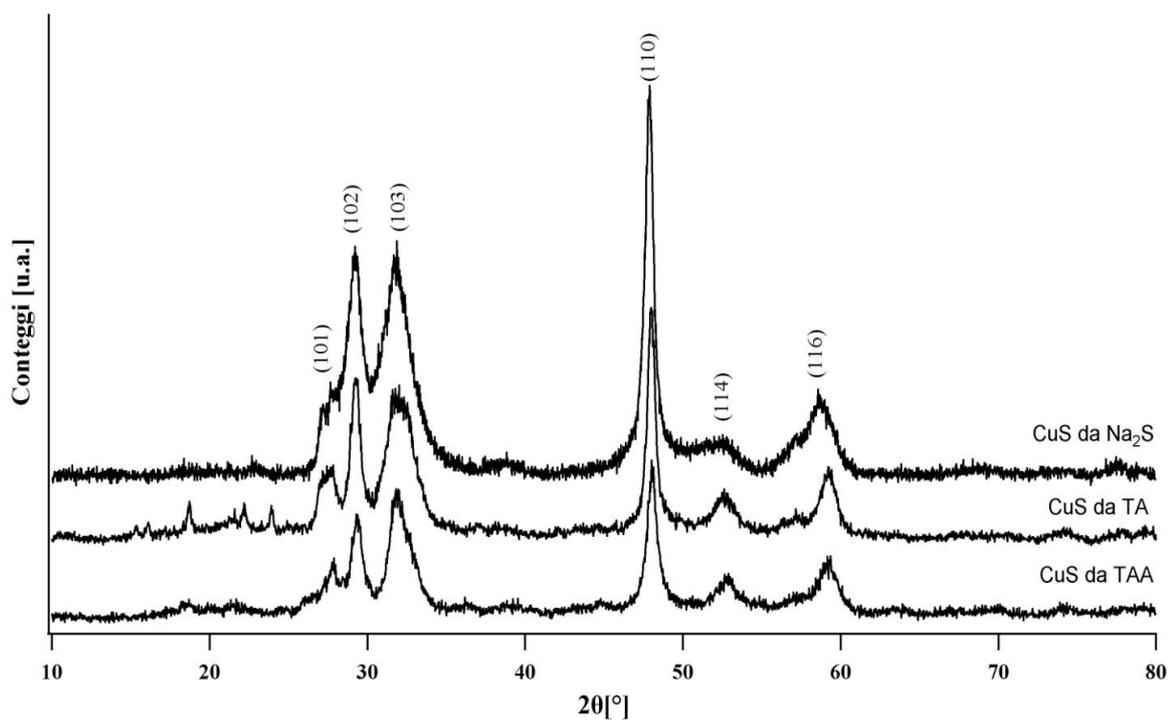


Figura 5.3 Diffratogrammi di CuS ottenuto via miniemulsione a partire da solfuro di sodio (CuS_1), da acido tioacetico (TA) (CuS_3) e da tioacetammide (TAA) (CuS_2) come fonti di solfuro e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ come precursore di rame(II).

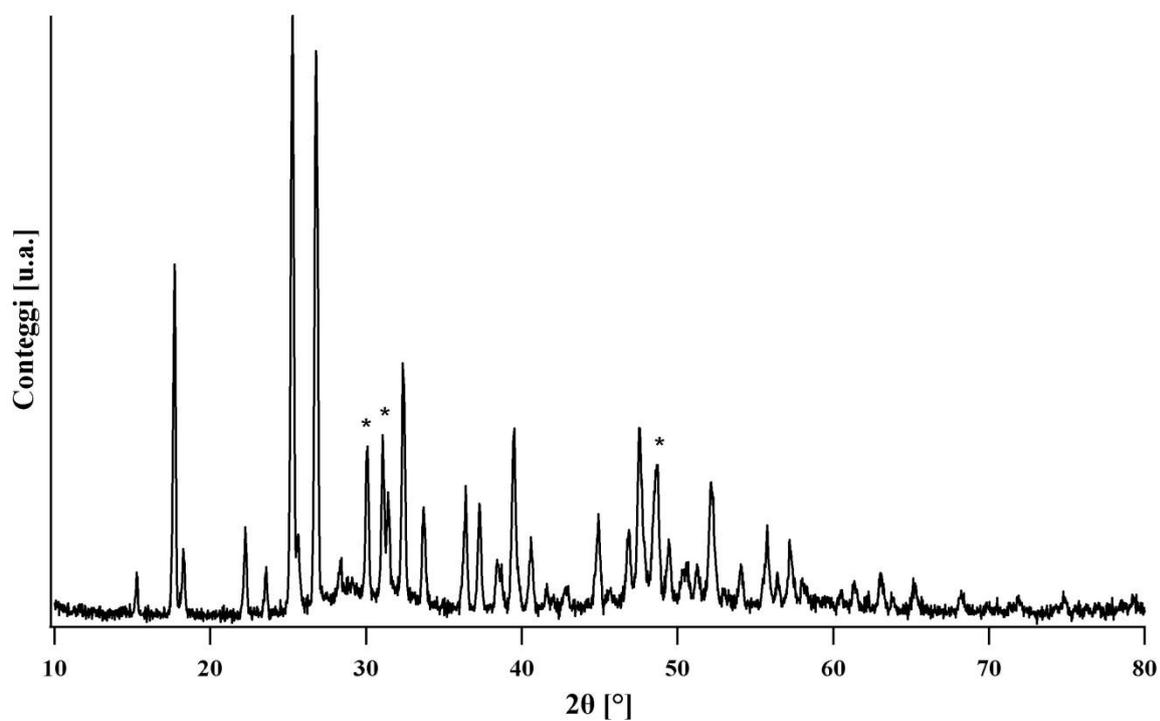


Figura 5.4 Diffratogramma del prodotto sintetizzato a partire da CuCl_2 e tioacetammide (CuS_7) (* = covellite).

In Figura 5.5 sono riportati i diffrattogrammi dei nanosistemi di solfuro di rame(II) sintetizzati usando come precursori $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e Na_2S e drogati con ioni dei lantanidi e dei metalli di transizione (Tabella 5.2).

Esperimento	Precursore Cu^{2+}	Drogante	Precursore S^{2-}	Prodotto di precipitazione	Fase/i cristallina/e	Dimensione media dei cristalliti
<i>CuS_8</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Eu(III)	Na_2S	CuS:Eu (50:1)	covellite	14 nm
<i>CuS_9</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Mn(II)	Na_2S	CuS:Mn (50:1)	covellite	12 nm
<i>CuS_10</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Sm(III)	Na_2S	CuS:Sm (50:1)	covellite	12 nm
<i>CuS_11</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Tb(III)	Na_2S	CuS:Tb (50:1)	covellite	10 nm
<i>CuS_12</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Gd(III)	Na_2S	CuS:Gd (50:1)	covellite	12 nm

Tabella 5.2 Nanosistemi drogati con ioni dei metalli di transizione e dei lantanidi sintetizzati.

Gli ioni droganti non alterano la struttura cristallina dei sistemi, che conservano la forma di covellite con dimensione media dei cristalliti compresa tra 10 e 14 nm.

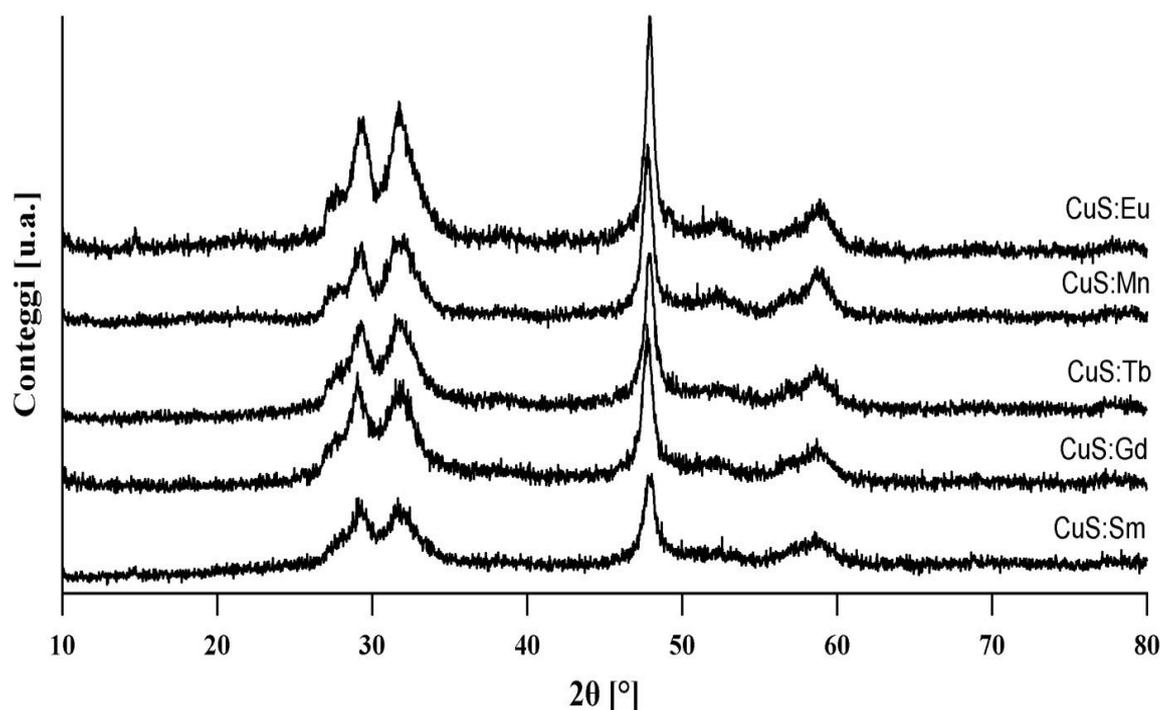


Figura 5.5 Diffrattogrammi di CuS:M ottenuto via miniemulsione con $\text{M} = \text{Sm}^{3+}$ (CuS_{10}), Eu^{3+} (CuS_8), Gd^{3+} (CuS_{12}), Tb^{3+} (CuS_{11}), Mn^{2+} (CuS_9).

Per ottenere informazioni sulle dimensioni delle nanogocce disperse, le sospensioni di solfuro di rame(II) puro e drogato con europio(III) in cicloesano sono state analizzate mediante misure DLS (*Dynamic Light Scattering*). Il diametro idrodinamico medio delle nanoparticelle risulta paragonabile nei due campioni, in quanto pari a 376 ± 34 nm per CuS_1 e a 398 ± 43 nm per CuS_8 , dove l'errore è dato dalla deviazione standard (Figura

5.6). Tali valori non sono confrontabili con quanto ricavato dai dati XRD mediante calcolo delle dimensioni medie dei cristalliti: la misura DLS, infatti, viene condotta sulla sospensione appena ottenuta e fornisce la dimensione media del diametro idrodinamico della goccia dispersa comprensiva dello strato di tensioattivo, mentre la diffrazione da raggi X si effettua sul precipitato, in seguito a lavaggio ed essiccazione e fornisce le dimensioni medie dei singoli cristalliti.

Le particelle in sospensione sono stabilizzate dalla miscela di Brij-52 e Igepal-CO630: il valore ricavato dalla misura è attendibile in quanto il diametro idrodinamico medio si riferisce alla goccia comprensiva del guscio di tensioattivi.

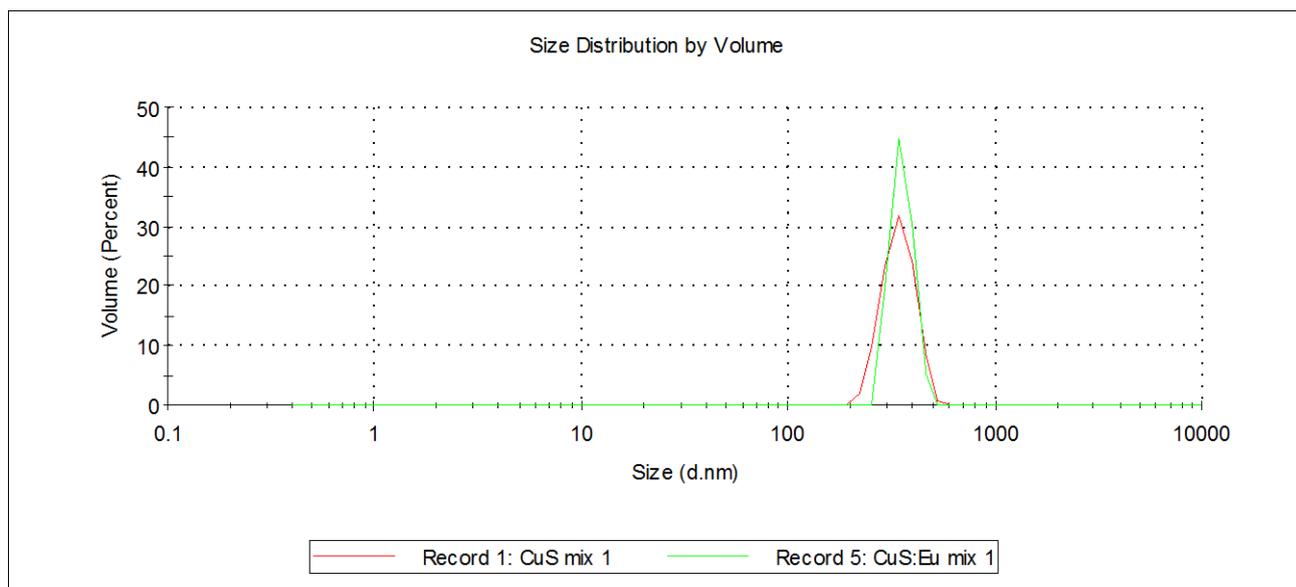


Figura 5.6 Grafico DLS relativo ai prodotti CuS_1 e CuS_8 ottenuti via miniemulsione.

Analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) sono state condotte sui campioni sintetizzati per ottenere informazioni sulla composizione atomica superficiale dei nanosistemi e sull'intorno chimico e lo stato di ossidazione degli elementi costituenti. Nelle figure 5.7 e 5.8 sono riportati gli spettri di insieme (*survey spectra*) del solfuro di rame(II) rispettivamente puro e drogato con Eu^{3+} (CuS_1 e CuS_8).

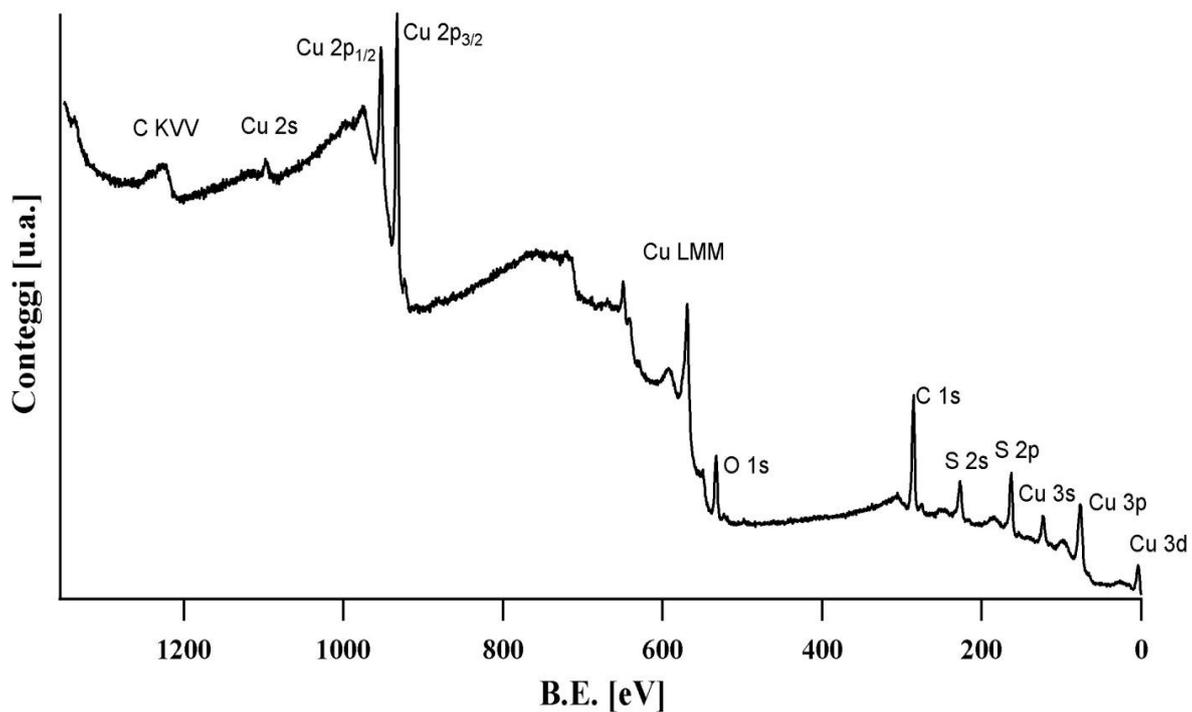


Figura 5.7 Spettro di *survey* (corretto per sottrazione della carica superficiale) delle nanoparticelle di solfuro di rame(II) (CuS₁) ottenute via miniemulsione.

La presenza dei picchi attribuibili a C1s e O1s va ascritta alla presenza dei tensioattivi (polieteri organici), utilizzati durante la sintesi e che rimangono fisisorbiti sui sistemi finali.

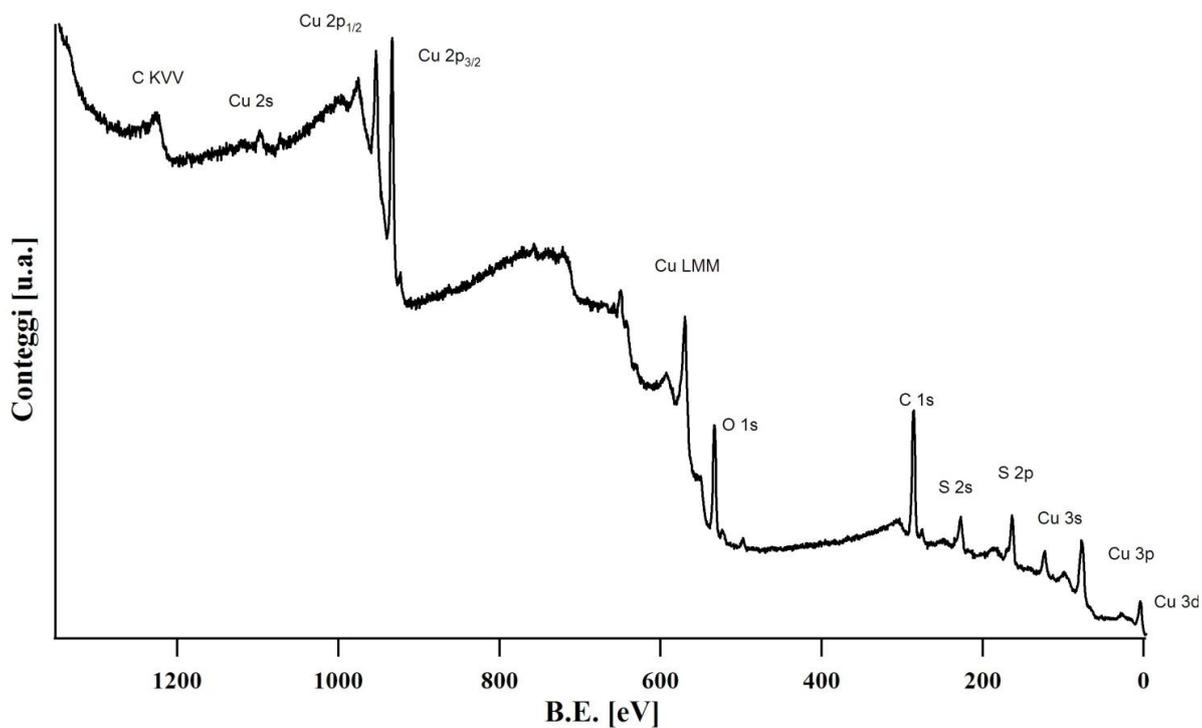


Figura 5.8 Spettro di *survey* (corretto per sottrazione della carica superficiale) delle nanoparticelle di solfuro di rame(II) drogato con europio ottenute via miniemulsione.

Si è quindi proceduto ad acquisire spettri dettagliati delle regioni di interesse (S2p, O1s, C1s, Cu2p, CuLMM) al fine di determinare le energie di legame e le percentuali atomiche dei singoli elementi. Nella regione dello spettro relativa a S2p (Figura 5.9) si osservano due picchi di cui uno costituito da due componenti ricavabili per deconvoluzione e attribuibili alle specie S^{2-} (161.7-161.9 eV) e S_2^{2-} (163.0-163.5 eV) [Briggs, 2003], entrambi previsti considerando la struttura della covellite (v. paragrafo 2.1.1) e l'altro (168.3-168.5 eV) relativo allo stato di ossidazione VI dello zolfo [Moulder, 1992]. Dal calcolo dei rapporti tra le aree delle singole componenti, essendo queste proporzionali alla percentuale atomica delle specie considerate, si ricava che $S^{VI}:S^{2-}$ è pari a 1:5. Tale evidenza è indice di ossidazione del solfuro di rame(II) sintetizzato a $CuSO_4$, ma tale fenomeno è esclusivamente superficiale o dovuto alla presenza di una fase amorfa di tale composto, in quanto dai dati XRD non emergono riflessi riconducibili a forme cristalline di solfato di rame.

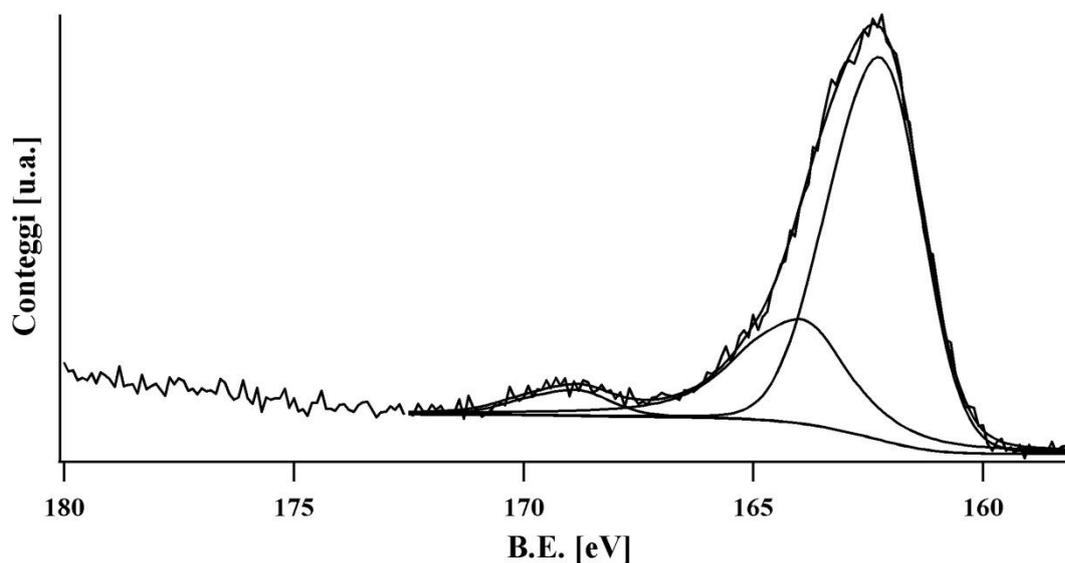


Figura 5.9 Regione relativa a S2p del campione di solfuro di rame(II) CuS_1.

I picchi osservabili nella regione compresa tra 930 e 960 eV (Figura 5.10) sono attribuibili a Cu2p e hanno energia di legame ($2p_{1/2}$: 952.0 eV e $2p_{3/2}$: 932.0 eV) confrontabile con quella riportata in letteratura [Moulder, 1992] per il solfuro di rame(II). I picchi satelliti, collocati generalmente a valori di energia di legame maggiori di circa 9 eV rispetto alle componenti principali dello *splitting* spin-orbita e caratteristici della presenza di rame(II) ($3d^9$) [Kim, 1974], non sono osservabili. In letteratura, tale evidenza sperimentale è giustificata dalla struttura cristallina della covellite, in cui il rame esiste in stato di ossidazione sia (I) che (II). [Wei Goh, 2006].

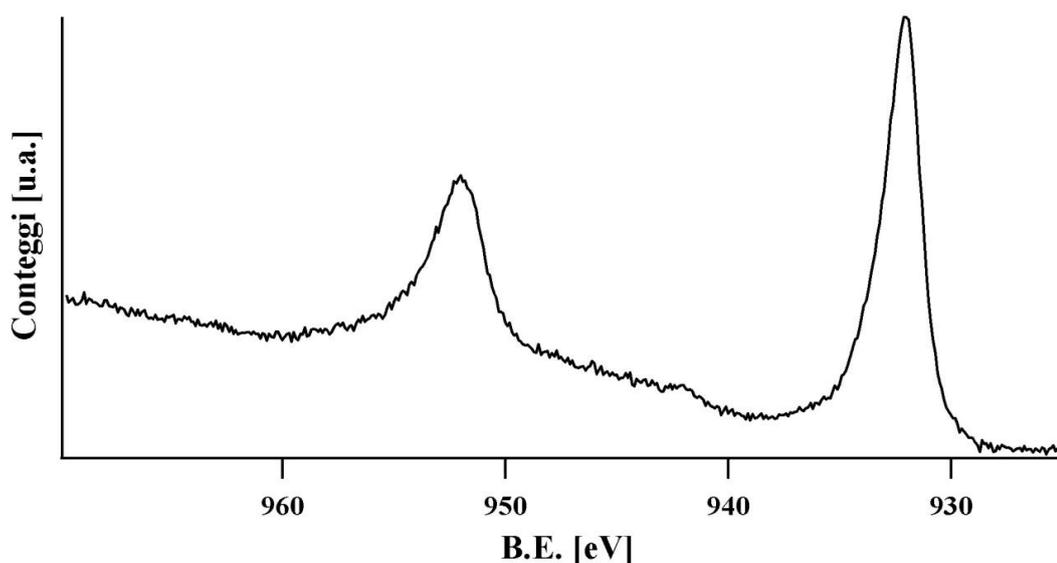


Figura 5.10 Regione relativa a Cu2p del campione di solfuro di rame(II) CuS_1.

La formazione del solfuro di rame(I) Cu₂S e dell'ossido di rame(II) CuO si può escludere calcolando il parametro Auger α per la sorgente Al K _{α} ($h\nu = 1486.6$ eV) [Gross, 2010]:

$$\alpha = BE_{Cu2p_{3/2}} + (1486.6 - BE_{Auger}).$$

Per i nanosistemi sintetizzati di solfuro di rame(II) puro e drogato (CuS_1 e CuS_8) i parametri α sperimentali sono rispettivamente pari a 1850.3 eV e 1850.2 eV, in accordo con quanto previsto dalla letteratura per CuS ($\alpha = 1850.1$ -1850.5 eV). I valori tabulati per il rame in Cu₂S e CuO sono invece 1849.6-1849.9 eV e 1851.2-1851.7 eV [NIST-XPS Database].

La determinazione della percentuale atomica dei campioni analizzati (Tabella 5.3) mostra risultati in accordo con la stechiometria attesa del prodotto finale (Cu:S ~ 1); la prevalenza del carbonio sugli altri elementi è attribuibile non soltanto alla presenza del tensioattivo, ma anche ad effetti di contaminazione superficiale, alla quale si possono ascrivere anche le percentuali di ossigeno.

	%O	%Cu	%C	%S	Cu/S
CuS	15.3	6.3	71.7	6.7	0.9
CuS:Eu	23.0	6.7	64.3	6.0	1.1

Tabella 5.3 Percentuali atomiche dei campioni CuS e CuS:Eu.

Inoltre è stato analizzato un campione di solfuro di rame(II) drogato, senza riuscire a rivelare la presenza del drogante. Esso dovrebbe essere in rapporto atomico nominale 1:50 rispetto al rame(II) e la percentuale atomica relativa risulta inferiore allo 0.2%, che è la percentuale al limite della rivelabilità dell'XPS. L'avvenuto drogaggio delle nanoparticelle è tuttavia confermato dalle analisi ICP condotte su tutti i campioni drogati, i cui risultati sono riportati in tabella 5.4 e dimostrano eccellente corrispondenza tra dato atteso e dato sperimentale, confermando l'efficacia del protocollo sperimentale nell'ottenere nanostrutture con drogaggio controllato.

Composizione campione	Rapporto atomico nominale	Rapporto atomico sperimentale (IC 95%)
CuS:Eu	50:1	49.6 ± 3.5
CuS:Sm	50:1	51.6 ± 3.7
CuS:Tb	50:1	50.2 ± 4.1
CuS:Mn	50:1	47.9 ± 4.8
CuS:Gd	50:1	47.9 ± 4.8

Tabella 5.4 Risultati analisi ICP sui campioni di solfuro di rame(II) drogati con ioni dei lantanidi e dei metalli di transizione. (Intervallo di confidenza al 95%).

Le proprietà di assorbimento ed emissione di tutti i campioni di solfuro di rame(II) drogato sono state infine studiate con misure di fotoluminescenza, effettuate dalla sottoscritta presso il Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona. Le bande caratteristiche dei lantanidi non sono osservabili e gli spettri di emissione e di eccitazione, riportati in figura 5.11, presentano tutti una banda larga, centrata a 365 nm, in emissione e una, centrata a 323 nm, in eccitazione. Tali bande sono attribuibili al solfuro di rame(II) nanocristallino, in quanto esso emette nell'UV [Jiang, 2000] e le stesse bande sono riscontrabili negli spettri del campione di CuS puro, riportati in alto in figura 5.11.

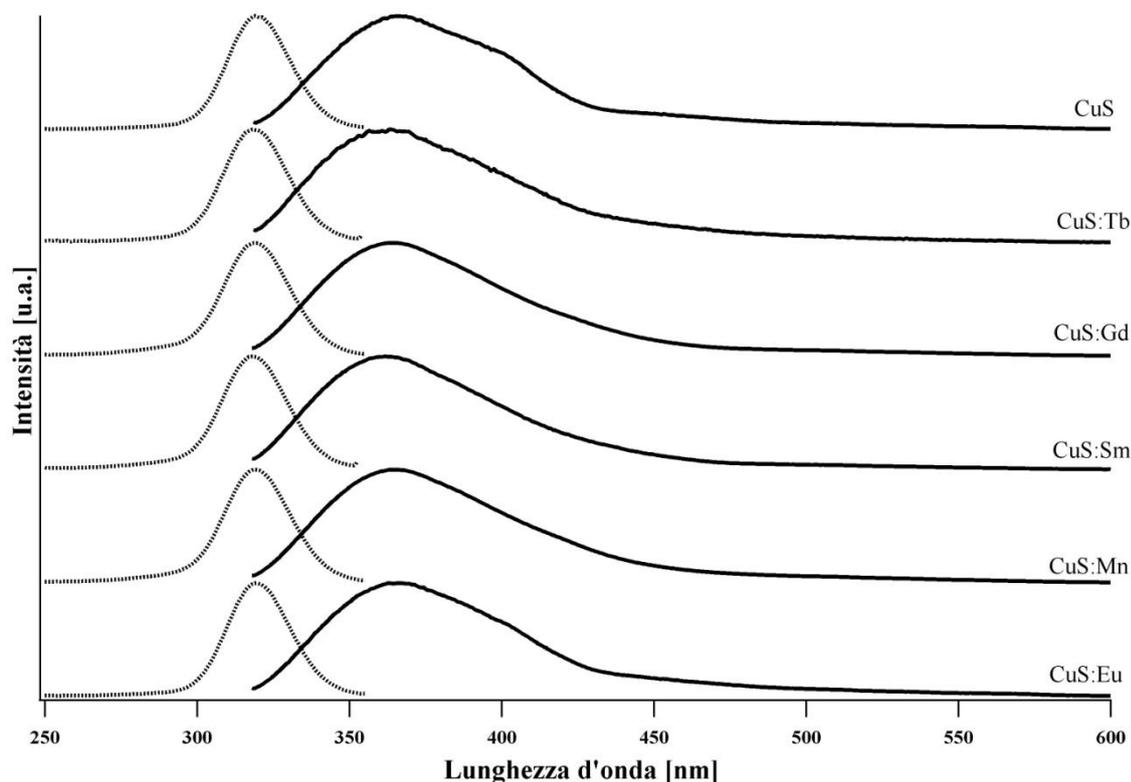


Figura 5.11 Spettri di fotoluminescenza in emissione e in eccitazione di CuS puro e drogato.

I risultati ottenuti possono essere plausibilmente ascritti al forte assorbimento intrinseco del CuS, dovuto al colore scuro. Tuttavia, come evidenzia la letteratura [Ku, 2012], il CuS può assorbire anche nel NIR (800-1100 nm) e il massimo di assorbimento dipende, come atteso, dalle dimensioni delle nanostrutture. Di conseguenza, per i sistemi ottenuti in questa tesi, sarebbe necessaria un'ulteriore caratterizzazione delle proprietà di assorbimento ed emissione in quella regione spettrale. Inoltre l'eventuale drogaggio con ioni dei lantanidi quali Ho, Nd, Tm, Er e Yb, che emettono nel NIR, conferirebbe alle nanostrutture proprietà

di luminescenza tali da renderle potenziali marcatori per il *bioimaging in vivo*. Tali sistemi andrebbero ottimizzati opportunamente, in termini di quantità di drogante e caratteristiche della matrice, in modo da bilanciare l'assorbimento di CuS e l'emissione dei lantanidi considerati. Per quanto concerne invece l'assorbimento e l'emissione nell'UV, riscontrati nei campioni sintetizzati, essi prospettano la potenziale applicazione di tali nanosistemi nel *bioimaging in vitro*.

La presenza di tensioattivi sulla superficie delle nanoparticelle, evidenziata dai dati XPS, è confermata da analisi di spettroscopia infrarossa (FT-IR) condotte sui campioni sintetizzati, mentre una determinazione quantitativa è resa possibile da analisi termogravimetriche (TGA).

In figura 5.12 si riporta un esempio di spettro FT-IR del solfuro di rame(II) nanocristallino CuS_1 ottenuto mediante la tecnica della miniemulsione, confrontato con lo spettro FT-IR del tensioattivo Brij-52. Il secondo tensioattivo (Igepal-CO630) non viene rappresentato in figura 5.12 perché le bande relative alle vibrazioni caratteristiche dei polietere sono confrontabili.

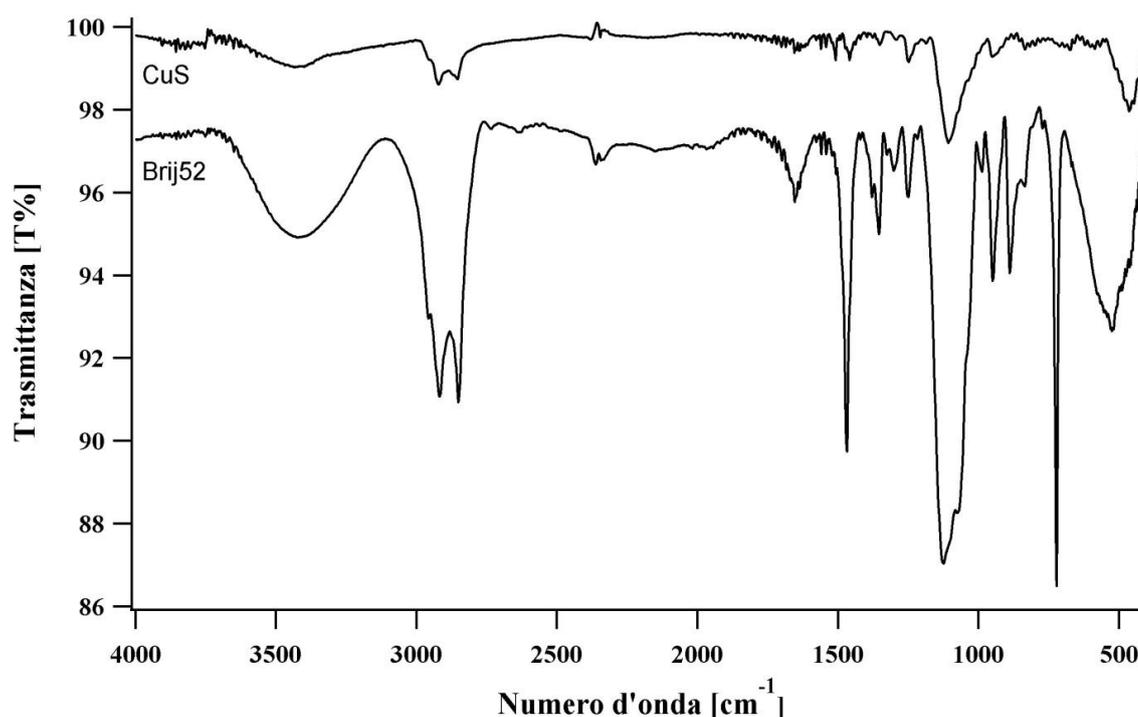


Figura 5.12 Spettri FT-IR delle nanoparticelle di solfuro di rame(II) (CuS_1) sintetizzate via miniemulsione e del tensioattivo Brij-52.

La banda allargata intorno ai 3400 cm⁻¹ è attribuibile allo stiramento del legame O-H riscontrabile sia nell'H₂O adsorbita, sia nei gruppi ossidrilici dei tensioattivi; i picchi che cadono tra i 2960 e i 2850 cm⁻¹ sono relativi alle vibrazioni di *stretching* dei legami C-H metilici e metilenici della catena alifatica del tensioattivo e quelli osservabili nella regione dello spettro compresa tra i 1470 e i 1250 cm⁻¹ sono caratteristici delle vibrazioni di *bending* simmetrico e asimmetrico degli stessi legami C-H. Infine, la banda intensa a 1100 cm⁻¹ è dovuta allo *stretching* asimmetrico del gruppo C-O-C del polietere [Silverstein, 2006].

L'intervallo di misura, compreso tra i 400 e i 4000 cm⁻¹, non include i numeri d'onda di stiramento dei legami Cu-S. La spettroscopia FT-IR, in questo caso, fornisce unicamente

informazioni sui tensioattivi adsorbiti. Dal confronto dei due spettri in figura 5.12 si osserva corrispondenza tra i due composti; ciò, unitamente a quanto ottenuto dai risultati delle analisi XPS, permette di concludere che i tensioattivi utilizzati durante la sintesi sono presenti nel prodotto finale, adsorbiti sulla superficie dei nanosistemi.

La quantità di tensioattivi adsorbita sulla superficie delle nanoparticelle viene determinata mediante analisi termogravimetrica e calorimetria a scansione differenziale (TGA-DSC). Dai risultati riportati in figura 5.13 si può concludere che il campione analizzato diminuisce in massa del 4% fino a circa 150°C per evaporazione dell'acqua adsorbita sulla superficie e l'ulteriore perdita di massa, pari al 25% circa, è attribuibile alla decomposizione della miscela di tensioattivi.

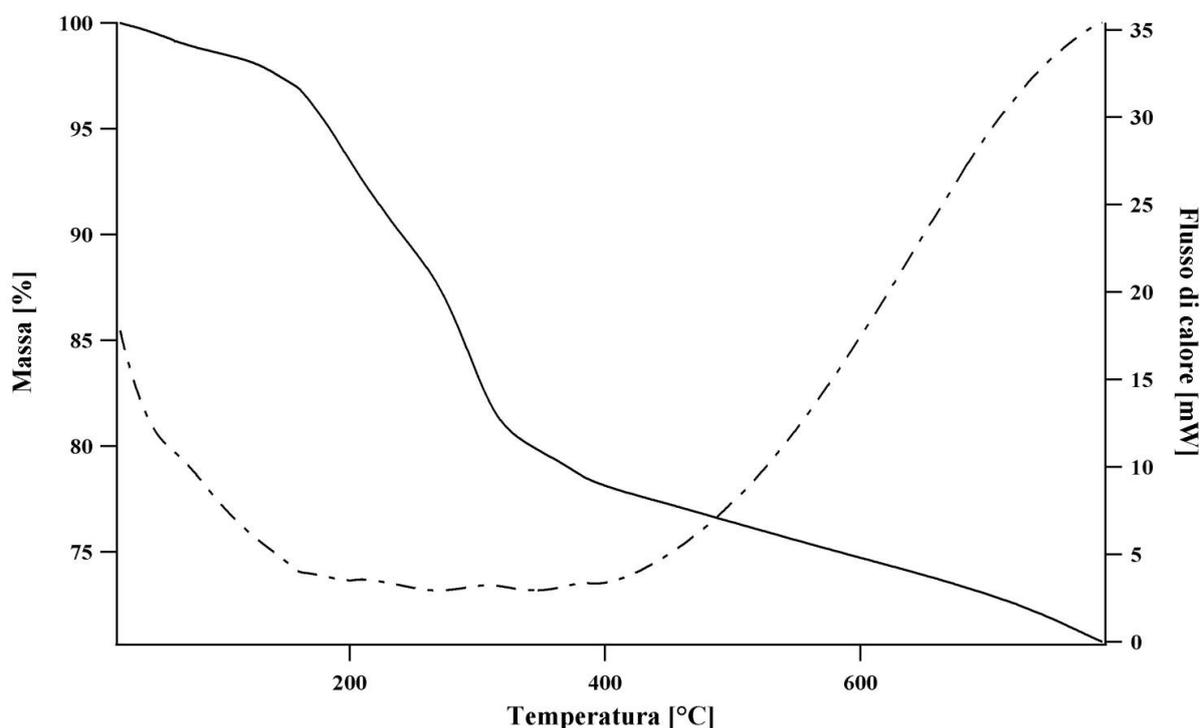


Figura 5.13 Curve TGA-DSC del campione di CuS_1 sintetizzato via miniemulsione.

Infine, da analisi di microscopia a trasmissione di elettroni (TEM), condotte sui campioni CuS_1, CuS_8 e CuS_9, in seguito a lavaggi e calcinazione, è possibile ricavare informazioni sulla morfologia, sulle dimensioni, sulla struttura cristallina e sugli eventuali difetti dei materiali sintetizzati. In accordo con i dati XRD, la fase cristallina predominante in tutti e tre i campioni è la covellite e dalle immagini TEM, riportate in figura 5.14, si possono osservare morfologie *needle-like* per CuS_1 e *rod-like* per CuS_8. Il campione CuS_9, invece, è caratterizzato da grani allungati inglobati in una fase amorfa. L'identificazione di tale fase è difficile, in quanto la presenza di materiale amorfo non è rivelabile mediante XRD e ulteriori analisi su tale campione non sono state effettuate.

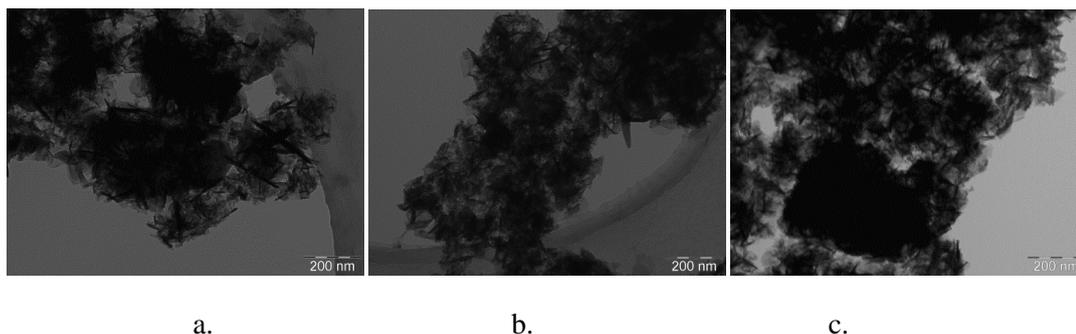


Figura 5.14 Immagini TEM dei campioni CuS_1 (a.), CuS_8 (b.) e CuS_9 (c.).

Sebbene la fase cristallina principale sia la covellite, le immagini di diffrazione SAED mostrano la presenza di componenti amorge anche nel campione CuS_8. Poiché i riflessi più intensi di CuO, in forma di tenorite, sono sovrapposti alla zona amorfa, quest'ultima potrebbe essere attribuita alla presenza di tale composto. Le analisi XPS, condotte su CuS_8, non confermano tale presenza in quanto i valori del parametro Auger escludono la formazione di CuO. Inoltre, nello spettro Raman, riportato in figura 5.15, non sono identificabili altre bande, oltre a quella relativa allo stretching S-S che cade a 474 cm^{-1} ed è relativa alla vibrazione del legame S-S degli ioni S_2^{2-} appartenenti al sito tetraedrico CuS_4 della covellite [Thongtem, 2007].

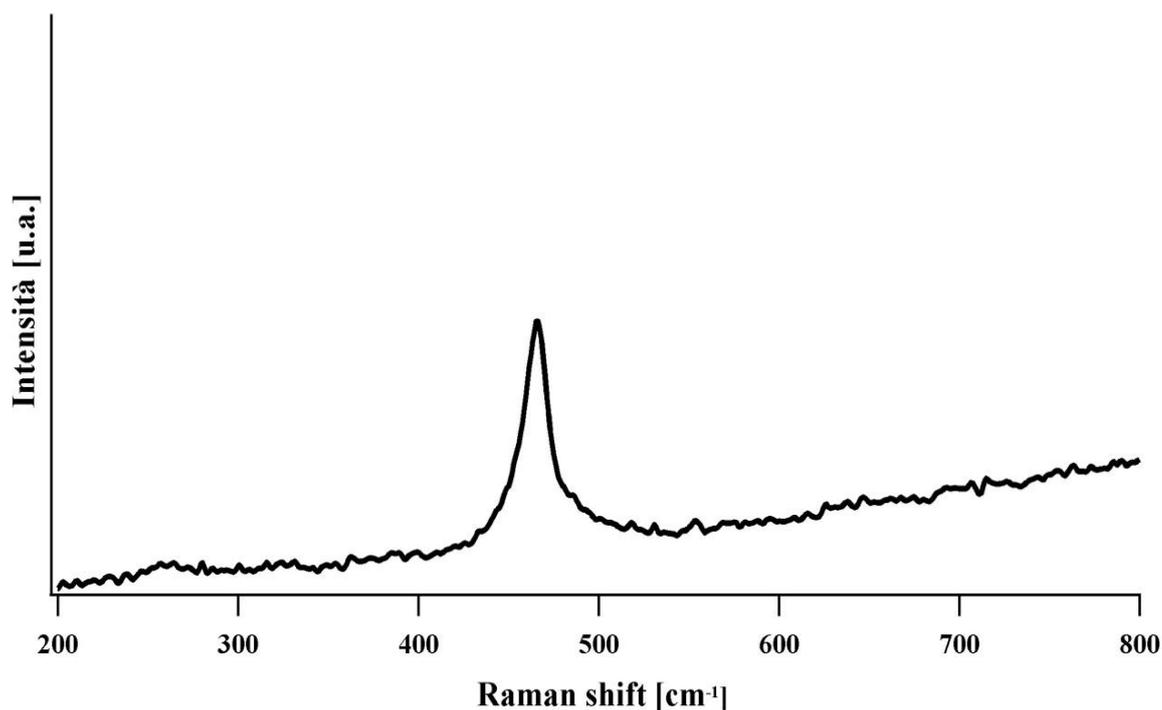


Figura 5.15 Spettro Raman del campione CuS_8.

La componente amorfa potrebbe essere dovuta al solfato di rame(II) CuSO_4 la cui formazione può essere indotta da ossidazione della specie HS^- e la cui presenza nel campione è confermata dalle analisi XPS.

La morfologia dei prodotti può anche essere studiata mediante analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM). In figura 5.16 si riporta l'immagine ottenuta effettuando tale

analisi sul campione CuS_1, che si presenta in *nanoflakes*. Tale struttura è nota in letteratura per le nanostrutture di CuS in forma di covellite [Phuruangrat, 2012].

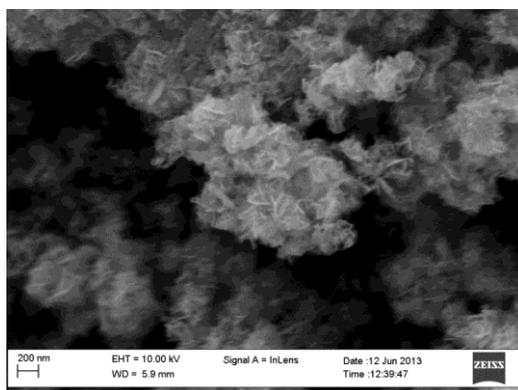


Figura 5.16 Immagine SEM del campione CuS_1.

Come già evidenziato dal SAED, i campioni sintetizzati mostrano la copresenza di CuS e di una fase ossidica. Ciò è confermato dalle misure XAFS effettuate presso i sincrotroni di Elettra (alla soglia K dello zolfo), dove la sottoscritta si è recata per effettuare le misure in marzo 2013, e PSI (alle soglie K o L₃ dei metalli). Di seguito viene presentata un'elaborazione preliminare dei dati. In figura 5.17, lo spettro XANES (linea continua) della soglia K del rame del campione CuS_1 è confrontato con gli spettri di CuS (linea tratteggiata) e CuO (punteggiata), campioni di riferimento commerciali. Come si può notare, lo spettro della covellite presenta un picco a 8987 eV (a), caratteristico dei domini a coordinazione tetraedrica che, nel caso del campione sintetizzato con rapporto molare Cu:S=1:2 (CuS_1), è meno rilevante, in maniera analoga a quanto si osserva nel CuO. Il picco "c" è tuttavia più intenso rispetto alla corrispondente componente in CuS, e si trova in corrispondenza del massimo di CuO.

Confrontando le funzioni EXAFS (pesate su k^2 e riportate in figura 5.17b) dei campioni di CuS puri e drogati sintetizzati [a) CuS_1, b) CuS_8, c) CuS_9, d) CuS_10], si può notare come la presenza degli ioni droganti non induca variazioni significative nell'intorno del rame nei vari campioni. Inoltre, gli spettri registrati sono notevolmente diversi rispetto a quelli dei riferimenti. Questo è dovuto plausibilmente alla copresenza di due fasi. L'andamento delle funzioni sperimentali sembra indicare un elevato grado di disordine locale negli intorni di Cu, come confermato dai fattori di Debye-Waller calcolati.

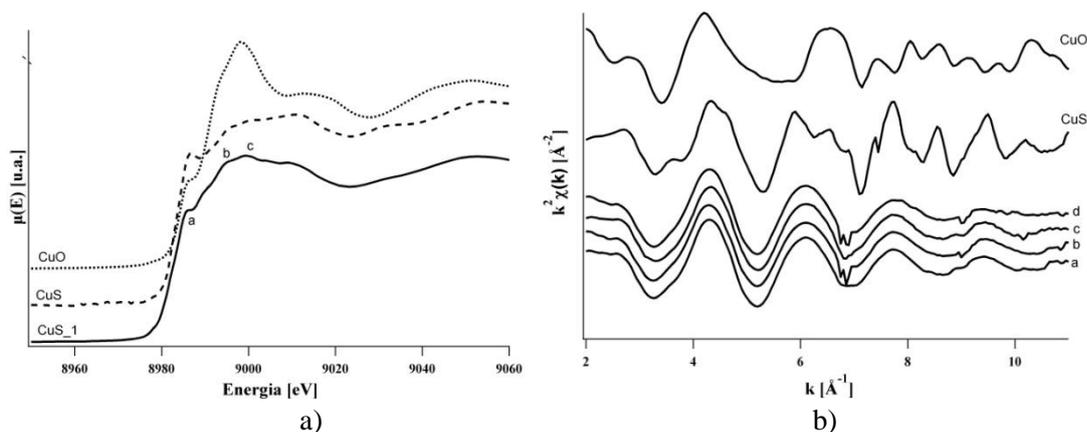


Figura 5.17 a) Spettri XANES e b) EXAFS delle soglie K di Cu.

Gli spettri XANES alla soglia K dello zolfo di alcuni campioni sono riportati in figura 5.18. Tutti i campioni sono dominati da un intenso assorbimento a circa 2482 eV, evidenziato in figura. Tale picco, tuttavia, è dovuto ad un problema strumentale e non ai campioni in esame, e si ritrova anche nei segnali EXAFS. Non contribuisce però alle trasformate di Fourier in quanto al di fuori dell'intervallo di integrazione scelto ($k = 2.5-10$). I segnali XANES registrati non presentano variazioni significative tra i vari campioni e corrispondono a quanto riportato in letteratura [Li, 1994; Patrick 1997, Kumar 2013] per la covellite. I picchi "a" e "b" in figura 5.18 possono essere assegnati alle transizioni tra lo stato S 2p e gli stati S 3p-like ibridizzati con la banda 3d in Cu all'interno dei domini $\text{Cu}^{2+}\text{-S}_3$ e $\text{Cu}^+\text{-S}_4$ rispettivamente. Al contrario del segnale di rame l'analisi della soglia K dello zolfo conferma quindi la formazione di covellite.

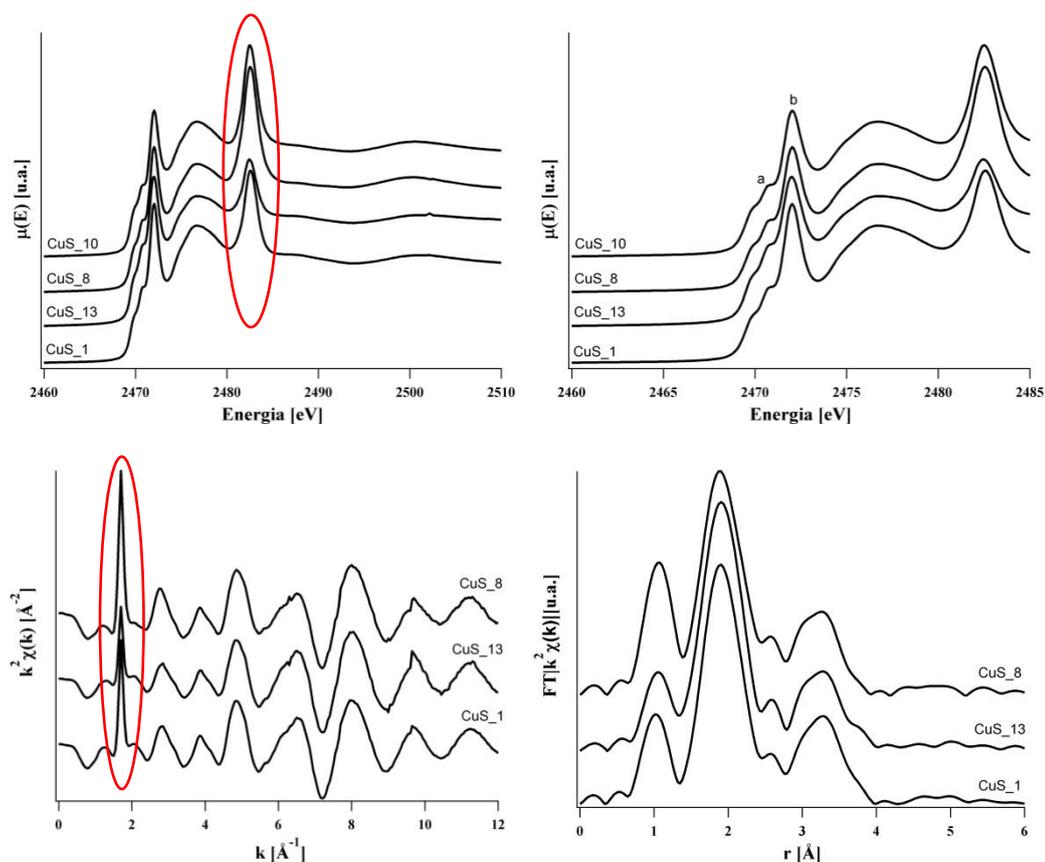


Figura 5.18 Spettri XANES, EXAFS e trasformata di Fourier delle soglie K di S.

Per quanto riguarda i droganti, Eu e Tb mostrano funzioni EXAFS molto simili, segno che l'intorno chimico è pressochè identico, come ci si può aspettare per questi ioni con raggi ionici e comportamento analoghi. Interpolando il segnale di prima *shell* con atomi di zolfo non si ottengono risultati soddisfacenti, mentre effettuando i fitting con una *shell* di atomi di ossigeno i risultati migliorano sensibilmente. Questo sta ad indicare che gli ioni di lantanidi segregano e formano domini ossidici, comportamento non inusuale per queste specie [Bol, 2002].

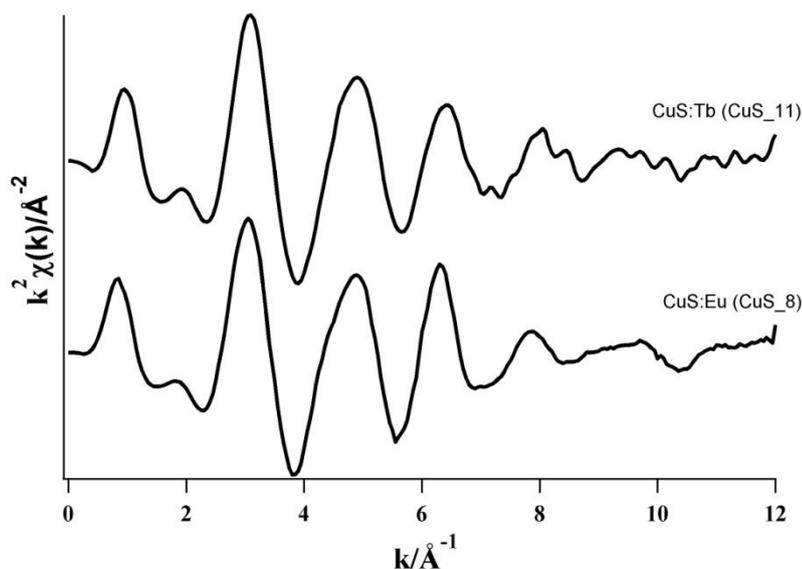


Figura 5.19 EXAFS alle soglie L_3 degli ioni delle terre rare Eu e Tb.

Anche la regione XANES della soglia K del manganese mostra un andamento più vicino a quello di MnO piuttosto che di MnS, e ciò è confermato anche dalla trasformata di Fourier (Figura 5.20), in quanto la distanza del picco di prima *shell* è più simile a MnO, così come quella di seconda *shell*, anche se con intensità diversa (questa differenza potrebbe essere dovuta ad un maggior disordine o alle dimensioni ridotte dei domini di MnO). La formazione di domini ossidici è ulteriormente confermata dall'interpolazione del picco di prima *shell*.

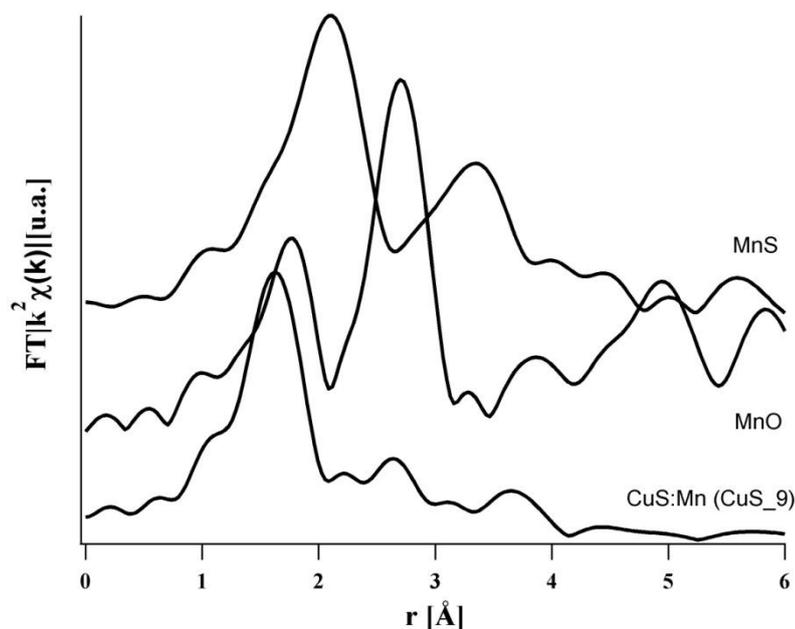


Figura 5.20 Trasformata di Fourier di CuS:Mn, MnO e MnS.

I dati XAS, relativi alle diverse soglie, mostrano quindi che: i) i campioni sintetizzati sono caratterizzati da copresenza di due fasi: una attribuibile a CuS in forma di covellite e l'altra ad una fase ossidica, ii) la presenza degli ioni dei lantanidi come droganti non induce variazioni strutturali, iii) questi ultimi tuttavia tendono a segregare formando ossidi, non

evidenziati dall’XRD, e tale conclusione si può estendere anche al manganese, utilizzato come drogante.

5.1.2 Rapporti molari dei precursori

La morfologia, la composizione e la purezza dei prodotti sintetizzati sono state analizzate anche al variare dei rapporti molari tra i precursori di rame(II) e di solfuro. Tra le fonti di ioni S^{2-} sono state utilizzate unicamente solfuro di sodio, tioacetammide e acido tioacetico e il prodotto di precipitazione è stato ottenuto a partire da rapporti molari Cu:S variabili (Tabella 5.5).

Esperimento	Precursore Cu^{2+}	Precursore S^{2-}	Rapporto Cu:S	Fase/i cristallina/e	Dimensione media dei cristalliti
<i>CuS_13</i>	$Cu(NO_3)_2$	Na_2S	2:1	covellite	11 nm
<i>CuS_14</i>	$Cu(NO_3)_2$	Na_2S	1:1	covellite + fasi non identificate	13 nm
<i>CuS_1</i>	$Cu(NO_3)_2$	Na_2S	1:2	covellite	14 nm
<i>CuS_15</i>	$Cu(NO_3)_2$	CH_3CSNH_2	1:1	covellite/calcanite	12 nm
<i>CuS_2</i>	$Cu(NO_3)_2$	CH_3CSNH_2	1:2	covellite	13 nm
<i>CuS_3</i>	$Cu(NO_3)_2$	CH_3COSH	1:2	covellite	15 nm
<i>CuS_16</i>	$CuCl_2$	Na_2S	1:1	covellite	11 nm
<i>CuS_6</i>	$CuCl_2$	Na_2S	1:2	covellite	12 nm
<i>CuS_7</i>	$CuCl_2$	CH_3CSNH_2	1:2	covellite + fasi non identificate	-

Tabella 5.5 Nanosistemi sintetizzati al variare dei rapporti molari tra precursori di rame(II) e di solfuro.

Confrontando i diffrattogrammi ottenuti mediante analisi XRD dei prodotti di precipitazione *CuS_1*, *CuS_13* e *CuS_14* (Figura 5.21), è possibile affermare che i rapporti tra precursori influenzano principalmente la purezza del composto finale. In tutti e tre i casi, sono riconoscibili i riflessi del solfuro di rame(II) in forma di covellite (PDF N.00-001-1281). La presenza di un eccesso di uno dei due precursori in soluzione acquosa determina la formazione del composto puro, mentre l’aggiunta di una quantità stechiometrica di solfuro di sodio all’emulsione del sale di rame(II) induce la comparsa nel diffrattogramma di riflessi non attribuibili alla covellite e indice di impurezza del prodotto di sintesi.

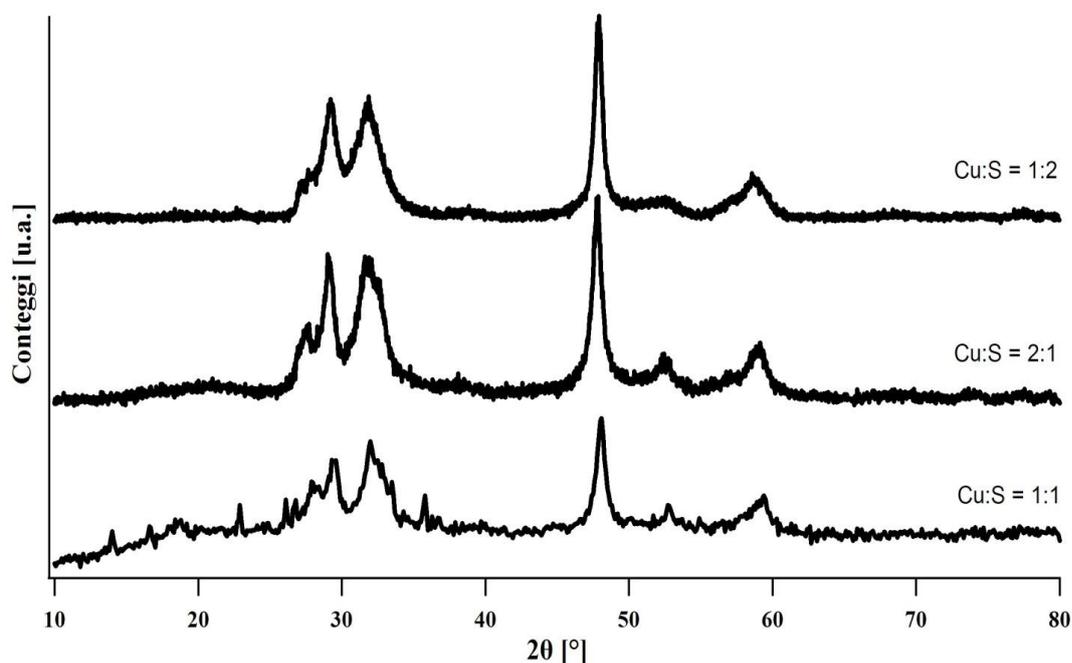


Figura 5.21 Diffratogrammi di CuS ottenuto via miniemulsione a partire da solfuro di sodio e nitrato di rame(II) in rapporto molare Cu:S pari a 2:1 (CuS_13), 1:1 (CuS_14) e 1:2 (CuS_1).

Le medesime conclusioni possono essere tratte dal confronto tra i diffratogrammi dei campioni CuS_15 e CuS_2 (Figura 5.22), che differiscono dai precedenti per la fonte di solfuro. I riflessi evidenziati con * sono attribuibili ad una forma cristallina diversa dalla covellite e identificabile con CuSO_4 in forma di calcantite. L'anione solfato SO_4^{2-} può formarsi in soluzione per ossidazione della specie HS^- e compete con l'anione solfuro nella reazione con lo ione metallico [Kotronarou, 1992].

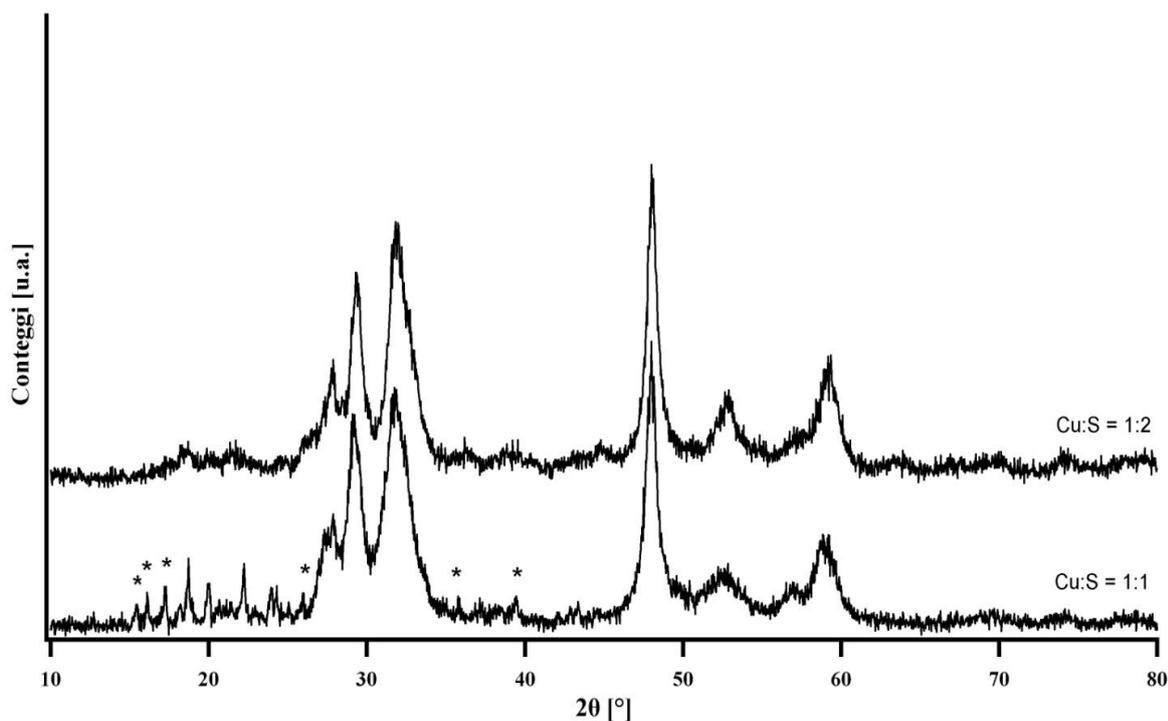


Figura 5.22 Diffratogrammi di CuS ottenuto via miniemulsione a partire da tioacetammide e nitrato di rame(II) in rapporto molare Cu:S pari a 1:1 (CuS_15) e 1:2 (CuS_2) (* = calcantite).

Analisi TEM del campione CuS_14 confermano l'eterogeneità del campione, che presenta microstrutture diverse non attribuibili unicamente alla covellite e, ipoteticamente, identificabili, come per CuS_8, con la tenorite CuO. In questo caso, sarebbe opportuno effettuare ulteriori analisi al fine di comprendere la reale composizione del prodotto di sintesi. In figura 5.23 si riporta l'immagine TEM del campione CuS_2, costituito unicamente da covellite, con domini di 10-15 nm che confermano quanto calcolato, mediante formula di Scherrer, dai dati XRD.

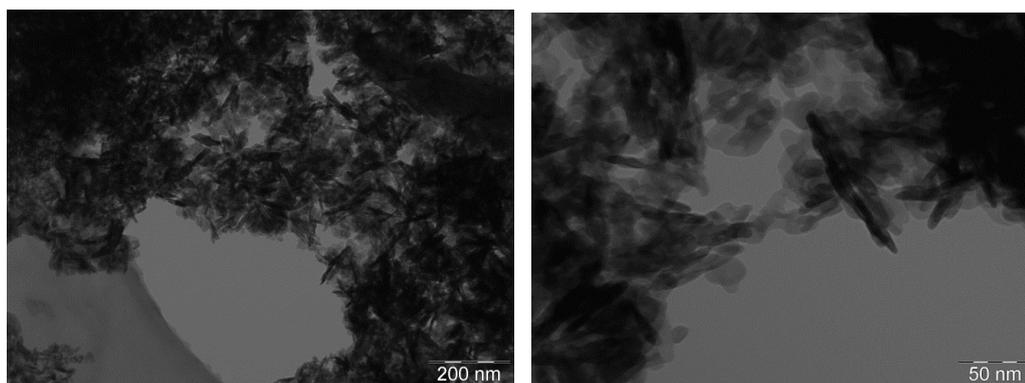


Figura 5.23 Immagini TEM del campione CuS_2.

Considerando CuCl_2 come precursore dello ione metallico e Na_2S come fonte di solfuro, l'analisi XRD sui campioni CuS_16 e CuS_6 (Figura 5.24) conferma quanto affermato per i casi precedenti mostrando maggior purezza nel prodotto ottenuto utilizzando un eccesso di precursore di solfuro durante la sintesi. Inoltre, usando rapporti equimolari dei precursori, il prodotto di precipitazione, oltre a presentare riflessi non ascrivibili alla covellite, risulta meno cristallino e il rapporto segnale/rumore diminuisce.

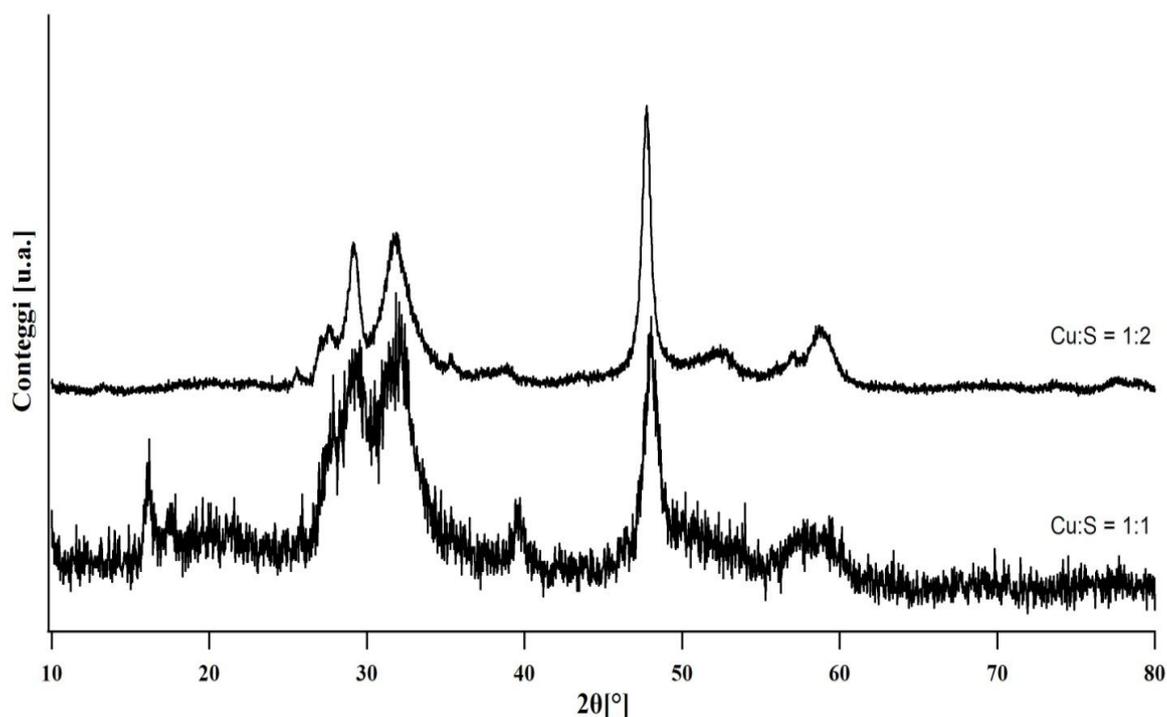


Figura 5.24 Diffattogrammi di CuS ottenuto via miniemulsione a partire da solfuro di sodio e cloruro di rame(II) in rapporto molare Cu:S pari a 1:1 (CuS_16) e 1:2 (CuS_6).

I prodotti CuS_3 e CuS_7 sono stati sintetizzati unicamente in rapporto molare Cu:S pari a 1:2 e i diffrattogrammi ad essi relativi sono riportati rispettivamente nelle figure 5.3 e 5.4. Contrariamente a quanto ipotizzabile, la tioacetammide non è, in queste condizioni, un buon donatore di anioni solfuro in presenza di cloruro di rame(II), in quanto dal diffrattogramma del prodotto di precipitazione si osservano riflessi attribuibili alla covellite, ma essa coesiste con numerose altre fasi cristalline non identificabili.

Le dimensioni medie dei cristalliti, calcolate mediante formula di Scherrer, sono comprese tra 11 nm e 15 nm con andamento crescente al diminuire della concentrazione degli ioni metallici in soluzione.

5.1.3 Condizioni di sonicazione

La formazione di una miniemulsione necessita di energia molto elevata, funzionale all'ottenimento di gocce di piccole dimensioni e omogeneamente distribuite. La semplice agitazione meccanica, usata nelle microemulsioni, non soddisfa tale condizione mentre l'ultrasonificazione risulta efficace in quanto determina processi di fusione e fissione delle gocce che riducono la polidispersione fino al raggiungimento di un equilibrio. Le dimensioni medie delle gocce, la loro distribuzione dimensionale e la stabilità delle miniemulsioni variano modificando tempi e modalità di sonicazione.

In questo lavoro di tesi gli effetti di tali modifiche sono stati valutati mediante analisi DLS e XRD su campioni di CuS sintetizzati via miniemulsione a partire da $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e Na_2S in rapporto molare Cu:S pari a 1:2, al variare del tempo e dell'ampiezza di sonicazione (Tabella 5.6).

Esperimento	Precursore Cu^{2+}	Precursore S^{2-}	Tempi/modalità di sonicazione	Prodotto di precipitazione	Fase cristallina	Dimensione media dei cristalliti	Diametro idrodinamico
<i>CuS_17</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Na_2S	1 minuto (ampiezza 70%)	CuS	covellite	14 nm	(606 ± 40) nm
<i>CuS_18</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Na_2S	2 minuti (ampiezza 70%)	CuS	covellite	15 nm	(466 ± 14) nm
<i>CuS_1</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Na_2S	3 minuti (ampiezza 70%)	CuS	covellite	14 nm	(376 ± 34) nm
<i>CuS_19</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Na_2S	6 minuti (ampiezza 70%)	CuS	covellite	15 nm	(227 ± 11) nm
<i>CuS_20</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Na_2S	3 minuti (ampiezza 50%)	CuS	covellite	14 nm	(505 ± 14) nm
<i>CuS_21</i>	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Na_2S	3 minuti (ampiezza 70% impulsata)	CuS	covellite	14 nm	(371 ± 35) nm

Tabella 5.6 Nanosistemi sintetizzati al variare dei tempi e delle modalità di sonicazione.

Dalle analisi XRD effettuate sui campioni CuS_17-21, di cui in figura 5.25 si riportano alcuni esempi, si conclude che tempi e modalità di sonicazione non influiscono sulla reazione di precipitazione in quanto i prodotti ottenuti hanno struttura cristallina della covellite (PDF N. 00-001-1281) e non si osservano riflessi aggiuntivi.

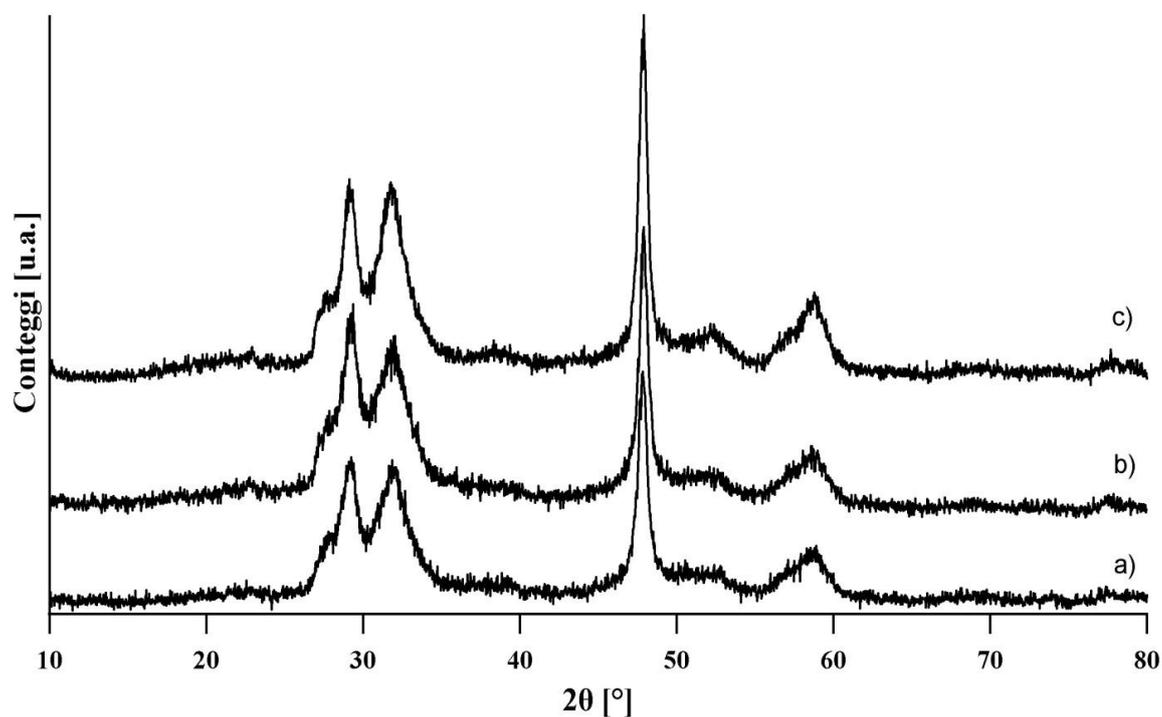


Figura 5.24 Diffrattogrammi di CuS ottenuto via miniemulsione a partire da solfuro di sodio e nitrato di rame(II) al variare di tempi e modalità di sonicazione a) CuS_17, b) CuS_18, c) CuS_21.

Le dimensioni medie dei cristalliti, calcolate mediante formula di Scherrer, non variano considerevolmente nei casi considerati. Per valutare l'eventuale alterazione delle dimensioni delle gocce in sospensione e la loro distribuzione dimensionale sono state effettuate misure DLS sulle sospensioni ottenute dopo sonicazione in cicloesano. L'energia fornita alle emulsioni dagli ultrasuoni aumenta con la durata di sonicazione fino a raggiungere un valore massimo, oltre il quale le proprietà del sistema rimangono invariate [Gaikwad, 2008]. Le dimensioni delle gocce dipendono da tale energia e, quindi, dovrebbero diminuire all'aumentare del tempo di sonicazione. I risultati, riportati in figura 5.26, attestano quanto previsto in quanto mostrano andamento decrescente delle dimensioni all'aumentare della durata di sonicazione.

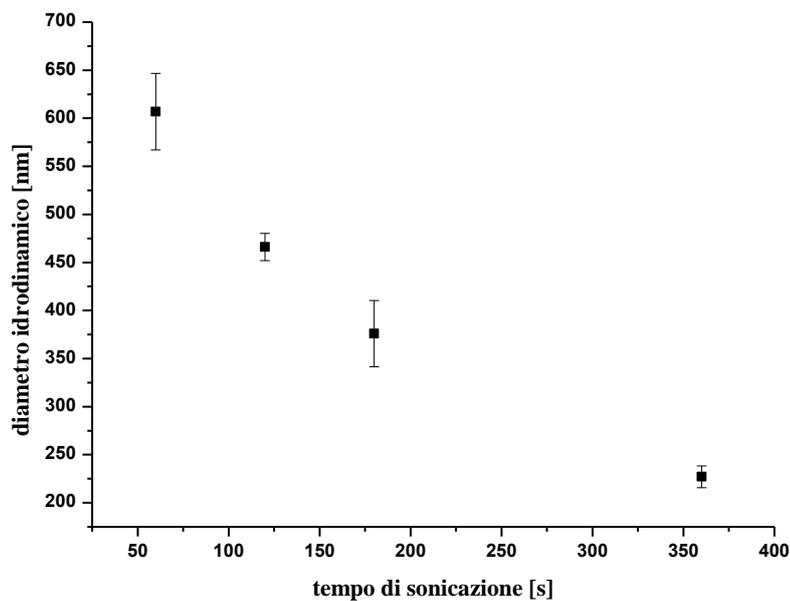


Figura 5.26 Dipendenza delle dimensioni delle gocce in sospensione dal tempo di sonicazione.

L'unico tentativo effettuato variando la potenza della sonicazione e mantenendo costante la durata (3 minuti) risulta in un aumento delle dimensioni nel passaggio dal 70% di ampiezza al 50% (Figura 5.27), mentre l'utilizzo della sonicazione impulsata sembra non influire sulla grandezza delle gocce (Figura 5.28).

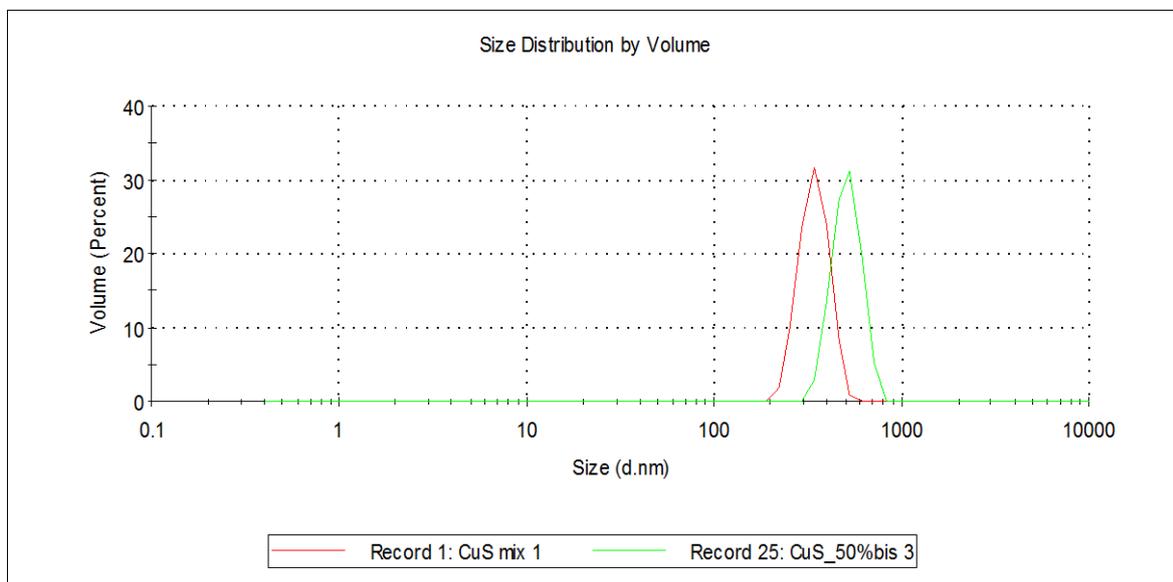


Figura 5.27 Grafico DLS relativo ai prodotti CuS_1 e CuS_20.

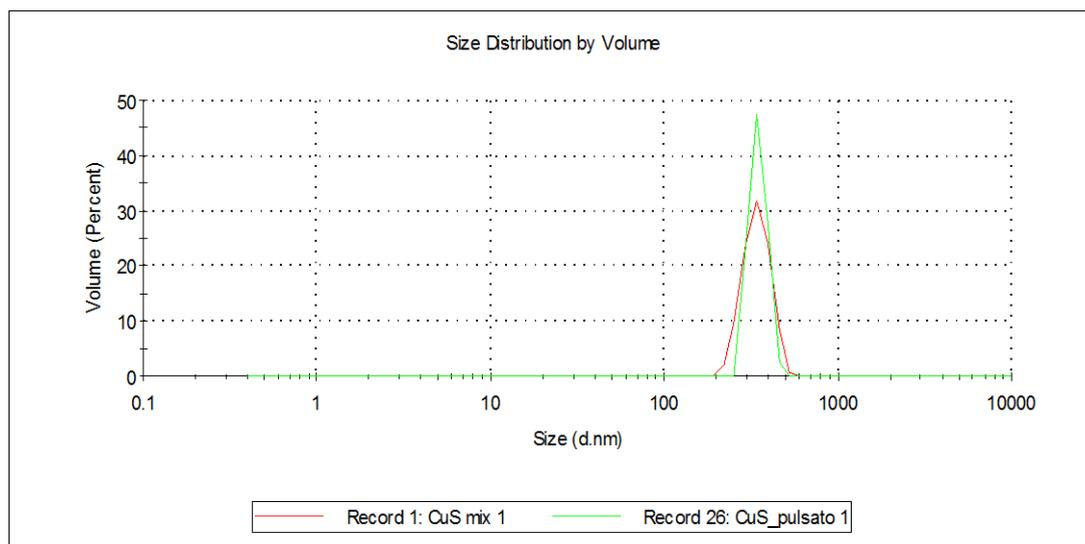


Figura 5.28 Grafico DLS relativo ai prodotti CuS_1 e CuS_21.

5.2 Sintesi di solfuro di manganese con miscela di tensioattivi (Brij-52 e Igepal-CO630)

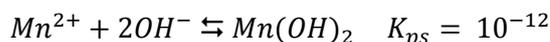
5.2.1 Natura dei precursori

Sintesi di nanostrutture di solfuro di manganese(II) MnS a partire da precursori di diversa natura sono riportate in letteratura [Goede, 1987; Okajima, 1992; Lokhande, 1998]. Le procedure utilizzate e le condizioni sperimentali variano in funzione del tipo di materiali nanostrutturati da ottenere. Nel presente lavoro di tesi, si è tentato di sintetizzare MnS nanocristallino via miniemulsione utilizzando, come fonti di manganese(II), $Mn(CH_3COO)_2$ e $MnCl_2$ e, come fonti di anioni solfuro, i composti organici e inorganici presi in considerazione per la sintesi di CuS descritta nel paragrafo 5.1, tranne l'acido tioacetico (Tabella 5.7). Il rilascio di ioni S^{2-} da parte dei singoli donatori richiede condizioni sperimentali opportune, illustrate nel paragrafo 5.1.1.

Esperimento	Precursore Mn^{2+}	Precursore S^{2-}	Prodotto di precipitazione	Fase/i cristallina/e
<i>MnS_1</i>	$Mn(CH_3COO)_2$	Na_2S	Mn_3O_4	hausmannite
<i>MnS_2</i>		CH_3CSNH_2	-	-
<i>MnS_3</i>		$SHCH_2COONH_4$	-	-
<i>MnS_4</i>		NH_2CSNH_2	-	-
<i>MnS_5</i>	$MnCl_2$	Na_2S	Mn_3O_4	hausmannite
<i>MnS_6</i>		CH_3CSNH_2	-	-

Tabella 5.7 Nanosistemi sintetizzati via miniemulsione al variare della natura dei precursori di manganese(II) e di solfuro.

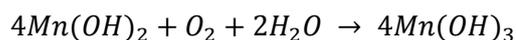
Il manganese(II), in soluzione acquosa, è presente come catione Mn^{2+} , altamente stabile, in quanto il metallo presenta configurazione elettronica esterna $3d^5$ ad alto spin cui i cinque elettroni sono disposti nei cinque orbitali d con spin paralleli. In ambiente basico, però, reagisce con l'anione OH^- a formare l'idrossido $Mn(OH)_2$ e, poiché i prodotti di solubilità di questa specie e del MnS sono confrontabili (Schema 6), le reazioni di precipitazione dei due composti, in presenza di S^{2-} , sono competitive e avvengono entrambe [Lokhande, 1998].



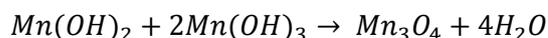
Schema 6 Precipitazione dell'idrossido e del solfuro di manganese(II).

In condizioni di elevata temperatura (200 °C), l'idrossido di manganese reagisce con S^{2-} a dare MnS e la completa conversione in quest'ultima specie dipende dalla quantità di anioni solfuro presenti in soluzione [Biswas, 2007].

L'idrossido di manganese(II) può inoltre subire ossidazione all'aria [Murry, 1974] producendo idrossido di manganese(III) secondo la reazione seguente:



Entrambi gli idrossidi precipitano come specie amorfe e una successiva disidratazione produce cristallizzazione dell'ossido misto di manganese(II) e manganese(III) Mn_3O_4 :



In realtà, anche sottoponendo il prodotto ottenuto a trattamento termico a 120 °C, si osservano residui di $Mn(OH)_2$ amorfo non reagito che va ad inficiare la purezza dell'ossido finale.

Usando la tecnica della miniemulsione non è possibile evitare l'ossidazione del manganese(II) in quanto le condizioni sperimentali non prevedono utilizzo di atmosfera inerte e i prodotti ottenuti per precipitazione, una volta separati dal solvente, vengono sottoposti ad essiccazione in stufa a 90 °C.

Le sintesi condotte via miniemulsione utilizzando come fonti di solfuro tioacetammide e tiourea, però, non determinano precipitazione. Le motivazioni di tale comportamento potrebbero essere imputabili a ambiente di reazione sfavorevole alla decomposizione dei precursori e al conseguente rilascio degli anioni S^{2-} .

Il prodotto ottenuto da un unico esperimento condotto utilizzando come precursore di manganese(II) $Mn(CH_3COO)_2$ e come fonte di solfuro $SHCH_2COONH_4$ contiene residui di tioglicolato identificabili mediante spettroscopia infrarossa.

La reazione di entrambe le fonti di manganese(II) considerate con il solfuro di sodio porta, invece, alla precipitazione di un prodotto analizzabile mediante diffrazione da raggi X al fine di determinarne struttura cristallina e purezza. Contrariamente alle aspettative, dai diffrattogrammi di MnS_1 e MnS_5 (Figura 5.29) sono riconoscibili i riflessi caratteristici (\square) dell'ossido misto di Mn(II) e Mn(III), Mn_3O_4 , in forma di hausmannite (PDF N. 24-0734). I prodotti ottenuti non sono inoltre puri in quanto si osservano riflessi aggiuntivi, indice di coesistenza di più fasi cristalline.

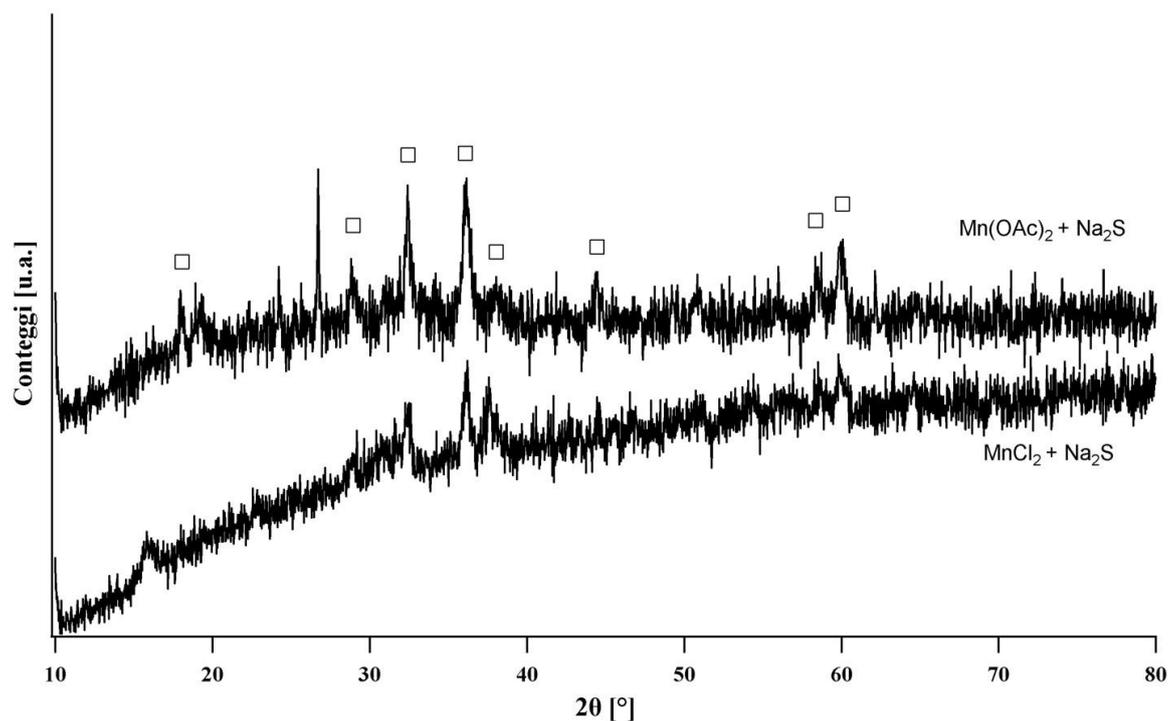


Figura 5.29 Diffratogrammi dei prodotti precipitati dagli esperimenti MnS_1 e MnS_5.

La formazione di un ossido è confermata anche dalle analisi di spettroscopia infrarossa FT-IR, eseguita sui campioni MnS_1 e MnS_5, di cui si riporta un esempio in figura 5.30, unitamente allo spettro FT-IR di uno dei due tensioattivi utilizzati per la sintesi.

Oltre ai picchi attribuibili alle vibrazioni dei legami della catena alifatica (*stretching*: 2960-2850 cm^{-1} e *bending*: 1470-1250 cm^{-1}) e del gruppo etereo (1100 cm^{-1}) del tensioattivo, sono di particolare interesse le due bande che cadono a numeri d'onda bassi. Entrambe corrispondono agli stiramenti dei legami Mn-O-Mn: a 611 cm^{-1} cade lo *stretching* asimmetrico e a 487 cm^{-1} il simmetrico [Chen, 2008].

Visto che l'analisi XRD evidenzia che la reazione non ha portato alla formazione di MnS, sui campioni sintetizzati non sono state condotte ulteriori analisi.

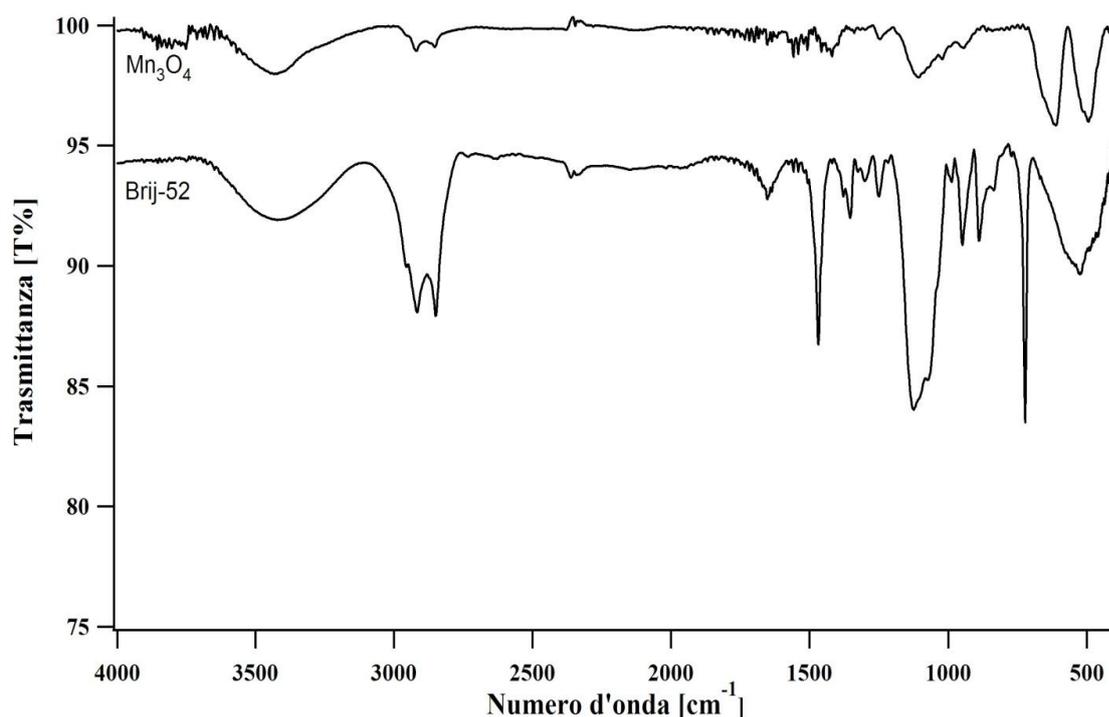


Figura 5.30 Spettri FT-IR del campione MnS_1 sintetizzato via miniemulsione e del tensioattivo Brij-52.

5.2.2 Rapporti molari dei precursori

Per valutare l'influenza delle quantità relative dei precursori di manganese(II) e di solfuro sulla cristallinità e la purezza dei prodotti di precipitazione sono state sintetizzate nanostrutture usando diversi rapporti molari Mn/S. Sono stati effettuati quattro esperimenti (Tabella 5.8) utilizzando come unica fonte di solfuro Na_2S e come fonti di manganese(II) $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ e MnCl_2 . I diffrattogrammi e gli spettri FT-IR dei campioni MnS_1 e MnS_5 sono stati discussi nel paragrafo precedente.

In tutti i casi considerati, la precipitazione avviene, ma il solido ottenuto con rapporto molare Mn:S = 1:2 non è analizzabile per diffrazione da raggi X in quanto caratterizzato da consistenza oleosa. Dalle analisi di spettroscopia infrarossa condotte sui campioni MnS_7 e MnS_8 sono visibili le due bande a numeri d'onda compresi tra 650 e 450 cm^{-1} attribuibili alle vibrazioni dei legami Mn-O-Mn. Poiché tali picchi non si osserverebbero se il prodotto ottenuto fosse solfuro di manganese(II) in quanto gli *stretching* dei legami Mn-S cadono a numeri d'onda inferiori a 400 cm^{-1} (limite minimo dell'intervallo misurato), da tali dati si può affermare che il precipitato ha composizione diversa da quella attesa ma non identificabile.

Esperimento	Precursore Mn ²⁺	Precursore S ²⁻	Rapporto Mn:S	Fase/i cristallina/e
MnS_1	Mn(CH ₃ COO) ₂	Na ₂ S	1:1	hausmannite
MnS_7	Mn(CH ₃ COO) ₂	Na ₂ S	1:2	-
MnS_5	MnCl ₂	Na ₂ S	1:1	hausmannite
MnS_8	MnCl ₂	Na ₂ S	1:2	-

Tabella 5.8 Nanosistemi sintetizzati al variare dei rapporti molari tra precursori di manganese(II) e di solfuro.

5.3 Funzionalizzazione delle nanoparticelle

5.3.1 Sintesi del legante

Il legante PMOXA, utilizzato nel presente lavoro di tesi e sintetizzato in collaborazione con il Dott. Benetti ed il Prof. Maggini del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, appartiene alla categoria dei polimeri idrosolubili, biocompatibili e non ionici e il monomero di partenza è l'imminoetere ciclico 2-metilossazolina, commercialmente disponibile [Sedlacek, 2012]. La polimerizzazione procede via apertura d'anello cationica vivente (Figura 5.31) e può essere indotta da una serie di iniziatori elettrofili tra cui il triflato, utilizzato in questo lavoro di tesi. Quest'ultimo conferisce alla reazione di inizio della polimerizzazione entrambi i requisiti di velocità e quantitatività a temperature ordinarie, necessari per ottenere prodotti ben definiti.

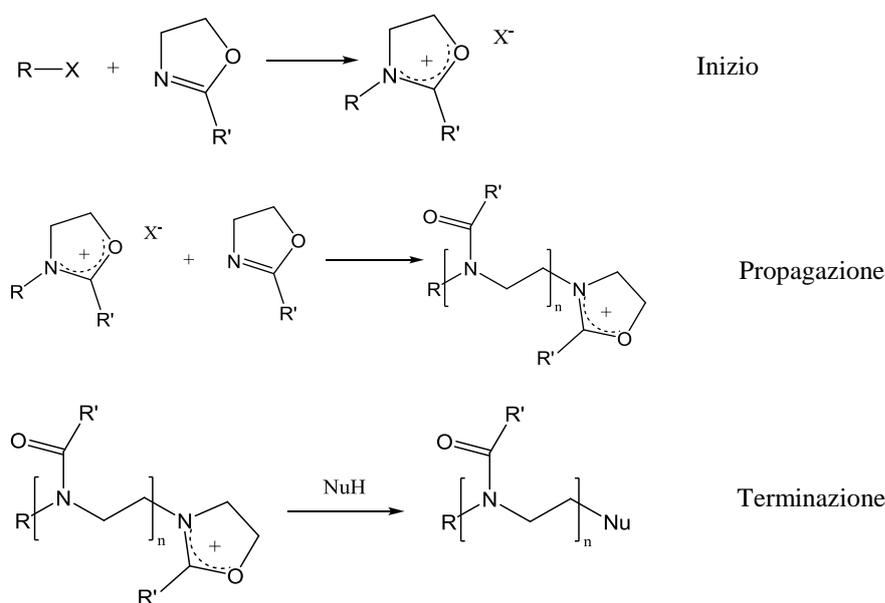


Figura 5.31 Polimerizzazione cationica ad apertura d'anello per la sintesi delle POX.

Lo stadio iniziale della polimerizzazione prevede attacco dell'iniziatore da parte dell'atomo di azoto nucleofilo della 2-metilossazolina; quest'ultima subisce, quindi, sostituzione elettrofila e acquista carica positiva delocalizzata che la rende suscettibile verso qualsiasi nucleofilo, permettendo ad un altro monomero di attaccare l'anello e indurlo l'apertura.

Questa reazione dà inizio alla propagazione che consiste nell'attacco del monomero al carbonio in posizione 5 (adiacente all'ossigeno) dell'eterociclo e nella rottura del legame C5-O producendo una poli-N-acetilenimmina (Figura 5.32 a). In linea teorica, l'apertura di anello potrebbe anche essere indotta da attacco del controione triflato a dare un prodotto neutro, in equilibrio con la specie cationica (Figura 5.32 b). In acetonitrile, solvente usato per la sintesi, e in presenza di controioni molto nucleofili come il triflato, però, la specie ionica prevale, in quanto il monomero è più nucleofilo del controione [Saegusa, 1976] e la *driving force* della propagazione non è il rilassamento della deformazione di anello, come in tutte le polimerizzazioni ad apertura di anello, bensì l'isomerizzazione dell'imminoetere ad ammido, termodinamicamente più stabile [Hrkach, 1992]. Per questo motivo possiamo definire questo processo come polimerizzazione-isomerizzazione delle ossazoline.

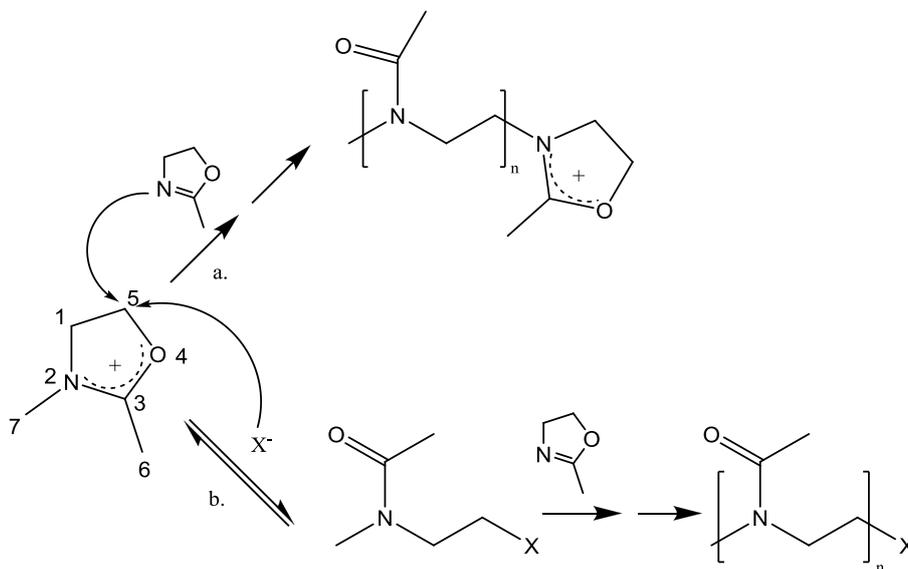
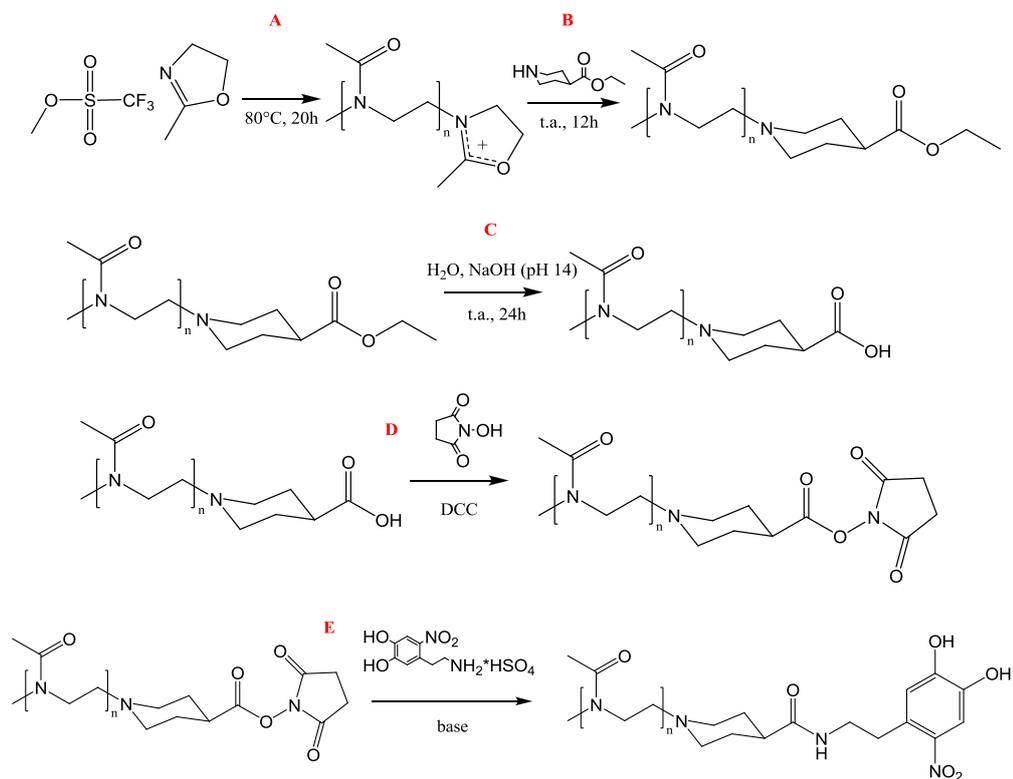


Figura 5.32 Meccanismi di propagazione nella polimerizzazione della metilossazolina.

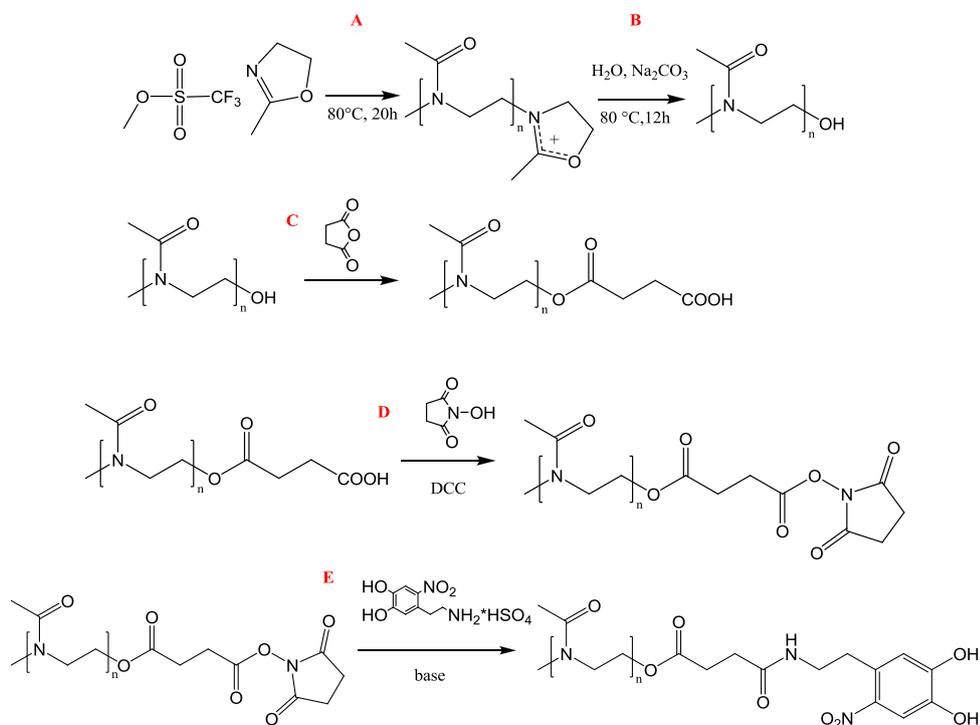
Nonostante la polimerizzazione della metilossazolina si possa definire vivente, all'aumentare del peso molecolare del polimero è possibile che si verifichino reazioni di trasferimento di catena per β -eliminazione, evitabili mantenendo il peso molecolare medio al di sotto dei 10 kDa, riducendo la temperatura di reazione o introducendo un gruppo stericamente ingombrante in posizione 2 [Sedlacek, 2012]. La terminazione viene infine indotta mediante aggiunta all'ambiente di reazione di un opportuno terminatore; i più diffusi sono l'acqua o lo ione OH⁻ che funzionalizzano il polimero con gruppi terminali -OH e azidi, tioli o ammine che determinano terminazioni dipendenti dal tipo di terminatore scelto.

In questo elaborato di tesi sono stati sintetizzati, secondo la procedura riportata in dettaglio nel paragrafo 7.3, due polimeri aventi lunghezza delle catene e natura del terminatore diversi; in particolare si sono ottenuti polimeri con peso molecolare medio di circa 2 kDa e 4 kDa, utilizzando rispettivamente acqua basica (b.) e piperidina sostituita (etilisonipeotato) (a.) come terminatori. Al fine di conferire ai polimeri così ottenuti le proprietà necessarie a renderli potenziali leganti di superficie per le nanoparticelle, si è proceduto con la funzionalizzazione del gruppo terminale idrossilico o piperidinico. Gli stadi delle due reazioni condotte sono riportati nello schema 7.

a.)



b.)



Schema 7 Stadi di reazione di sintesi del legante a base di PMOXA.

L'ultimo stadio (stadio E nello schema 7) è funzionale ad introdurre, come gruppo terminale affine alla superficie delle nanoparticelle (NPs), una molecola di nitrodopamina, sintetizzata

per nitrizzazione della dopamina commerciale seguendo la procedura riportata in letteratura [Rodenstein, 2010; Napolitano, 1992] e descritta nel paragrafo 7.3.

Il monitoraggio della reazione globale e il calcolo dell'effettiva lunghezza delle catene è stato eseguito mediante analisi di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR), condotte sul prodotto di ogni singolo stadio e riportate in Appendice.

5.3.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle funzionalizzate

Le nanoparticelle di ZnO, sintetizzate via miniemulsione, sono state sottoposte a precipitazione, centrifugazione ed essiccazione, secondo la procedura descritta nel paragrafo 7.4, prima di essere funzionalizzate con i leganti a base di PMOXA. L'utilizzo dell'ossido di zinco al posto del solfuro di rame(II) è legato alla maggiore affinità del primo con il legante e alla sua testata non citotossicità [Dolcet, 2013], necessaria ai fini della potenziale applicazione delle nanoparticelle funzionalizzate in *bioimaging*.

Tra le strategie di funzionalizzazione esistenti e illustrate nel capitolo 4, in questo lavoro di tesi si è scelto il metodo di scambio dei leganti diretto. In particolare, diversi rapporti in peso di nanoparticelle di ZnO e polimero sono stati introdotti in solvente organico (diclorometano o dimetilformammide) e sottoposti a semplice agitazione a temperatura ambiente per 24 ore (Tabella 5.9). Nanoparticelle funzionalizzate con stessi rapporti ZnO/polimero sono state ottenute utilizzando il polimero da 2 kDa e da 4 kDa, con l'eccezione del rapporto 1:50 per il quale è stato possibile ottenere prodotti soltanto con il polimero a peso molecolare medio maggiore. Tutte le nanoparticelle funzionalizzate sintetizzate sono state purificate per dialisi e liofilizzate prima di essere ridisperse in soluzioni acquose. I dettagli della procedura sono riportati nel paragrafo 7.4.

Esperimento	Peso molecolare medio polimero (kDa)	Rapporto in peso ZnO:polimero	Solvente di funzionalizzazione
<i>PMOXA_NDP_1</i>	4	1:2	diclorometano
<i>PMOXA_NDP_2</i>	4	1:4	diclorometano
<i>PMOXA_NDP_3</i>	4	1:20	diclorometano
<i>PMOXA_NDP_4</i>	4	1:50	dimetilformammide
<i>PMOXA_NDP_5</i>	2	1:2	diclorometano
<i>PMOXA_NDP_6</i>	2	1:4	diclorometano
<i>PMOXA_NDP_7</i>	2	1:20	diclorometano

Tabella 5.9 Nanoparticelle di ossido di zinco funzionalizzate al variare dei rapporti ZnO/polimero.

La strategia di scambio dei leganti diretto ha lo scopo di allontanare le molecole di tensioattivo residuo, fisisorbite sulla superficie delle nanoparticelle di ZnO, e di sostituirle con un guscio di polimero capace di ancorarsi, stabilmente, grazie alla presenza della nitrodopamina terminale (Figura 5.33).

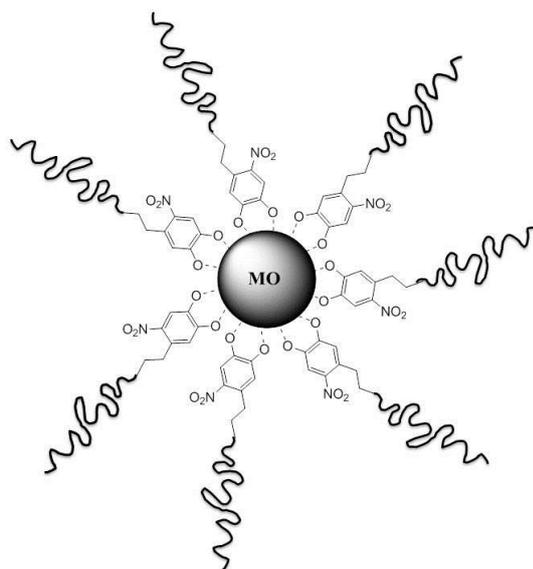


Figura 5.33 Rappresentazione del legame di derivati della nitrodopamina alla superficie di ossidi metallici (MO).

L'avvenuta sostituzione è verificabile tramite spettroscopia FT-IR: in figura 5.34 sono riportati gli spettri relativi a NPs di ZnO rivestite del tensioattivo residuo e a quelle funzionalizzate con le diverse quantità di polimero.

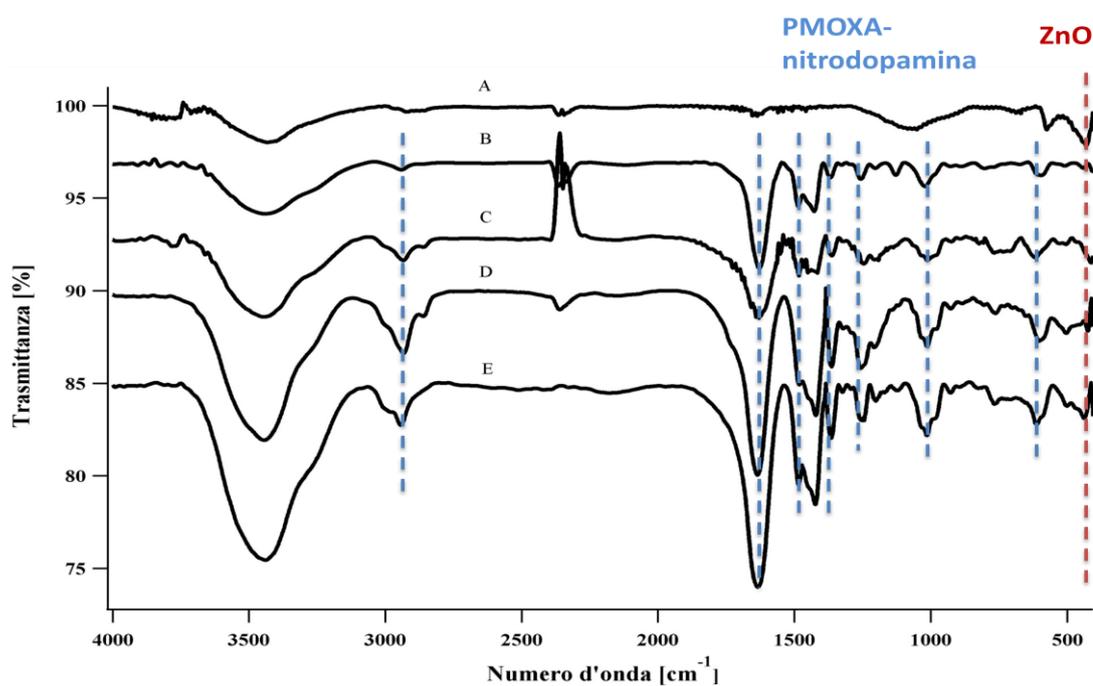


Figura 5.34 Spettri FT-IR delle nanoparticelle di ZnO non funzionalizzate (A), del legante di peso molecolare medio 4 kDa (B), di PMOXA_NDP_1 (C), di PMOXA_NDP_2 (D) e di PMOXA_NDP_3 (E).

La banda larga centrata a 3400 cm^{-1} , presente in tutti i prodotti di sintesi analizzati, è attribuibile in A allo stiramento del legame O-H dell'acqua adsorbita sulla superficie delle nanoparticelle non funzionalizzate e, negli altri casi, alla vibrazione del medesimo legame idrossilico non appartenente all'acqua ma riscontrabile come sostituito dell'anello

benzenico della nitrodopamina. Il picco a 437 cm^{-1} è, invece, relativo allo *stretching* del legame Zn-O, confrontabile con il dato di letteratura (457 cm^{-1} [Azam, 2009; Famengo, 2009]).

Considerando il legante, nella regione compresa tra 2900 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} sono osservabili le vibrazioni dei legami C-H metilici e metilenici della catena polimerica, mentre il picco intenso a 1627 cm^{-1} è attribuibile allo stiramento del legame C=O ammidico dell'unità monomerica. Le bande registrate intorno ai 1450 cm^{-1} sono di difficile attribuzione in quanto, in questa regione cadono le vibrazioni di *stretching* dei legami C=C aromatici e anche quelle di *bending* dei C-H metilenici della catena polimerica. Il picco a 1360 cm^{-1} è relativo allo stiramento simmetrico del gruppo nitro $-\text{NO}_2$ e la banda intorno ai 1000 cm^{-1} è attribuibile alle vibrazioni dei legami C-N dei gruppi ammidici e della piperidina, presenti in catena. [Silverstein, 2006]. L'assenza di picchi nella regione compresa tra i 1735 cm^{-1} e i 1750 cm^{-1} (attribuibili alle vibrazioni dei gruppi C=O esterei) permette di escludere la formazione di un estere dalla reazione tra PMOXA e nitrodopamina (Figura 5.35). L'eventuale formazione di questo prodotto andrebbe a ridurre la capacità della nitrodopamina di ancorarsi alla superficie della nanoparticella, in quanto un gruppo idrossilico risulterebbe impiegato nel legame con la catena e verrebbe meno la possibilità della nitrodopamina di comportarsi come legante chelante.

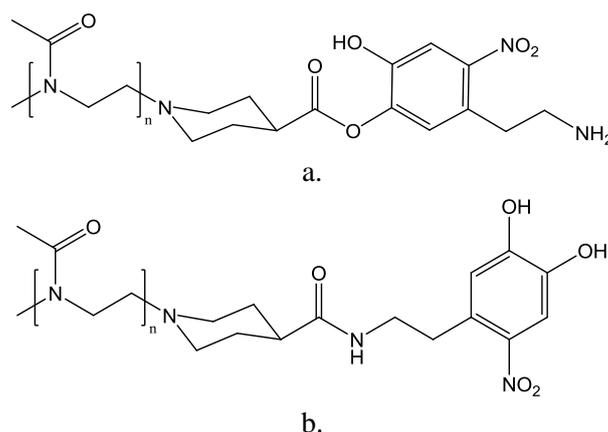


Figura 5.35 Rappresentazione dell'ipotetico sottoprodotto (a.) della reazione tra PMOXA e nitrodopamina, a confronto con il prodotto principale della medesima reazione (b.).

Il tensioattivo residuo è identificabile, nello spettro A in figura 5.34, con la banda che cade intorno ai 1100 cm^{-1} e attribuibile allo *stretching* asimmetrico del gruppo C-O-C del polietere [Silverstein, 2006]; l'assenza di tale banda negli spettri C,D,E della figura 5.34 e la comparsa in essi dei picchi relativi sia al polimero PMOXA_nitrodopamina sia alle vibrazioni Zn-O dell'ossido di zinco indica che il tensioattivo è stato completamente sostituito dal nuovo legante. Inoltre, dalla corrispondenza delle frequenze di risonanza dei gruppi funzionali del solo legante con quelle delle nanoparticelle funzionalizzate si deduce che la funzionalizzazione non influenza la forza dei legami della catena polimerica. Analoghe conclusioni non possono essere tratte per i legami dei sostituenti all'anello nella molecola di nitrodopamina ancorante, in quanto essi vibrano a frequenze che cadono sotto la banda allargata relativa ai legami O-H e non sono osservabili negli spettri registrati.

La funzionalizzazione con rapporti diversi ZnO/legante ha lo scopo di determinare la quantità di materiale organico legato alla superficie delle nanoparticelle, al fine di calcolare la densità numerica di molecole di legante per unità di superficie. Le analisi termogravimetriche (TGA) forniscono questo tipo di informazioni perché correlate alla

perdita di massa percentuale delle nanoparticelle. Dai profili termogravimetrici di tutte le nanoparticelle funzionalizzate ottenute si osserva una perdita di circa il 5% in massa nell'intervallo di temperatura compreso tra 30°C e 100°C, attribuibile al desorbimento dell'acqua presente in tracce nel campione. Fino a 300°C si osserva una perdita graduale di un ulteriore 15% circa in massa e, infine, tra i 350°C e i 400°C si ha riduzione netta della massa di entità variabile al variare dei rapporti ZnO/legante utilizzati.

Effettuando le analisi TGA anche sulle nanoparticelle non funzionalizzate e sui leganti polimerici tal quali sintetizzati, è possibile confrontare i residui sperimentali con i residui teoricamente previsti. Le eventuali differenze tra questi due dati portano a concludere che parte del legante introdotto non si è legato alla nanoparticella con conseguente saturazione della superficie della stessa. I calcoli effettuati per i sistemi sintetizzati sono riportati in tabella 5.10 e mostrano, nei limiti degli errori sperimentali, differenze tra residuo sperimentale e residuo teorico soltanto per PMOXA_NDP_7. Ciò indica che, in questo caso, si è raggiunta la saturazione della superficie della nanoparticella e, in particolare, il rapporto ZnO/legante corrispondente al completo ricoprimento superficiale è 1:10.

Esperimento	Residuo teorico (massa %)	Residuo sperimentale (massa %) (IC 99,9%)
PMOXA_NDP_1	33	36 ± 3
PMOXA_NDP_2	20	24 ± 3
PMOXA_NDP_3	5	5 ± 3
PMOXA_NDP_4	2	4 ± 3
PMOXA_NDP_5	33	38 ± 3
PMOXA_NDP_6	20	25 ± 3
PMOXA_NDP_7	5	16 ± 3

Tabella 5.10 Confronto tra risultati teorici e sperimentali ricavabili dalla TGA effettuata sulle nanoparticelle funzionalizzate al variare dei rapporti ZnO/legante. (Intervallo di confidenza al 99,9%).

Quanto ricavato dalle analisi TGA trova conferma nelle prove di ridispersione in H₂O Milli-Q delle nanoparticelle funzionalizzate: all'aumentare del rapporto legante/ZnO, aumenta la ridispersione delle nanoparticelle (Figura 5.36) e, con essa, la stabilità delle nanoparticelle in sospensione. Tali sospensioni appaiono ancora limpide e stabili a quattro mesi dalla preparazione.



a.



b.

Figura 5.36 Sospensioni delle nanoparticelle di ZnO funzionalizzate con il polimero di peso molecolare medio 2 kDa (a.) e 4 kDa (b.) in H₂O Milli-Q all'aumentare del rapporto legante/ZnO (da sinistra a destra).

Il tentativo di ridispersione delle stesse nanoparticelle in tampone fosfato salino PBS 1X (soluzione acquosa a pH 7.4 138 mM in NaCl, 2.7 mM in KCl, 8.1 mM in Na₂HPO₄ e 1.9 mM in K₂PO₄), funzionale alla preparazione di sospensioni analizzabili biologicamente in terreno di coltura cellulare, ha portato alla formazione di una sospensione instabile per rapida aggregazione e conseguente precipitazione delle nanoparticelle. Questo comportamento è dovuto principalmente alla forza ionica del tampone, pari a 162.7 mM e confrontabile con quella dei fluidi fisiologici [Lloret, 2013], che riduce la stabilità del legante polimerico e potrebbe anche indurre l'allontanamento dello strato polimerico dalla superficie [Pidhatika, 2012]. Quest'ultima ipotesi non è da escludere in quanto l'affinità tra molecola ancorante e nanoparticelle dipende dalla confrontabilità tra la pK_a della prima e il PZC delle seconde [Amstad, 2009]; poiché il PZC dell'ossido di zinco è 9.0 [Kansal, 2009] e la pK_a della nitrodopamina è 6.5 [Amstad, 2009], il legame di quest'ultima alla superficie potrebbe essere compromesso dalla concentrazione fisiologica degli ioni. In particolare, a forza ionica elevata, l'anione fosfato del tampone salino può sostituirsi alla molecola che funge da ancora, riducendo la repulsione sterica e promuovendo la flocculazione delle nanoparticelle per aumento delle interazioni di van der Waals [Miles, 2009]. Per ovviare a tali problemi si è proceduto disperdendo le nanoparticelle in acqua e introducendo gradualmente aliquote di tampone al fine di creare un ambiente simile a quello fisiologico, senza modificare le interazioni. Questa particolare procedura ha permesso di ottenere sospensioni stabili in condizioni fisiologiche.

Le nanoparticelle ridisperse in H₂O Milli-Q sono state analizzate mediante misure di *Dynamic Light Scattering* (DLS) al fine di determinarne il diametro idrodinamico e di valutare l'influenza della lunghezza delle catene del legante e del rapporto ZnO/polimero sulle dimensioni delle nanoparticelle. I valori di diametro idrodinamico medio, ottenuti per i sette esperimenti effettuati, sono riportati in tabella 5.11 e non è possibile valutarne l'attendibilità in quanto la presenza del guscio polimerico non permette un confronto con la dimensione media delle particelle non funzionalizzate, calcolata mediante formula di Scherrer da analisi XRD. Inoltre non risulta possibile nemmeno un confronto con il diametro idrodinamico medio delle nanoparticelle di ossido di zinco stabilizzate dalla miscela di tensioattivi usati durante la sintesi, misurato mediante DLS. Tale analisi viene, infatti, condotta in solvente apolare e la dimensione delle micelle inverse non è correlabile a quella delle micelle dirette.

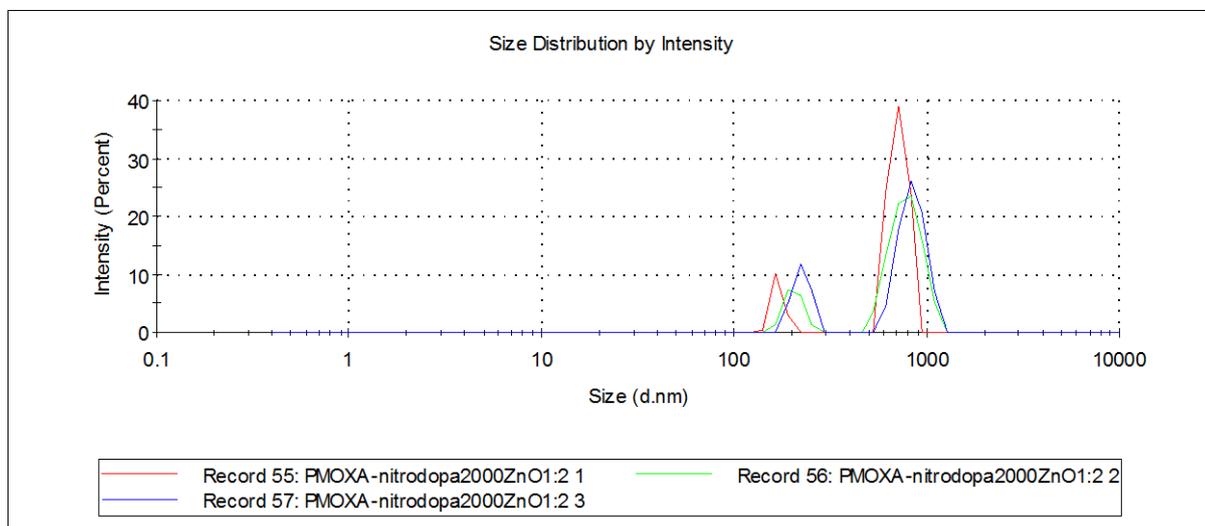
Considerando separatamente le nanoparticelle funzionalizzate con il legante a peso molecolare medio maggiore da quelle leganti il polimero a peso molecolare medio ridotto, è possibile osservare che, all'aumentare dei rapporti polimero/ZnO, le dimensioni medie delle nanoparticelle in sospensione diminuiscono. Poiché dalle analisi TGA è emerso che tutto il polimero introdotto si lega alla superficie delle nanoparticelle, i risultati ottenuti dal DLS risultano in linea con le aspettative: più numerose sono le molecole ancorate alla superficie delle particelle, più efficiente risulta la loro stabilizzazione e meno probabile risulta l'aggregazione per prevalenza della repulsione. La lunghezza delle catene, invece, non sembra influire sulla dimensione e sulla distribuzione dimensionale delle nanoparticelle funzionalizzate. Questo dato può essere spiegato considerando che, a parità di rapporto in massa e supponendo, come dimostrato dalla TGA, che tutto il legante introdotto si ancori alla superficie, lo strato di molecole di polimero a peso molecolare medio minore è più denso rispetto a quello formato dal legante di massa maggiore, in quanto le prime sono numericamente di più. La maggiore densità superficiale, infatti, può bloccare la crescita via *Ostwald ripening* e inibire la tendenza a coalescere delle nanoparticelle disperse.

Esperimento	Rapporto in peso ZnO:polimero	Distribuzione dimensionale per intensità	Distribuzione dimensionale per numero
		Diametro idrodinamico medio [nm](intensità)	Diametro idrodinamico medio [nm](intensità)
PMOXA_NDP_1 (4 kDa)	1:2	706 ± 29 (100%)	705 ± 31 (100%)
PMOXA_NDP_2 (4 kDa)	1:4	494 ± 23(44%)/311 ± 82(56%)	479 ± 24 (13%)/303 ± 78(87%)
PMOXA_NDP_3 (4 kDa)	1:20	469 ± 76(89%)/135 ± 35(11%)	452 ± 66(6%)/127 ± 29(94%)
PMOXA_NDP_4 (4 kDa)	1:50	161 ± 89(100%)	159 ± 89(100%)
PMOXA_NDP_5 (2 kDa)	1:2	785 ± 66(87%)/199 ± 28(13%)	777 ± 63(20%)/195 ± 25(80%)
PMOXA_NDP_6 (2 kDa)	1:4	724 ± 8(72%)/191 ± 3(28%)	720 ± 9(11%)/186 ± 3(89%)
PMOXA_NDP_7(2 kDa)	1:20	464 ± 68(91%)/128 ± 37(9%)	461 ± 73(8%)/127 ± 39(92%)

Tabella 5.11 Diametri idrodinamici medi delle nanoparticelle funzionalizzate ridisperse in H₂O Milli-Q (l'errore è la deviazione standard sulle misure effettuate).

Dai grafici DLS ottenuti, di cui si riporta un esempio in figura 5.37, si osserva che, in tutti i casi tranne per PMOXA_NDP_1 e PMOXA_NDP_4, la distribuzione dimensionale risulta bimodale ad indicare la presenza di centri di *scattering* con due diametri idrodinamici medi diversi. Questi picchi differiscono tra loro per intensità: in particolare, le nanoparticelle più grandi scatterano più luce rispetto a quelle di dimensioni minori. Tale evidenza sperimentale trova spiegazione nell'approssimazione di Rayleigh, secondo la quale l'intensità di *scattering* di una particella è direttamente proporzionale alla sesta potenza del suo diametro. Considerando la distribuzione dimensionale per numero (Figura 5.37b), l'andamento bimodale risulta mantenuto ma le nanoparticelle di dimensioni più grandi sono in numero ridotto rispetto alle altre e tale risultato può essere spiegato supponendo che il più probabile fenomeno di crescita sia l'*Ostwald ripening*.

a.



b.

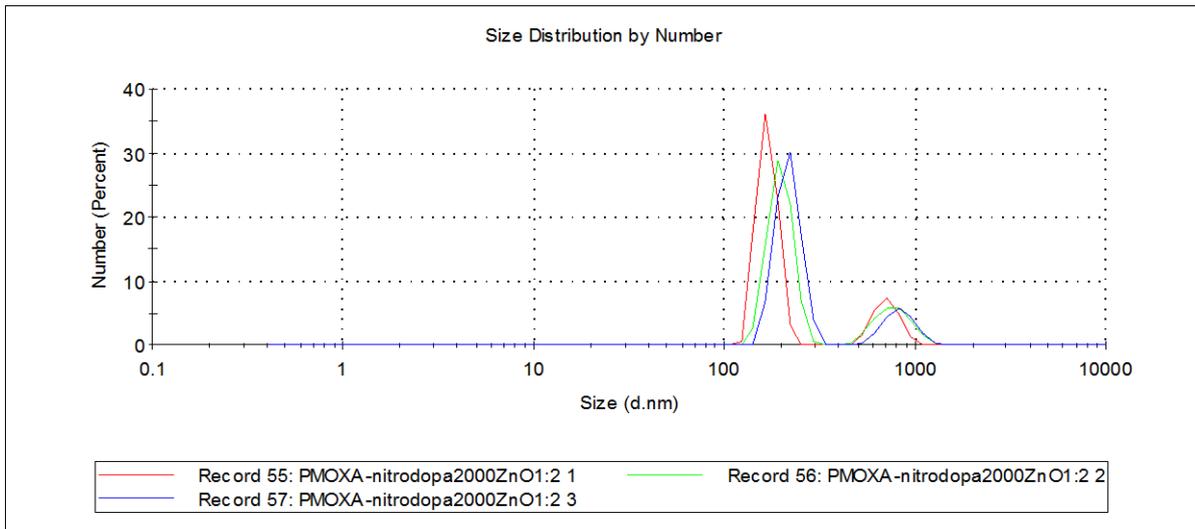


Figura 5.37 Grafici DLS per intensità e numero di PMOXA_NDP_5 (a. e b.).

Le immagini AFM condotte su tutti i campioni di NPs funzionalizzate confermano l'andamento decrescente delle dimensioni delle strutture ottenute all'aumentare della quantità di legante costituente il guscio polimerico superficiale (stabilizzante). Inoltre, da esse è possibile valutare l'effettiva presenza di NPs funzionalizzate di diverse dimensioni, soprattutto nei campioni sintetizzati utilizzando rapporti legante/ZnO bassi.

In particolare NPs stabilizzate dal legante avente peso molecolare medio di circa 2 kDa mostrano la presenza di aggregati presumibilmente derivanti dall'interazione tra le diverse NPs che non sono completamente funzionalizzate dal polimero. Questo fenomeno diminuisce con l'aumentare della concentrazione di legante (campioni PMOXA_NDP_5 e PMOXA_NDP_6, Figura 5.38 a e b). Infatti, per i campioni PMOXA_NDP_7 (1:20) si evidenzia un'uniforme dispersione particellare (Figura 5.39), in analogia con quanto atteso per questi campioni specifici dai risultati delle analisi TGA.

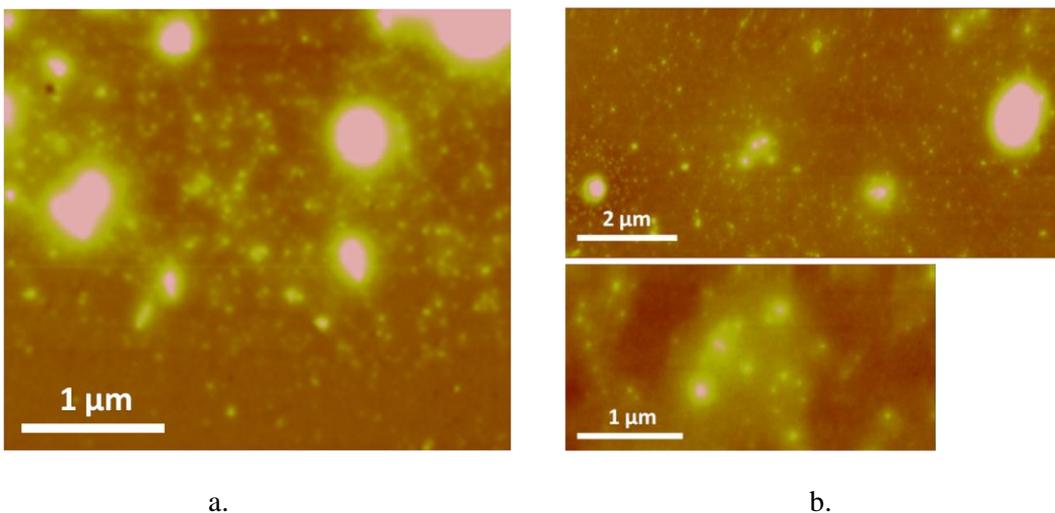


Figura 5.38 Immagini AFM dei campioni PMOXA_NDP_5 (a.) e PMOXA_NDP_6 (b.).

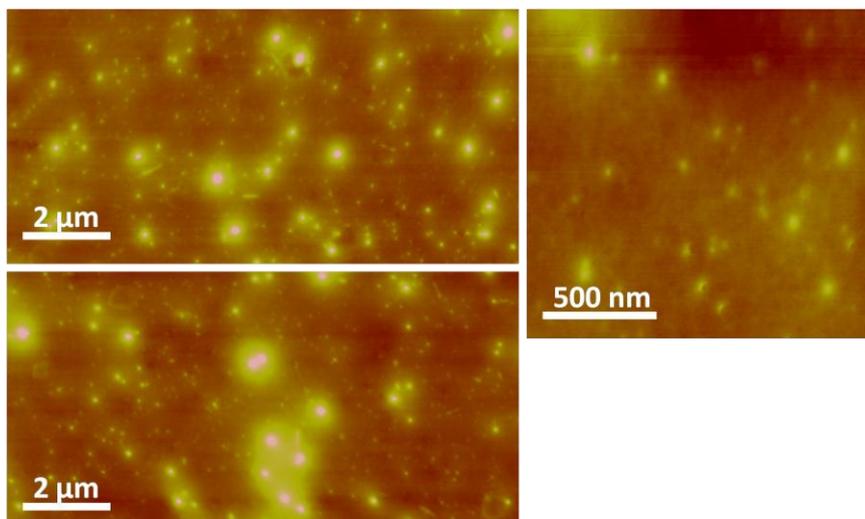


Figura 5.39 Immagini AFM del campione PMOXA_NDP_7.

Tale comportamento viene confermato nei campioni di NPs funzionalizzate mediante legante avente peso molecolare medio di circa 4 kDa. Come si può riscontrare nelle figure 5.40 e 5.41, per i campioni PMOXA_NDP_1 e PMOXA_NDP_2 si osserva la presenza di aggregati di NPs con spessori medi fino a 1 μm, dovuti, analogamente al caso precedente, all'incompleto rivestimento superficiale. All'aumentare della concentrazione di legante aggiunto, le NPs vengono efficientemente disperse come risulta evidente nelle figure 5.42 e 5.43 per i campioni PMOXA_NDP_3 e PMOXA_NDP_4.

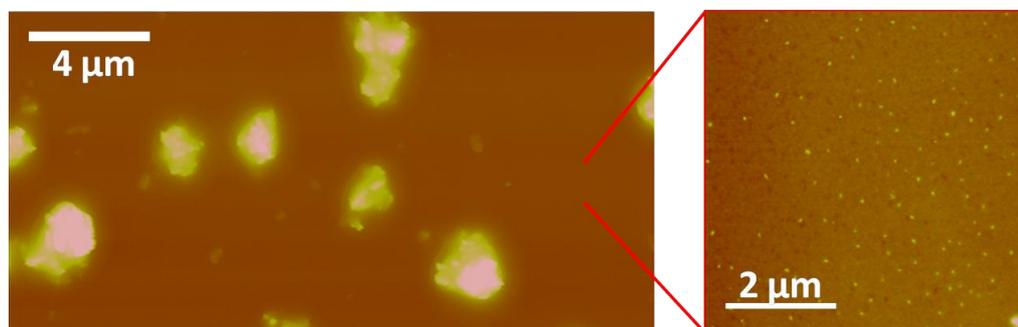


Figura 5.40 Immagini AFM del campione PMOXA_NDP_1.

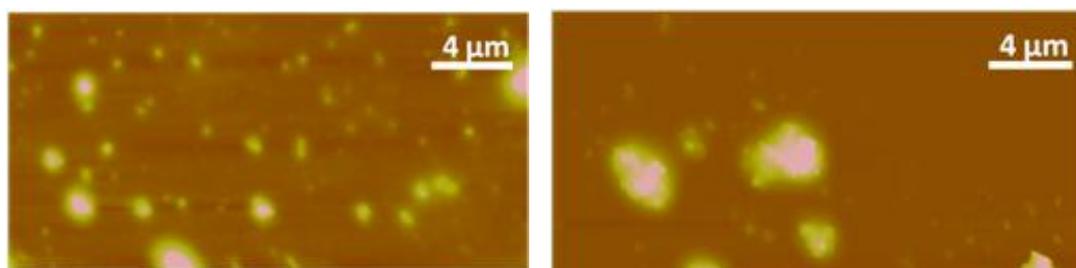


Figura 5.41 Immagini AFM del campione PMOXA_NDP_2.

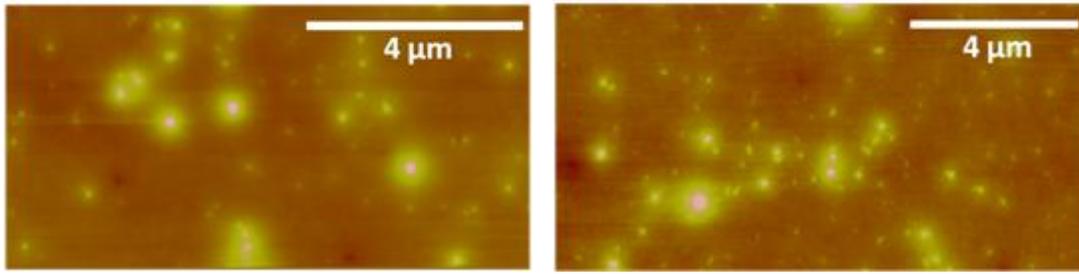


Figura 5.42 Immagini AFM del campione PMOXA_NDP_3.

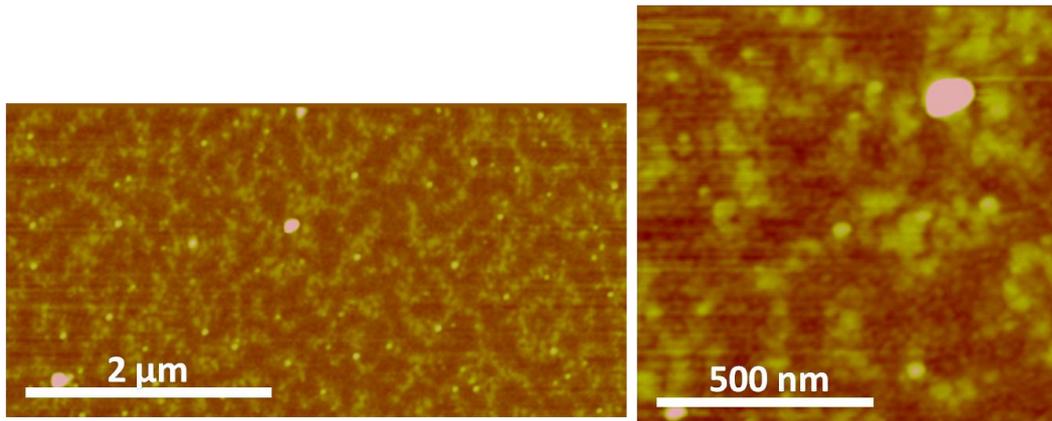


Figura 5.43 Immagini AFM del campione PMOXA_NDP_4.

Infine, confrontando le dimensioni delle strutture osservabili via AFM con quelle ricavate dalle analisi DLS si nota che esse risultano paragonabili per i campioni più uniformemente dispersi (PMOXA_NDP_3, PMOXA_NDP_4 e PMOXA_NDP_7).

Capitolo 6

Tecniche di caratterizzazione

6.1 Caratterizzazione chimico-fisica e strutturale

6.1.1 Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier è una tecnica analitica utilizzata principalmente per determinare i gruppi funzionali costituenti la molecola in esame, in quanto gruppi funzionali diversi vibrano a frequenze caratteristiche della radiazione infrarossa e possono essere distinti gli uni dagli altri [Griffiths, 2007].

Nel presente lavoro di tesi, tale tecnica è stata utile per valutare l'eventuale presenza di residui di tensioattivo organico sulla superficie delle nanoparticelle sintetizzate e per determinare l'avvenuta sostituzione di quest'ultimo con il legante polimerico atto a renderle disperdibili in acqua. Le analisi sono state condotte presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova in trasmissione su pastiglie di campione disperso in KBr anidro, usando uno spettrofotometro NEXUS 870 FT-IR (NICOLET), operante nell'intervallo di numeri d'onda compreso tra 400 e 4000 cm^{-1} , con risoluzione di 4 cm^{-1} e raccogliendo 32 scansioni.

6.1.2 Spettroscopia Micro-Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica analitica che fornisce informazioni simili a quelle ottenibili via FT-IR poiché è sensibile ai modi vibrazionali della molecola in esame. Al contrario della spettroscopia infrarossa tuttavia le bande relative alle vibrazioni di legame non derivano da una variazione del momento di dipolo molecolare, ma da variazioni di polarizzabilità [McCreery, 2005]. Le due tecniche citate possono essere considerate complementari in quanto modi vibrazionali non osservabili con una possono essere rivelabili con l'altra. La spettroscopia Raman misura lo *scattering* anelastico della radiazione elettromagnetica nell'intervallo di numeri d'onda compreso tra i 50 e i 4000 cm^{-1} e, poiché l'intensità della luce diffusa è molto bassa, la sorgente di radiazione è generalmente un laser monocromatico.

In spettroscopia Micro-Raman, lo spettrometro è accoppiato ad un microscopio, rendendo possibili misure sistematiche in punti diversi del campione al fine di ricavarne una mappa compositiva.

In questo elaborato di tesi, la spettroscopia Micro-Raman è stata utilizzata su campioni di nanoparticelle di solfuro di rame(II) al fine di valutarne, per confronto con la letteratura, la composizione escludendo la presenza in essi di impurezze. I campioni sono stati analizzati con microscopio Raman Thermo Scientific DXR del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, usando come sorgente di eccitazione un laser a lunghezza d'onda di 780 nm.

6.1.3 Spettroscopia NMR

Il fenomeno della risonanza magnetica nucleare (NMR) è tipico dei nuclei dotati di spin, immersi in un campo magnetico ed esposti a radiofrequenze. Radiazioni di opportuna energia vengono assorbite dai nuclei, in misura dipendente dal tipo di nucleo e dal suo intorno chimico. La spettroscopia NMR sfrutta tale fenomeno per ricavare la struttura della molecola analizzata [Ernst, 1987]. Tra i nuclei dotati di spin, i più studiati sono ^1H e ^{13}C e, in questo lavoro di tesi, l'analisi si è limitata all'acquisizione e interpretazione di spettri relativi al protone ^1H .

In particolare, tale analisi non è stata condotta sulle nanoparticelle di ossido di zinco, ma unicamente sul legante polimerico utilizzato per la loro funzionalizzazione. I prodotti di ogni singolo stadio della reazione di sintesi del legante sono stati caratterizzati via NMR al fine di confermarne la struttura e la tecnica è risultata utile anche per la determinazione della lunghezza della catena polimerica. Le analisi sono state effettuate con uno spettrometro Bruker Avance 300 MHz del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, utilizzando come solventi CDCl_3 o D_2O a seconda del prodotto esaminato.

6.1.4 Spettroscopia di assorbimento di raggi X (XAS)

La spettroscopia di assorbimento di raggi X si basa sull'attenuazione subita dal fascio (monocromatico) di raggi X in seguito al passaggio attraverso il campione di interesse. In generale, il coefficiente di attenuazione della radiazione $\mu(E)$ diminuisce all'aumentare dell'energia del fascio incidente, come si può vedere in figura 6.1. Tale andamento presenta delle discontinuità in corrispondenza delle soglie di assorbimento (*edge*), ovvero a quelle energie sufficienti ad estrarre un elettrone dalle sfere più interne dell'atomo (soglie K e L_{1-3} , corrispondenti ad eccitazioni degli stati $1s$, $2s$, $2p_{1/2}$ e $2p_{3/2}$). Un ulteriore incremento dell'energia del fascio incidente oltre la soglia determina, nel caso di atomi isolati, nuovamente una diminuzione monotona del valore del coefficiente (Figura 6.1 a.). In presenza di atomi vicini, tuttavia, si osserva una modulazione di $\mu(E)$, che si può protrarre anche fino a circa 1000 eV oltre la soglia (Figura 6.1 b.) [Bauer, 2007].

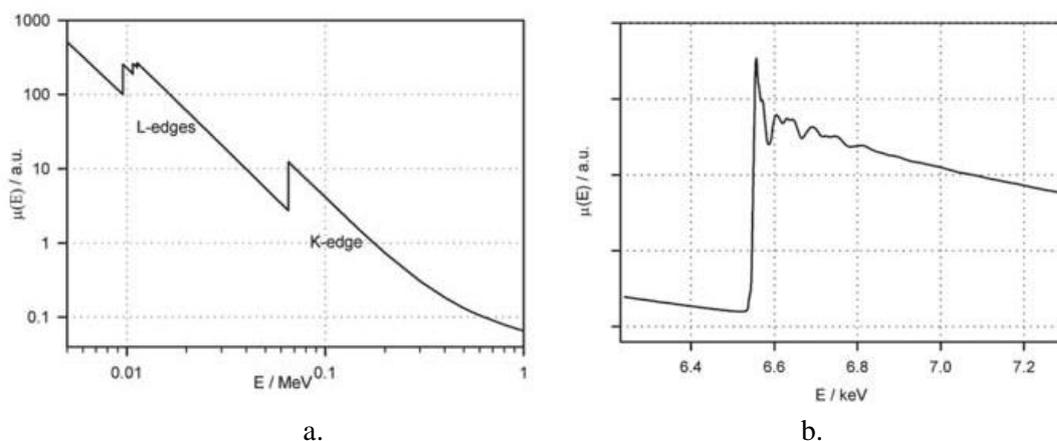


Figura 6.1 Dipendenza del coefficiente di assorbimento di un atomo isolato (a.) e di un atomo inserito in un intorno chimico (b.) dall'energia del fascio incidente.

Questa modulazione nasce dal fatto che, in presenza di atomi vicini, il fronte d'onda del fotoelettrone emesso viene retrodiffuso da tali atomi, per cui si instaurano fenomeni di interferenza con i successivi fronti d'onda, che danno origine alle oscillazioni osservate, espresse dall'equazione seguente:

$$\chi(k) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E)} = \sum_j S_0 \frac{N_j}{kr_j^2} F_j(k) e^{-2\sigma_j^2 k^2} e^{-\frac{2r_j}{\lambda(k)}} \sin[2kr_j + \varphi_{ij}(k)]$$

dove $\chi(k)$ è la funzione di struttura fine EXAFS, k è il numero d'onda del fotoelettrone, $\mu(E)$ è il coefficiente di attenuazione sperimentale, $\mu_0(E)$ è il corrispondente coefficiente per un atomo isolato, j è il j -esimo atomo *backscatterante*, S_0 è il fattore di riduzione dell'ampiezza, N è il numero medio di atomi di tipo j contenuti in un guscio di atomi identici, r è la loro distanza media, $e^{-2\sigma_j^2 k^2}$ è il fattore di temperatura o termine di Debye-Waller (con σ_j^2 pari allo scostamento quadratico medio associato alle vibrazioni atomiche attorno alla posizione di equilibrio per l'atomo j -esimo) e F e φ rappresentano l'ampiezza e lo sfasamento del *backscattering* (che sono specifici di ogni elemento) [Newville, 2004].

Uno spettro di assorbimento di raggi X si può dividere in due zone: una prima zona che va dalla soglia di assorbimento fino a circa 50 eV dopo, detta *X-ray Absorption Near Edge Structure* (XANES, *or Near Edge X-ray Absorption Fine Structure*, NEXAFS), ed una seconda, che si estende fino ad anche 1000 eV oltre la soglia, detta *Extended X-ray Absorption Fine Structure* (EXAFS) [Bauer, 2007].

La zona XANES è utile per ricavare informazioni riguardo allo stato di ossidazione e geometria di coordinazione dell'atomo di interesse, mentre la spettroscopia EXAFS fornisce informazioni sull'intorno chimico, determinando numero e natura dei primi vicini, distanze interatomiche e disordini strutturali [Koningsberger, 1988]. A differenza della diffrazione di raggi X, tale tecnica spettroscopica è applicabile anche a campioni amorfi ed in fase solida, liquida e gassosa.

In questo progetto di tesi, le nanoparticelle di solfuro di rame(II) sia puro che drogato con ioni dei lantanidi sono state analizzate via XAS presso le beamline XAFS del Sincrotrone Elettra di Basovizza (TS) (soglia K dello zolfo) e SuperXAS del sincrotrone Swiss Light Source di Zurigo (soglie di Cu, Mn, Gd, Eu, Sm, Tb). I campioni sono stati preparati su membrana, effettuando le misure alla soglia K dello zolfo, del rame, del manganese e alla soglia L_3 dei lantanidi (Gd, Eu, Sm, Tb) e misurati a temperatura ambiente.

6.1.5 Spettroscopia fotoelettronica di raggi X (XPS)

La spettroscopia elettronica di raggi X (XPS) o spettroscopia elettronica per analisi chimiche (ESCA) misura l'energia cinetica dei fotoelettroni emessi dagli strati superficiali del campione in seguito ad irraggiamento con raggi X molli (200-2000 eV). Al fine di minimizzare le contaminazioni della superficie e di ridurre le collisioni degli elettroni emessi nel cammino percorso dal campione al rivelatore, l'analisi viene condotta in condizioni di ultra alto vuoto (UHV), a pressioni di circa 10^{-7} Pa [Briggs, 1990].

La tecnica si basa sull'effetto fotoelettrico che si osserva quando un materiale viene colpito da una radiazione elettromagnetica di energia sufficientemente alta ($E = h\nu$) da determinare assorbimento di un fotone e promozione di un elettrone ad un livello non occupato o sua emissione come fotoelettrone (Figura 6.2) [Einstein, 1905].

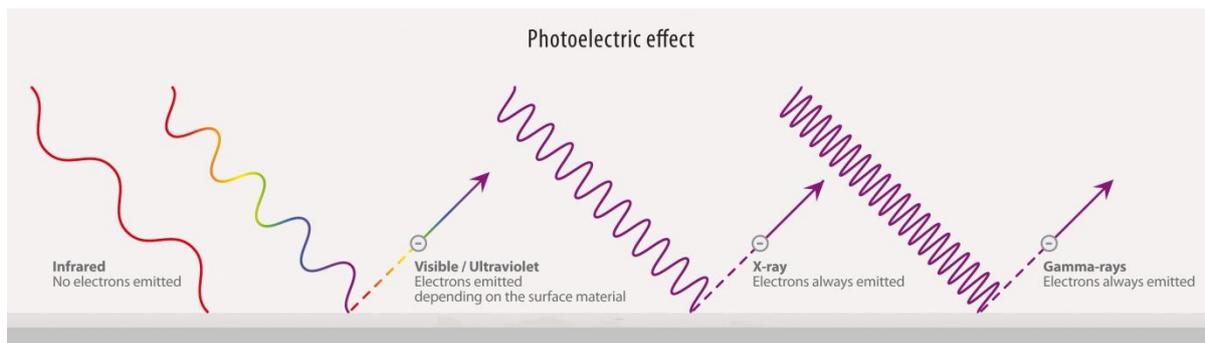


Figura 6.2 Effetto fotoelettrico al variare dell'energia del fascio incidente.

Quest'ultimo fenomeno rappresenta il processo di fotoionizzazione, indotto in spettroscopia XPS al fine di ottenere informazioni sulla composizione superficiale del campione. I fotoni assorbiti, infatti, determinano ionizzazione e emissione degli elettroni dei livelli energetici più interni (*core*) dell'atomo (Figura 6.3) e, poiché, per ogni elemento esiste una specifica energia di legame associata ad ogni orbitale atomico del *core*, diventa possibile l'identificazione degli atomi colpiti dalla radiazione.

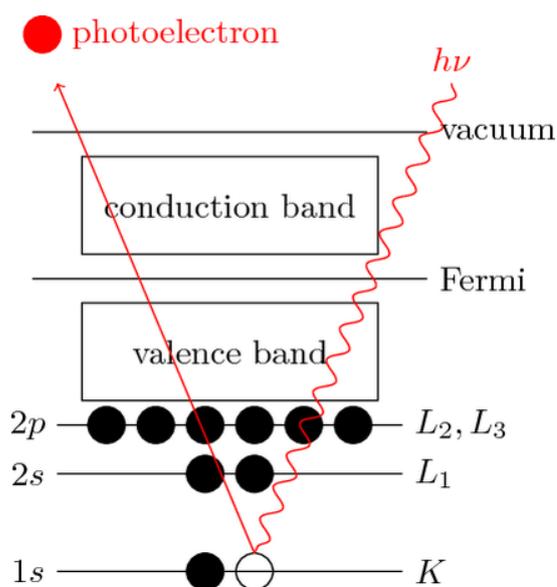
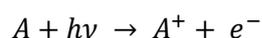


Figura 6.3 Rappresentazione del processo di fotoemissione in XPS.

Considerando un generico atomo A, il processo di ionizzazione può essere descritto come segue:



Applicando il principio di conservazione di energia si ottiene:

$$E(A) + h\nu = E(A^+) + E(e^-)$$

e poiché l'energia dell'elettrone $E(e^-)$ è solamente di tipo cinetico (KE), l'equazione precedente si può esprimere in funzione di quest'ultima grandezza:

$$KE = h\nu - [E(A^+) - E(A)]$$

e il termine tra parentesi quadre corrisponde alla differenza di energia tra l'atomo ionizzato e l'atomo stesso nel suo stato fondamentale, che viene definita energia di legame (BE) dell'elettrone e determina ulteriore riarrangiamento dell'equazione a:

$$KE = h\nu - BE$$

Poiché le energie di legame nei solidi vengono misurate facendo riferimento all'energia del livello di Fermi, il bilancio energetico del processo deve tener conto anche della funzione lavoro ϕ_s del solido:

$$KE = h\nu - BE - \phi_s$$

Nota l'energia della radiazione incidente, dal valore sperimentale dell'energia cinetica dell'elettrone emesso è possibile ricavare l'energia di legame di quest'ultimo ma, perché avvenga il fenomeno della fotoemissione, è necessario che i raggi X impiegati possiedano energia superiore a quella di legame.

I raggi X hanno capacità di penetrazione di qualche μm [Hercules, 1992], ma il cammino libero degli elettroni è ridotto a pochi nm per fenomeni di diffusione da parte degli atomi del solido e al rivelatore giungono solamente gli elettroni appartenenti agli strati superficiali, conferendo quindi elevata sensibilità superficiale alla tecnica.

Nello spettro fotoelettronico, di cui in figura 6.4 è riportato un esempio, si osservano picchi in corrispondenza di specifiche energie di legame. Ogni picco è attribuibile ad un elemento costituente la superficie del campione e la sua energia di legame è influenzata dallo stato di ossidazione dell'atomo e dal suo intorno chimico. L'area di tali picchi varia in funzione della concentrazione dell'elemento, rendendo l'analisi semi-quantitativa e la sensibilità della tecnica permette di identificare tutti gli elementi, tranne He e H, presenti in percentuale atomica superiore o uguale allo 0.5%.

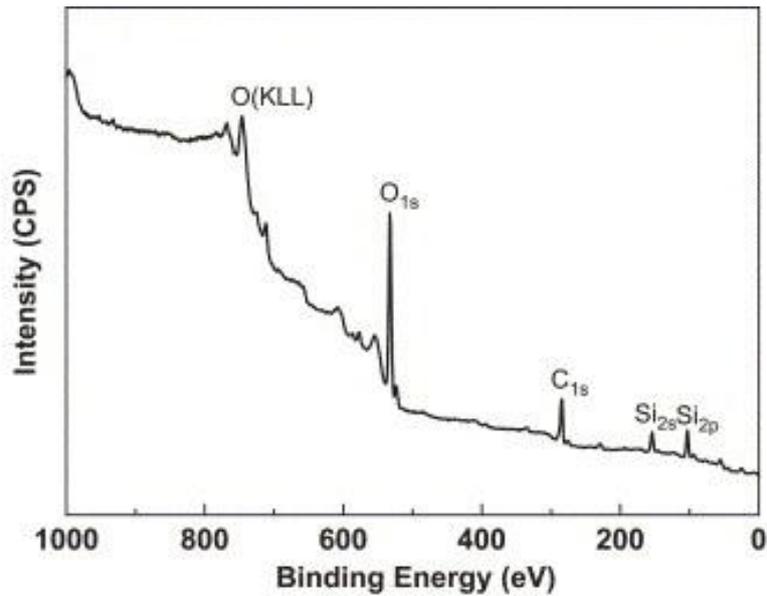


Figura 6.4 Esempio di spettro fotoelettronico XPS.

Esiste una relazione che correla l'area dei picchi con la concentrazione degli atomi presenti:

$$C_i = 100 \frac{A_i}{S_i} \left(\sum_j \frac{A_j}{S_j} \right)^{-1}$$

dove C_i è la concentrazione incognita, A_j è l'area sperimentale del picco e S_j è il fattore di sensibilità, correlato alla sezione d'urto.

In seguito all'eccitazione, le lacune lasciate nel campione dall'elettrone emesso possono essere riempite da elettroni appartenenti ai livelli a energia più alta mediante processi di decadimento radiativo o non radiativo (Figura 6.5). Il primo fenomeno si traduce in emissione dell'eccesso di energia sottoforma di fotoni (fluorescenza di raggi X), mentre il secondo prevede rilassamento del sistema per emissione di un elettrone secondario (emissione Auger).

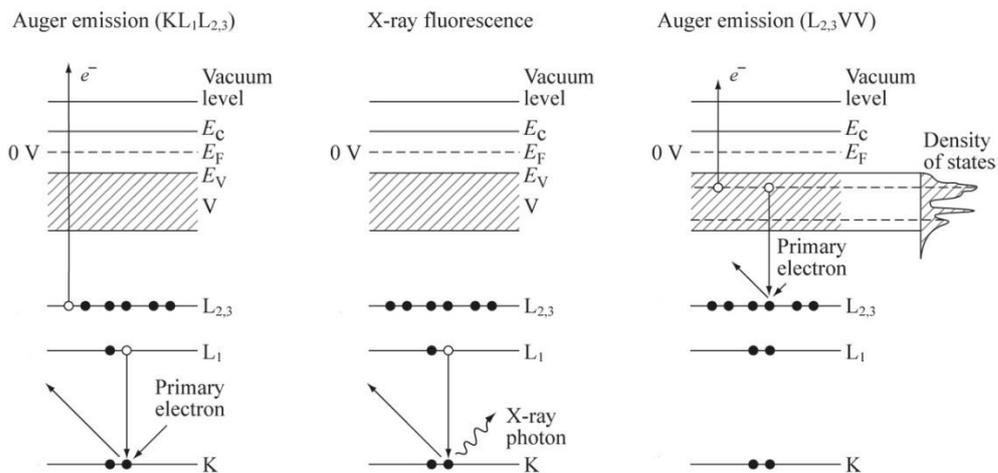


Figura 6.5 Processi di decadimento.

In uno spettro fotoelettronico è possibile distinguere picchi dovuti alla fotoemissione e picchi derivanti da emissioni Auger. La presenza di picchi ulteriori è attribuibile a eccitazioni multiple che determinano anche modifica dei profili dei picchi. Un esempio di tali fenomeni è rappresentato, nei materiali semiconduttori, dalla formazione di picchi satelliti di tipo “shake-up” o “shake-off”, dovuti rispettivamente ad un secondo elettrone che passa dalla banda di valenza a quella di conduzione o che viene estratto dalla banda di valenza [Feldman, 1986].

La determinazione dello stato di ossidazione di una specie costituente il campione è possibile tramite calcolo del parametro Auger (α), definito come somma dell'energia di legame (BE) del picco relativo alla fotoemissione e dell'energia cinetica (KE) del picco relativo all'emissione Auger della specie in esame [Wagner, 1972]. Questo parametro fornisce anche informazioni sulle caratteristiche fisico-chimiche del legame della specie considerata con gli atomi del composto analizzato [Oswald, 2003].

In seguito all'irraggiamento e alla fotoemissione, la superficie del campione può subire effetti di caricamento che determinano spostamenti nella posizione dei picchi fino a qualche eV. Tali effetti possono essere ridotti introducendo nel sistema di misura un neutralizzatore che irradia la superficie con elettroni a bassa energia oppure essere eliminati in fase di elaborazione dei dati, utilizzando come valore di riferimento noto l'energia di legame del picco 1s del carbonio, presente come contaminazione superficiale (248.6 eV) [Moulder, 1992] e calcolando da esso l'entità del caricamento pari a $|BE_{C1s} - 284.6|$, dove il primo termine dell'equazione è il dato sperimentale di energia di legame del picco relativo al C1s.

In questo elaborato di tesi le analisi sono state condotte sui campioni di solfuro di rame(II) nanostrutturati sia puri sia drogati, al fine di determinarne la composizione superficiale. Per ottenere tali informazioni si è utilizzato uno spettrometro Φ 5600ci della Perkin-Elmer del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, dotato di un doppio anodo Mg-Al come sorgente di raggi X. Magnesio e alluminio sono i due materiali universalmente usati come anodi nelle sorgenti di raggi X molli (Mg K_{α} = 1253.6 eV, FWHM = 0.70 eV; Al K_{α} = 1486.6 eV, FWHM = 0.85 eV) e, per analizzare i campioni sintetizzati, è stata utilizzata la sorgente standard di Al. L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante il programma HTIS Lab XPS_AES v. 4.7, mentre il *fitting* dei picchi è stato eseguito utilizzando il programma XPSPEAK 4.1.

6.1.6 Diffrazione di raggi X (XRD)

La diffrazione di raggi X (XRD) è una tecnica non distruttiva [Warren, 1990] che fornisce informazioni sulla struttura dei solidi cristallini e sulle dimensioni dei cristalliti. La diffrazione è un fenomeno che deriva dall'interazione della radiazione elettromagnetica con strutture periodiche. Le distanze interatomiche nei cristalli sono dell'ordine dei 0.15-0.4 nm e risultano confrontabili con la lunghezza d'onda dei raggi X aventi energie comprese tra i 3 e gli 8 keV.

Quando un campione viene colpito con un fascio di raggi X aventi lunghezza d'onda confrontabile con la distanza tra i piani atomici del suo reticolo cristallino, la radiazione subisce diffusione elastica con conseguente variazione di direzione e conservazione dell'energia. Considerando che i) tutti i fotoni del fascio incidente abbiano stessa lunghezza d'onda e stessa fase e che ii) ogni atomo abbia distribuzione elettronica sferica, le nubi elettroniche degli atomi costituenti il campione rappresentano i centri di diffusione. Inoltre, se il campione è cristallino, le nubi elettroniche sono disposte nello spazio in maniera

regolare e la radiazione diffusa dai piani atomici del cristallo dà origine a interferenze costruttive solo quando risulta verificata la legge di Bragg:

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

dove d_{hkl} rappresenta la distanza tra i piani reticolari, ϑ è l'angolo di incidenza della radiazione, n è l'ordine di diffrazione e λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente. Il diffrattometro è costituito da una sorgente di raggi X, da un portacampioni e da un rivelatore, disposti in geometria opportuna (Figura 6.6).

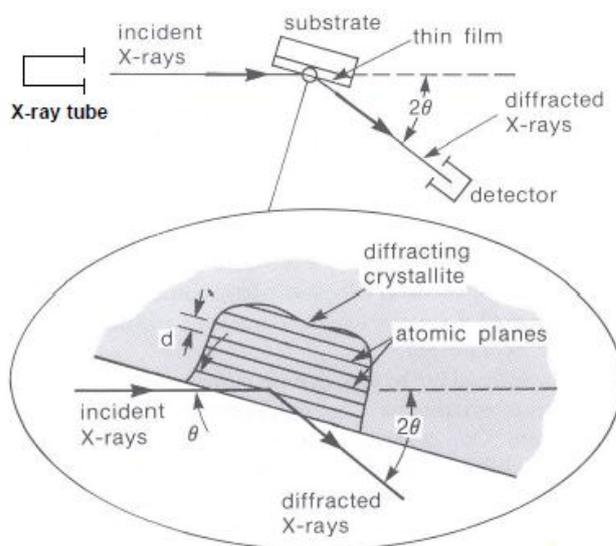


Figura 6.6 Rappresentazione di un diffrattometro di raggi X.

Per l'analisi su polveri, impiegata nel presente elaborato di tesi, la geometria usata è la Bragg-Brentano in cui si ha movimento reciproco di due componenti su tre (sorgente/campione e detector) e tutto il sistema è collocato su un goniometro che funge contemporaneamente da supporto e da regolatore della rotazione dei componenti mobili.

Da una misura XRD si ottiene un diffrattogramma costituito da una serie di riflessi che permettono l'identificazione della forma cristallina del composto in esame e l'eventuale determinazione della copresenza di ulteriori fasi cristalline. Ogni riflesso è poi attribuibile ad uno specifico piano cristallografico in base alla posizione e all'intensità relativa. Dall'ampiezza del riflesso più intenso, invece, è possibile ricavare la dimensione dei cristalliti, applicando la formula di Scherrer [Scherrer, 1918]:

$$D = K \frac{\lambda}{\beta \cos \vartheta}$$

dove D è la dimensione media dei cristalliti, K è una costante adimensionale correlate alla forma della cella cristallina, λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente, β è l'ampiezza del riflesso, anche detta FWHM (*Full Width at Half Maximum*), espressa generalmente in radianti e ϑ è la posizione del riflesso (angolo di Bragg).

In questo lavoro di tesi, la diffrazione di raggi X è stata condotta su tutti in campioni di solfuri nanostrutturati, sintetizzati via miniemulsione al fine di valutarne la cristallinità, di

identificarne la fase cristallina e di escludere la presenza di fasi indesiderate. I diffrattogrammi sono stati acquisiti nell'intervallo 10°-80° con passo di 0.03° e tempo per passo di 7 secondi, mediante diffrattometro Bruker D8 Advance del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, usando una radiazione incidente CuK_α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). L'accuratezza angolare è di 0.001° e la risoluzione angolare inferiore a 0.01°.

6.1.7 Analisi termogravimetrica (TGA) e Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

L'analisi termogravimetrica misura la variazione di massa di un campione all'aumentare della temperatura, in atmosfera controllata. Si tratta di una tecnica quantitativa e non fornisce informazioni sulla composizione del campione. Il cuore dello strumento di analisi è costituito da una bilancia che viene inserita in un forno; un sistema di gas di spurgo garantisce l'atmosfera richiesta per l'analisi e la massa del campione viene continuamente monitorata. Nella calorimetria a scansione differenziale, il campione e un riferimento sono sottoposti al medesimo programma di temperatura e si misura la differenza di flusso di calore da fornire al campione perché mantenga la stessa temperatura del riferimento. A differenza della TGA, da tali misure si ricavano informazioni riguardanti le transizioni di fase del campione, quali cristallizzazione, fusione e transizione vetrosa. Nel termogramma risultante compare un picco in corrispondenza di ognuna di queste transizioni e la loro natura può essere determinata da anomalie lungo la linea di base (nel caso delle transizioni vetrose) o dalla forma dei picchi. Trasformazioni esotermiche e endotermiche differiscono, infatti, per la direzione del picco: alle une corrisponderanno picchi positivi e alle altre negativi o viceversa.

In questo progetto di tesi, tale tecnica è stata utilizzata per due scopi differenti: effettuandola sulle nanoparticelle di solfuro di rame(II), si è potuto determinare la percentuale in massa del tensioattivo rimasto fisisorbito sulla superficie; conducendola, invece, sulle nanoparticelle funzionalizzate con il legante polimerico, è risultato possibile quantificare il legante necessario a ricoprire completamente la superficie delle particelle. Le analisi sono state effettuate mediante termobilancia LabSys Setarm SDT 2960 della TA Instrument presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, in intervallo di temperatura compreso tra 20 °C e 800 °C, in atmosfera inerte di azoto e con velocità di riscaldamento di 10 °C/min.

6.1.8 Spettroscopia di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)

La spettrometria di massa in sorgente a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) è una tecnica relativamente recente, utilizzata per l'analisi elementare dei campioni. A differenza delle altre tecniche esistenti per tale scopo, l'ICP-MS può determinare contemporaneamente la presenza e la quantità di più elementi costituenti il campione, anche qualora essi siano in concentrazioni dell'ordine delle parti per bilione (ultratracce) [Manahan, 1986]. Un plasma accoppiato induttivamente è un tipo di sorgente in cui l'energia è fornita da correnti elettriche prodotte da induzione elettromagnetica e raggiunge valori di circa 6000-7000 K [Montaser, 1992]. Esso è costituito da elettroni e ioni di argon carichi positivamente e il campione viene introdotto nella regione centrale del plasma mediante un nebulizzatore. Gli atomi costituenti il campione vengono ionizzati e il segnale generato da essi viene raccolto

da un analizzatore di massa a quadrupolo in cui gli ioni sono separati in base al loro rapporto massa-carica. La rivelazione può avvenire in maniera simultanea o sequenziale [Vogel, 1989].

In questo lavoro di tesi, la tecnica è stata condotta sui campioni di solfuro di rame(II) drogati con ioni dei lantanidi al fine di verificarne il drogaggio, ricavando il rapporto atomico Cu:M. Prima di effettuare l'analisi, i campioni sono stati sottoposti a mineralizzazione con acido nitrico e cloridrico concentrati e riscaldati a 220 °C per 60 minuti in un sistema di digestione a microonde CEM EXPLORER SP-D PLUS del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova. Dopo raffreddamento, le soluzioni ottenute sono state diluite con HNO₃ al 2% v/v e gli elementi costituenti sono stati misurati con uno strumento ICP-MS Agilent Technologies 7700xx, con plasma di 1550 W di potenza.

6.1.9 Dynamic Light Scattering (DLS)

Il *Dynamic Light Scattering*, noto anche come *Photon Correlation Spectroscopy*, è una tecnica che fornisce informazioni sulle dimensioni delle particelle costituenti una sospensione. Il campione viene illuminato da un raggio laser e le fluttuazioni d'intensità della luce diffusa (*scattering*), prodotte dal moto Browniano delle particelle in sospensione, vengono misurate in funzione del tempo. La relazione tra la dimensione di una particella e la sua velocità dovuta al moto Browniano è definita dall'equazione di Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_h}$$

dove D è il coefficiente di diffusione delle particelle, k_b è la costante di Boltzmann, T è la temperatura assoluta sperimentale, η è la viscosità del mezzo e r_h è il raggio idrodinamico delle particelle in sospensione.

A parità di temperatura e di viscosità, le particelle di dimensioni ridotte si muovono rapidamente determinando variazioni rapide dell'intensità di *scattering*, mentre le particelle più grandi si muovono più lentamente e inducono variazioni d'intensità lente. La temperatura deve essere nota e mantenuta stabile durante la misura perché ad essa è correlata la viscosità del mezzo. Inoltre il controllo della temperatura è funzionale ad evitare correnti convettive (non-random) nella sospensione che andrebbero a compromettere l'interpretazione dei risultati.

Lo strumento misura la velocità di variazione dell'intensità di *scattering* al tempo t e la confronta con quella al tempo t + τ producendo una funzione di correlazione $G_2(\tau)$ data da:

$$G_2(\tau) = \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t + \tau)dt$$

e rappresentata in figura 6.7, dove si osserva la dipendenza della funzione dalla dimensione delle particelle. Quest'ultima grandezza non si ricava direttamente dalla funzione di correlazione in quanto da essa si ottiene il coefficiente di diffusione, dipendente dalla dimensioni secondo l'equazione di Stokes-Einstein.

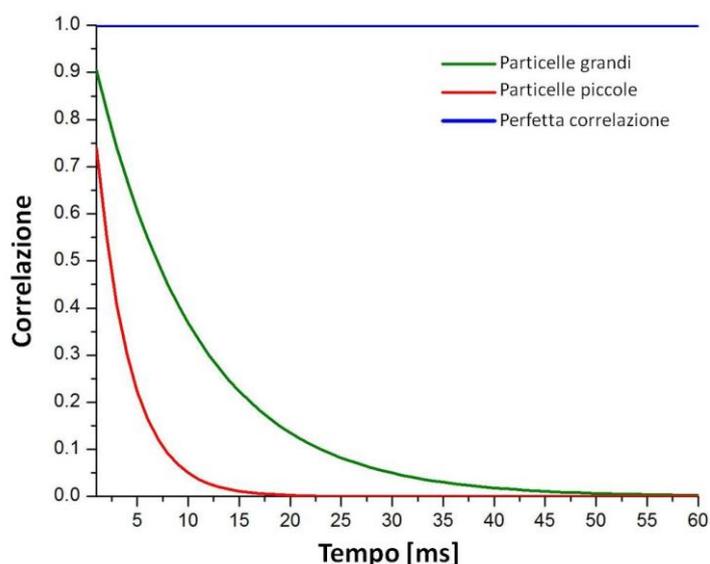


Figura 6.7 Funzione di correlazione per particelle di dimensioni diverse.

Un tipico grafico DLS mostra la distribuzione dimensionale delle particelle in sospensione riportando l'intensità della luce diffusa in funzione del diametro idrodinamico delle particelle (Figura 6.8). Utilizzando l'equazione di Mie è possibile convertire la distribuzione per intensità in distribuzione per volume, da cui si può ottenere anche la distribuzione per numero [Berne, 1976].

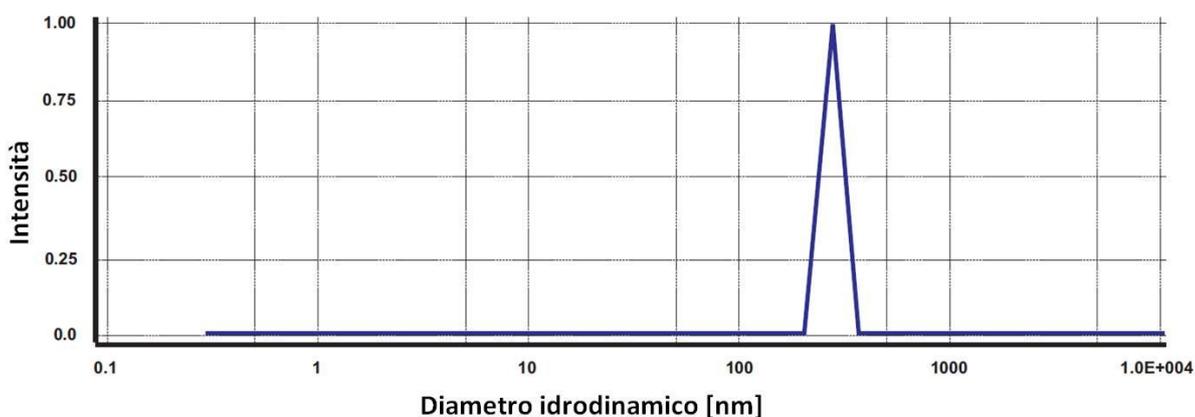


Figura 6.8 Grafico DLS per intensità.

In questo lavoro di tesi, le misure DLS sono state condotte alla temperatura di 20 °C sulle nanostrutture di solfuro di rame(II) puro e drogato e sulle nanoparticelle di ossido di zinco funzionalizzate con il legante polimerico PMOXA-nitrodopamina, al fine di determinarne il diametro idrodinamico medio e di valutare l'effetto su di esso delle diverse condizioni sperimentali. L'acquisizione dei dati è stata ottenuta tramite uno strumento *Zetasizer Nano S* della Malvern del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova.

6.1.10 Microscopia elettronica in trasmissione (TEM)

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) permette di visualizzare direttamente il campione e viene ampiamente utilizzata per lo studio della morfologia e delle dimensioni di

oggetti nanostrutturati. La misura viene effettuata irradiando il campione con un fascio di elettroni che subisce *scattering* e ciò che si registra è l'onda trasmessa. Essa, dopo aver attraversato un sistema di lenti ed essere stata amplificata, raggiunge il rivelatore costituito in genere da un dispositivo ad accoppiamento di carica (CCD) o da un piatto fotografico. L'immagine che si ottiene è il risultato dell'interferenza dei fasci diffusi (*scatterati*) ai diversi angoli e, oltre a questa, è possibile ottenere le figure di diffrazione da area selezionata (SAED) che forniscono informazioni cristallografiche sulla regione analizzata [Wang, 2001]. In questo lavoro di tesi, la microscopia TEM è stata condotta su campioni di nanoparticelle di solfuro di rame(II) puro e drogato con ioni dei lantanidi, ottenuti sospendendo una minima quantità di particelle in etanolo con l'aiuto di un bagno ad ultrasuoni e depositando una goccia di tale sospensione su un reticolo di oro rivestito di carbonio. Le immagini relative alla microstruttura e le figure di diffrazione degli elettroni da area selezionata (SAED) sono state acquisite presso l'Università di Trento usando un microscopio elettronico analitico Philips CM12, operante a 120 kV e equipaggiato con un analizzatore di spettroscopia a dispersione di energia (EDXS).

6.1.11 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La microscopia elettronica a scansione (SEM) è una tecnica di visualizzazione della superficie di un campione, ampiamente utilizzata per la caratterizzazione di materiali solidi in quanto permette di ricavarne informazioni su dimensioni, forma e composizione. Un fascio molto sottile di elettroni altamente energetici viene focalizzato sulla superficie del campione all'interno del microscopio e viene indotto ad esercitare una scansione su di esso. L'analisi viene condotta in vuoto e l'impatto degli elettroni con la superficie produce due fenomeni importanti: l'emissione di elettroni secondari con energie di qualche decina di eV e la riemissione o riflessione o retrodiffusione di elettroni ad alta energia appartenenti al guscio primario [Goldstein, 2003]. Gli elettroni secondari provengono dagli strati più superficiali del campione e la loro rivelazione è utile alla visualizzazione della morfologia superficiale, quelli primari, invece, servono all'identificazione della presenza di composti diversi in un campione eterogeneo in quanto l'intensità con cui vengono emessi dipende dal numero atomico dell'elemento che viene colpito dal fascio elettronico. La corrente elettronica rivelata viene convertita, dopo amplificazione, in immagini tridimensionali [Egerton, 2005]. In questo progetto di tesi, la microscopia SEM è stata effettuata su campioni di nanostrutture di solfuro di rame(II) puro, utilizzando un microscopio Zeiss SUPRA 40 VP del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova.

6.1.12 Microscopia di forza atomica (AFM)

La microscopia di forza atomica (AFM) rientra tra le tecniche di microscopia di sonda a scansione e fornisce immagini della superficie di campioni liquidi, solidi, conduttori, semiconduttori e isolanti. La sonda è costituita da una punta di silicio o nitruro di silicio collocata su un'estremità di una leva oscillante, che effettua la scansione di tutta la superficie da analizzare. Tutti i movimenti della punta o del campione sono realizzati tramite un attuatore piezoelettrico, garantendo alta precisione negli spostamenti lungo le tre dimensioni. Le interazioni deboli, di tipo van der Waals, della punta con la superficie inducono deflessioni della leva, misurabili mediante un sistema ottico e convertibili in immagini topografiche. Il profilo della forza di interazione al variare della distanza dalla superficie è

riportato in figura 6.9. Esistono tre modalità operative in AFM: di contatto, di non contatto e a intermittenza (*tapping*). Nel primo caso, la sonda è in contatto fisico con la superficie del campione e la deflessione della leva è provocata da forze di tipo repulsivo; nel secondo caso, la punta viene fatta oscillare ad una distanza di qualche nanometro dalla superficie e la deflessione è indotta da forze attrattive; nel terzo caso, infine, la punta viene fatta oscillare ad una distanza dalla superficie inferiore rispetto all'approccio precedente, in modo che essa abbia solo un contatto transiente con la superficie [Eaton, 2010].

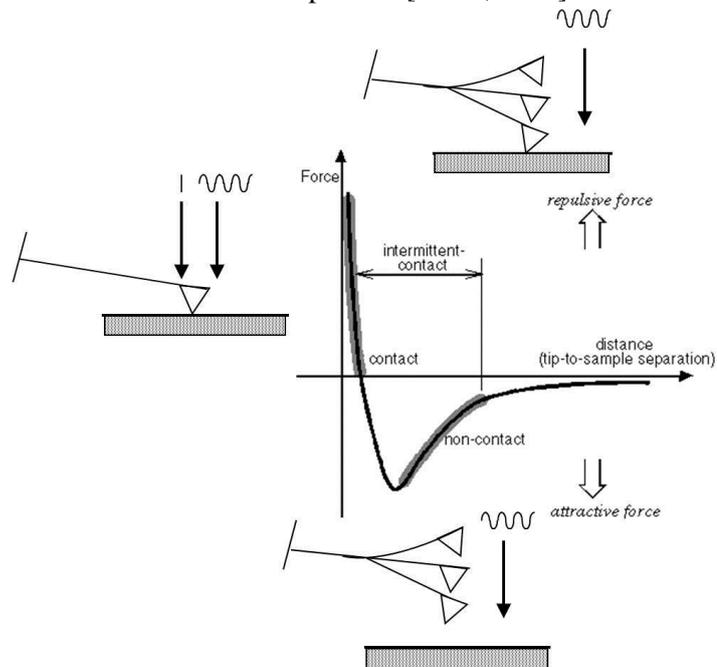


Figura 6.9 Diagramma delle forze di interazione tra punta e superficie al variare della distanza da essa in AFM.

In questo elaborato di tesi, la microscopia AFM è stata condotta in modalità a intermittenza su film sottili di nanoparticelle funzionalizzate con il legante polimerico PMOXA-nitrodopamina, al fine di verificarne l'avvenuta funzionalizzazione e di stabilire l'entità del ricoprimento superficiale delle nanoparticelle al variare della quantità di legante utilizzato per la funzionalizzazione.

Le misure sono state effettuate presso l'ETH di Zurigo, mediante microscopio Dimension AFM (Bruker).

6.2 Caratterizzazione funzionale

6.2.1 Fotoluminescenza

La spettroscopia di fotoluminescenza è una tecnica utile per studiare e caratterizzare i materiali e i processi dinamici che avvengono in essi. La tecnica consiste nell'eccitazione ottica del campione, indotta da assorbimento di luce, e nella misura della distribuzione energetica dei fotoni emessi spontaneamente durante il processo di decadimento radiativo dallo stato ad alta energia, raggiunto dall'elettrone durante l'eccitazione, ad uno stato a energia minore [Gilliland, 1997].

Nel presente lavoro di tesi, le misure di fotoluminescenza sono state condotte unicamente sulle nanostrutture di solfuro di rame(II) puro e drogato con ioni di lantanidi e di metalli di transizione, al fine di valutarne l'eventuale luminescenza. Gli spettri di luminescenza sono stati registrati sui campioni solidi, presso il Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona, utilizzando uno spettrofluorimetro JASCO FP8200.

Capitolo 7

Parte sperimentale

I reagenti utilizzati nel presente lavoro di tesi, con le rispettive caratteristiche, sono elencati nelle tabelle 7.1 e 7.2.

Reagente	Peso molecolare (g/mol)	Numero CAS	Fornitore
Brij-52	330	9004-95-9	Sigma-Aldrich
Igepal-CO630	617	68412-54-4	Sigma-Aldrich
Cicloesano	84.16	110-82-7	Sigma-Aldrich
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$	232.59	19004-19-4	Alfa Aesar
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	170.48	10125-13-0	Sigma-Aldrich
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	240.18	1313-84-4	Sigma-Aldrich
CH_3CSNH_2	75.13	62-55-5	J.T Baker Chemicals
NH_2CSNH_2	76.12	62-56-6	Sigma-Aldrich
$\text{HSCH}_2\text{COONH}_4$ 60% in H_2O	109.15	5421-46-5	Sigma-Aldrich
CH_3COSH	76.12	507-09-5	Sigma-Aldrich
$\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	428.06	63026-01-7	Sigma-Aldrich
$\text{Sm}(\text{CH}_3\text{COO})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	327.49	100587-91-5	Strem Chemicals
$\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	435.02	57584-27-7	Sigma-Aldrich
$\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	451.36	19598-90-4	Sigma-Aldrich
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197.91	13446-34-9	Sigma-Aldrich
$\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	245.09	6156-78-1	Sigma-Aldrich
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	297.49	10196-18-6	Sigma-Aldrich
NaOH	40.00	1310-73-2	BDH Prolabo

Tabella 7.1 Reagenti utilizzati per la sintesi di CuS puro e drogato, di MnS e di ZnO .

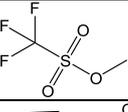
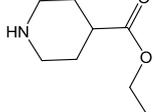
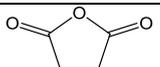
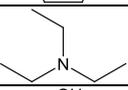
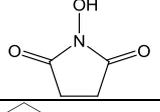
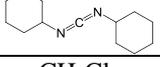
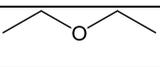
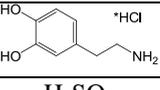
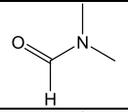
Reagente	Formula chimica	Peso molecolare (g/mol)	Densità (g/ml)	bp(°C)/mp(°C)	Numero CAS	Fornitore
2-metil-2-ossazolina		85.10	1.005	109.5-110.5	1120-64-5	Sigma-Aldrich
Acetonitrile anidro	CH ₃ CN	41.05	0.786	82	75-05-8	Sigma-Aldrich
Idrossido di potassio	KOH	56.11	-	--/361	1310-58-3	Sigma-Aldrich
Sodio carbonato	Na ₂ CO ₃	105.99	-	--/851	497-19-8	Sigma-Aldrich
Metil-triflato		164.10	1.45	94-99	333-27-7	Sigma-Aldrich
Etilisonipecotato		157.21	1.02	204	1126-09-6	Sigma-Aldrich
Cloroformio	CHCl ₃	119.38	1.48	61.2	67-66-3	Sigma-Aldrich
Anidride succinica		100.07		261/119-120	108-30-5	Sigma-Aldrich
Trietilammina		101.19	0.726	89-90	121-44-8	Sigma-Aldrich
N-idrossisuccinimide (NHS)		115.09	-	--/95	6066-82-6	Sigma-Aldrich
Dicicloesilcarbodiimmide (DCC)		206.33	-	122/34-35	538-75-0	Sigma-Aldrich
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	84.93	1.33	39.6	75-09-2	Sigma-Aldrich
Dietiletere		74.12	0.713	34.6	60-29-7	Sigma-Aldrich
Dopamina cloridrato		189.64	-	--/248-250	62-31-7	Sigma-Aldrich
Acido solforico	H ₂ SO ₄	98.08	1.84	290	7664-93-9	Sigma-Aldrich
Nitrito di sodio	NaNO ₂	69.00	-	--/271	7632-00-0	Sigma-Aldrich
Dimetilformammide (DMF)		73.09	0.944	153	68-12-2	Sigma-Aldrich
Tetraidrofurano (THF)		72.11	0.889	65-67/-108	109-99-9	Sigma-Aldrich

Tabella 7.2 Reagenti utilizzati per la sintesi del legante PMOXA-nitrodopamina.

7.1 Sintesi di CuS e CuS:M (M = Eu, Sm, Tb, Gd e Mn)

Per la sintesi di CuS puro, due miscele identiche, A e B, vengono preparate disperdendo 0.3 g di Brij-52 (0.91 mmol) e 0.1 g di Igepal-CO630 (0.16 mmol) in 8 g di cicloesano. Alla miscela A si aggiungono 2 g di una soluzione acquosa di un sale di rame(II) (Cu(NO₃)₂·2.5H₂O o CuCl₂·2H₂O) 1 M (2 mmol) e alla miscela B 2 g di una soluzione acquosa di solfuro (Na₂S·9H₂O, tioacetammide, tiourea, tioglicolato di ammonio, acido tioacetico) 0.5 M o 1 M o 2 M, a seconda del rapporto Cu:S desiderato. Entrambe le miscele

vengono agitate meccanicamente e, in seguito, sottoposte a ultrasonicazione per 3 minuti usando un sonicatore Sartorius Stedim LabsonicP, con una punta di titanio da 3 mm di diametro e operante ad un'ampiezza del 70%, corrispondente ad una potenza di 322 W cm^{-2} . Le due miniemulsioni così ottenute vengono mescolate sotto agitazione meccanica, aggiungendo goccia a goccia l'emulsione B (biancastra) alla A (azzurra), e la miscela finale viene nuovamente sonicata in condizioni identiche alle precedenti ottenendo una miniemulsione C di colore marrone scuro. Quest'ultima viene lasciata riposare per una notte, osservando precipitazione di un solido nero successivamente separato per centrifugazione a 10000 giri/min per 10 minuti, lavato con acqua deionizzata e lasciato essiccare in stufa a $90 \text{ }^\circ\text{C}$.

Per la sintesi di CuS drogato con ioni dei lantanidi e dei metalli di transizione (CuS:M), si procede analogamente a quanto descritto per il solfuro di rame(II) puro, con l'unica variante dell'aggiunta alla miscela A di 2 g di una soluzione acquosa di Cu^{2+} :M in rapporto molare 50:1. Come precursori degli ioni dei lantanidi e dei metalli di transizione vengono utilizzati $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Sm}(\text{CH}_3\text{COO})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

7.2 Sintesi di MnS

La sintesi di MnS viene effettuata seguendo la procedura descritta nel paragrafo 7.1 per il solfuro di rame(II), utilizzando come precursori di Mn^{2+} sia $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sia $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e come fonti di solfuro $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, tioacetammide, tiourea, tioglicolato di ammonio. In questo caso, la miniemulsione del sale di Mn^{2+} è rosa pallido; l'aggiunta goccia a goccia dell'emulsione contenente solfuro (biancastra) e la successiva sonicazione conferisce colorazione rosa salmone alla miniemulsione finale. Il precipitato appare di colore giallo con venature marroni ma, dopo essiccazione in stufa, diventa marrone.

7.3 Sintesi di PMOXA-nitrodopamina

Per la sintesi del legante PMOXA-nitrodopamina, si procede in due maniere distinte ottenendo due leganti caratterizzati da pesi molecolari diversi. Il prodotto finale deriva da una serie di stadi successivi, illustrati nello schema 7 e descritti in dettaglio nel presente paragrafo. Per ottenere il legante avente peso molecolare pari a circa 2 kDa, 20 mL di 2-metil-2-ossazolina vengono distillati sotto N_2 a pressione atmosferica in presenza di KOH. Alla quantità di monomero distillata (11 mL, pari a 0.13 mol) vengono aggiunti 15 mL di acetonitrile anidro (0.29 mol) e, dopo aver portato la miscela a $0 \text{ }^\circ\text{C}$, 560 μL di metiltriflato (4.9 mmol) vengono aggiunti in una singola aliquota. La miscela viene mantenuta a $0 \text{ }^\circ\text{C}$, sotto agitazione, per 10 minuti e successivamente si procede ad innalzare la temperatura a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ mantenendola costante per tutto il periodo di polimerizzazione (24 h). Tutte le operazioni vengono effettuate mantenendo un'atmosfera inerte di N_2 .

Successivamente si è preparata una soluzione di Na_2CO_3 in H_2O Milli-Q pesando 1.6098 g di sale (15 mmol) e sciogliendoli in 15 mL di H_2O Milli-Q. Questa soluzione viene aggiunta alla miscela di polimerizzazione dopo 24 h. La miscela ottenuta viene mantenuta a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ sotto agitazione per ulteriori 24 h rimuovendo la sovrappressione di N_2 . Una volta completata la terminazione, la miscela di polimerizzazione viene tirata a secco rimuovendo il solvente. Di seguito il polimero viene ridisciolti a caldo in 50 mL di cloroformio e la miscela ottenuta viene infine filtrata su carta per eliminare il sale.

Una volta evaporato il solvente il solido ottenuto viene ridisciolti in 100 mL di H₂O Milli-Q e la soluzione così ottenuta viene sottoposta a purificazione mediante dialisi contro H₂O Milli-Q per 72 h, utilizzando membrane con *cut-off* di 1 kDa. Infine, la soluzione purificata viene tirata a secco e il polimero viene liofilizzato per 24 h.

Il polimero PMOXA-(25)-OH ottenuto (2 g, 0.93 mmol) viene successivamente disciolto in 20 mL di acetonitrile anidro e ad essi vengono aggiunti, nell'ordine e sotto atmosfera di N₂, 2.6 mL di NEt₃ (19 mmol) e 1.0 g di anidride succinica (10 mmol). La miscela così ottenuta viene messa a riflusso a 90 °C per 24 h. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente la miscela viene tirata a secco per essere poi ridisciolta in H₂O Milli-Q e sottoposta a dialisi contro H₂O Milli-Q contenente 50 mmol di NaCl/L, successivamente, contro una soluzione 1:20 H₂O Milli-Q:acido acetico e infine contro H₂O Milli-Q fino al raggiungimento di una colorazione ambrata della soluzione in membrana e di pH 6 esterno. Infine, la soluzione purificata viene tirata a secco e il polimero viene liofilizzato per 48 h.

1.5 g (0.67 mmol) del polimero ottenuto PMOXA-COOH vengono successivamente introdotti in un pallone anidrificato tramite cicli vuoto/azoto e a questo vengono aggiunti 10 mL di acetonitrile anidro. A questa soluzione vengono aggiunti 234.4 mg di NHS (2 mmol pari a 3 equivalenti del polimero), precedentemente disciolti in 5 mL di acetonitrile anidro, e 414.2 mg di DCC (2 mmol pari a 3 equivalenti del polimero), precedentemente disciolti in 5 mL di acetonitrile anidro. La miscela viene lasciata sotto agitazione in flusso di N₂ per 24 h. Il precipitato (urea) viene filtrato su carta e lavato con acetonitrile; la soluzione viene tirata a secco e il solido ottenuto ridisciolti in diclorometano. Il crudo ottenuto viene infine purificato tramite riprecipitazione in dietilere. Il polimero solido ottenuto (PMOXA-NHS) è filtrato su carta e asciugato sotto vuoto per 12 h.

550 mg (0.24 mmol) di PMOXA-NHS sono successivamente disciolti, sotto N₂, in 10 mL di DMF anidra e una soluzione di 83.8 mg di nitrodopamina in 10 ml di DMF (0.28 mmol pari a 1.2 equivalenti di polimero) viene aggiunta in presenza di 39 µL di NEt₃ (0.28 mmol pari a 1.2 equivalenti di polimero).

Questa soluzione di reazione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente e in atmosfera di N₂ fino al giorno successivo. Quindi viene purificata per dialisi contro DMF per 48 h. Il crudo viene infine purificato per riprecipitazione in dietilere a 0 °C e mantenuta in frigo a decantare per 4 h. Il polimero solido ottenuto viene filtrato, lavato con THF, ridisciolti in diclorometano e liofilizzato per 48 h.

Per la sintesi del legante avente peso molecolare di circa 4 kDa si procede analogamente a quanto descritto per il legante a peso minore, utilizzando un rapporto molare monomero/iniziatore pari a 50/1 e terminando la catena con etilisonipecotato. L'utilizzo di tale composto (v. Schema 7a.) permette di condurre la reazione di terminazione a temperatura ambiente, anche se è necessario mantenere l'atmosfera inerte di N₂. Lo stadio successivo, inoltre, non prevede l'aggiunta dell'anidride succinica ma consiste in un'idrolisi basica con una soluzione di NaOH a pH 14.

Negli ultimi stadi della sintesi, le modifiche apportate rispetto alla procedura descritta per il legante a peso minore e riportate in tabella 7.3 riguardano le quantità di reagenti aggiunte.

Reagente	Quantità aggiunta [equivalenti di polimero]
NHS	1.1
DCC	1.1
nitro dopamina	1
Net ₃	1

Tabella 7.3 Quantità dei reagenti utilizzati per la sintesi del polimero a peso molecolare di circa 4 kDa.

I prodotti dei singoli stadi della reazione di sintesi del legante vengono caratterizzati mediante NMR e gli spettri registrati sono riportati in Appendice.

La nitrodopamina utilizzata nell'ultimo stadio di entrambe le sintesi viene, a sua volta, sintetizzata nel presente lavoro di tesi seguendo la procedura riportata in letteratura [Napolitano, 1992; Rodenstein, 2010]. Lo schema di reazione è riportato in figura 7.1.

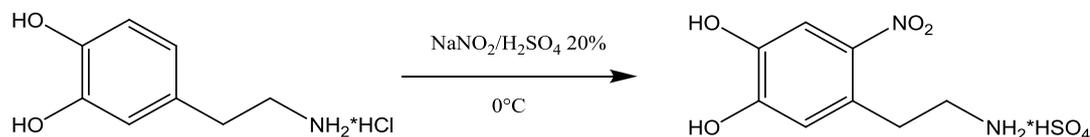


Figura 7.1 Reazione di sintesi della nitrodopamina.

In particolare, vengono introdotti in un pallone a tre colli 2.5057 g (13 mmol) di dopamina cloridrato, 100 mL di H₂O MilliQ e 3.1546 g (46 mmol) di NaNO₂. Si mantiene il pallone sotto agitazione in bagno di acqua e ghiaccio e si aggiungono goccia a goccia con imbuto gocciolatore 12.5 mL di H₂SO₄ al 20%. La soluzione diventa bruna dopo la prima aggiunta, si sviluppano vapori di azoto e, al termine delle aggiunte, la miscela è densa e arancione. Essa viene lasciata a 0 °C per 1 h circa e mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Successivamente si filtra la miscela su büchner e si lava il solido con H₂O Milli-Q e metanolo; il solido giallo chiaro viene raccolto in un pallone e ridisciolti in H₂O Milli-Q scaldando a 80 °C. La soluzione diventa bruna, si lascia raffreddare a temperatura ambiente e si filtra su büchner ottenendo cristallini di colore bruno. Questi vengono caratterizzati mediante NMR, usando come solvente D₂O e nello spettro ad essi relativo, riportato in Appendice, si osservano picchi attribuibili, per confronto con la letteratura [Rodenstein, 2010], alla nitrodopamina.

7.4 Protocollo di funzionalizzazione delle nanoparticelle

La funzionalizzazione delle nanoparticelle di ZnO, sintetizzate via miniemulsione secondo la procedura descritta nel paragrafo 7.1 e utilizzando come precursori Zn(NO₃)₂ 0.5 M e NaOH 2 M, viene effettuata mediante strategia di scambio dei leganti, al fine di sostituire il tensioattivo superficiale residuo con il legante polimerico PMOXA-nitrodopamina.

Il legante (in rapporti m(PMOXA-nitrodopamina)/m(ZnO) = 2:1, 4:1, 20:1 e 50:1) viene sciolto in 10 mL di diclorometano e, alla soluzione ottenuta, si aggiunge la quantità opportuna di nanoparticelle. La miscela viene, quindi, lasciata sotto agitazione meccanica a temperatura ambiente per 24 h in un pallone chiuso.

Trascorse le 24 h, la miscela viene tirata a secco e il solido ridisperso nella minima quantità di H₂O MilliQ. La sospensione ottenuta viene purificata per dialisi contro H₂O Milli-Q per 24 h, utilizzando membrane con *cut-off* di 12 kDa. Il solido purificato, ricavato dopo evaporazione dell'H₂O Milli-Q, viene liofilizzato per 48 h. I successivi esperimenti vengono condotti su sospensioni di nanoparticelle in H₂O Milli-Q o tampone PBS in concentrazioni di 0.25 mg/mL.

Capitolo 8

Conclusioni e prospettive

In questo elaborato di tesi, la metodologia della miniemulsione per l'ottenimento di nanostrutture inorganiche cristalline a temperatura ambiente ed in spazio confinato è stata estesa con successo alla sintesi del solfuro di rame(II), sia puro sia drogato con ioni di lantanidi o di metalli di transizione. Mantenendo invariati la natura della miscela di tensioattivi utilizzati (Brij-52:Igepal-CO630 = 3:1 in peso), i rapporti acqua/tensioattivo e la natura della fase continua (cicloesano), si sono studiati sistemi diversi per natura chimica e rapporto molare dei precursori di rame(II) e di solfuro e durata e potenza di sonicazione. Variando la natura dei precursori di rame(II) e di solfuro S^{2-} , i prodotti desiderati sono risultati sintetizzabili unicamente dalle reazioni del nitrato di rame(II) o del cloruro di rame(II) con il solfuro di sodio, la tioacetammide e l'acido tioacetico. Dalle misure XRD si evidenzia come, in tutti i casi analizzati, il solfuro di rame(II) puro e drogato presenta forma cristallina della covellite con dimensioni medie dei cristalliti comprese tra i 10 e i 15 nm. La purezza e la cristallinità dei prodotti di sintesi risultano più elevate quando, in fase di sintesi, si introduce solfuro in rapporto molare 2:1 rispetto al rame(II). Le condizioni di sonicazione non influenzano la cristallinità e la purezza dei prodotti finali, ma determinano alterazioni delle dimensioni delle gocce costituenti le miniemulsioni, valutabili mediante analisi DLS. In particolare, esse diminuiscono all'aumentare del tempo e della potenza di sonicazione, come prevedibile teoricamente.

L'effettivo drogaggio dei campioni è confermato da analisi ICP-MS, mentre dalle analisi XPS si ha ulteriore prova della formazione del solfuro di rame(II), ma anche evidenza di parziale ossidazione superficiale del solfuro a solfato e della presenza di residui di tensioattivo superficiali. Questi ultimi, osservabili anche con spettroscopia FT-IR, rimangono fisisorbiti sulla superficie delle nanostrutture in quantità pari a circa il 25% della massa totale, come ricavabile da misure TGA-DSC.

Il tentativo di impiego della tecnica della miniemulsione per la sintesi di solfuro di manganese(II) non ha invece condotto ai risultati attesi e l'unico prodotto isolabile è stato ricavato a partire da acetato o cloruro di manganese(II) e solfuro di sodio. Le misure XRD effettuate su questo campione mostrano tuttavia la formazione di ossido misto di manganese, Mn_3O_4 , in forma di hausmannite in coesistenza con altre fasi non identificabili.

Nella prospettiva di un'eventuale applicazione delle nanostrutture sintetizzate nel campo del *bioimaging* ottico, si è ricorso sia a caratterizzazioni di tipo funzionale, effettuando misure di fotoluminescenza sui campioni di CuS drogato, sia a strategie di funzionalizzazione superficiale delle nanostrutture. Per quanto concerne la caratterizzazione delle proprietà ottiche, tutti i sistemi mostrano una banda di emissione caratteristica nell'UV che li candida per applicazioni *in vitro*. Riguardo a potenziali applicazioni *in vivo*, che richiedono assorbimento ed emissione nel NIR, sono necessarie ulteriori analisi in quella regione spettrale, nonché un drogaggio controllato con ioni che luminescano nella regione tra 800 e 1660 nm. La funzionalizzazione superficiale è risultata necessaria per conferire ai nanomateriali proprietà di ridispersione in ambiente fisiologico, quindi acquoso. Un polimero idrosolubile e biocompatibile, appartenente alla classe delle poliossazoline e terminante con una molecola di nitrodopamina, è stato sintetizzato nel presente lavoro di tesi e impiegato per la funzionalizzazione superficiale di nanostrutture di ossido di zinco. Quest'ultimo, sintetizzato per precipitazione in spazio controllato via miniemulsione, in maniera analoga al solfuro di rame(II), è un buon candidato per applicazioni in *bioimaging* in

quanto non è citotossico e può essere efficacemente funzionalizzato per elevata affinità della nitrodopamina per la superficie ossidica. Utilizzando, in fase di funzionalizzazione, diversi rapporti ZnO/polimero si è ricavata la quantità di legante necessaria per ottenere il completo rivestimento della superficie delle nanostrutture, con conseguente aumentata stabilità delle stesse in acqua. Le sospensioni ottenute rimangono stabili e limpide anche a quattro mesi dalla preparazione.

Test di citotossicità e di *uptake* cellulare su tali composti sono in corso, al fine di comprenderne l'effettiva applicazione in campo biomedico. Esiti positivi dischiuderebbero interessanti prospettive per l'estensione delle strategie di funzionalizzazione a ossidi drogati, in modo tale da coniugare disperdibilità in ambiente fisiologico, assenza di citotossicità e luminescenza. Modificando la molecola terminante il polimero, quest'approccio potrebbe essere utilizzato anche per ridisperdere in ambiente acquoso composti binari di natura diversa dagli ossidi, quali ad esempio i solfuri.

Bibliografia

- Adams, N.; Schubert, U.S. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2007**, *59*, 1504-1520.
- Alivisatos, A.P.; Gu, W.; Larabell, C. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2005**, *7*, 55-76.
- Amstad, E.; Gillich, T.; Bilecka, I.; Textor, M.; Reimhult, E. *Nanolett.*, **2009**, *9*, 4042-4048.
- Amstad, E.; Textor, M.; Reimhult, E. *Nanoscale*, **2011**, *3*, 2819-2843.
- Antonietti, M.; Landfester, K. *Prog. Polym. Sci.*, **2002**, *27*, 689-757.
- Antonietti, M.; Kuang, D.; Smarsly, B.; Zhou, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4988-4992.
- Armelao, L.; Camozzo, D.; Gross, S.; Tondello, E. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2006**, *6*, 401-408.
- Asati, A.; Santra, S.; Kaittanis, C.; Nath, S.; Perez, J.M. *Angew. Chem. Int.*, **2009**, *48*, 2308-2312.
- Azam, A.; Ahmed, F.; Arshi, N.; Chaman, M.; Naqvi, A.H. *J. Alloys Compd.*, **2010**, *496*, 399-402.
- Basu, M.; Sinha, A.; Pradhan, M.; Arkar, S.; Gishi, Y.; Pal T. *Environ. Sci. Technol.*, **2010**, *44*, 6313-6318.
- Bauer, M.; Bertagnolli, H. *Bunsen Magazin*, **2007**, *9*, 216-231.
- Bauer, M.; Schroeder, S.; Tauhardt, L.; Kempe, K.; Schubert, U.S.; Fischer, D. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2013**, *51*, 1816-1821.
- Becker, P.C.; Olsson, N.A.; Simpson, J.R. *Erbium doped amplifiers: fundamentals and technology* (1st ed.); Academic Press: San Diego, **1999**.
- Berger, M. *Pharmacol. Res.*, **2010**, *62*, 57-89.
- Biswas, S.; Kar, S.; Chaudhuri S. *J. Cryst. Growth*, **2007**, *299*, 94-102.
- Biswas, S.; Kar, S.; Chaudhuri, S. *J. Cryst. Growth*, **2005**, *284*, 129-135.
- Bol, A.A.; van Beek, R.; Meijerink, A. *Chem. Mater.*, **2002**, *14*, 1121-1126.
- Briggs, D.; Seah, M.P. *Practical Surface Analysis* (2nd ed.); John Wiley & Sons: New York, **2003**.
- Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, P. *Science*, **1998**, *281*, 2013.
- Bünzli, J.C.G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, *34*, 1048-1077.
- Capek, I. *Adv. Colloid Interf. Sci.*, **2004**, *110*, 49-74.
- Capobianco, J.A.; Vetrone, F.; Naccache, R.; Juarranz de la Fuente, A.; Sanz-Rodríguez, F.; Blázquez-Castro, A.; Rodríguez, E.M.; Jaque, D.; Sole J.G. *Nanoscale*, **2010**, *2*, 495-498.
- Carnall, W.T.; Goodman, G.L.; Rajnak, K.; Rana, R.S. *J. Chem. Phys.*, **1989**, *90*, 3443.
- Caruso, F. *Colloids and Colloid Assemblies- Cap.6* (1st ed.); Wiley-VCH: Weinheim, **2003**.
- Chen, H.; He, J. *J. Phys. Chem. C*, **2008**, *112*, 17540-17545.
- Chen, L.X.; Liu, T.; Thurnauer, M.C.; Csencsits, R.; Rajh, T. *J. Phys. Chem. B.*, **2002**, *106*, 8539.
- Chilton, H.M.; Jackels, S.C.; Hinson, W.H.; Ekstrand, K.E. *J. Nucl. Med.*, **1984**, *25*, 604-607.

- Choi, J.; Wang, N.S. *Biomedical Engineering - From Theory to Applications* (1st ed.); InTech: New York, **2011**.
- Chou, Y.J.; El-Aasser, M.S.; Vanderhoff, J.W. *J. Dispers. Sci. Technol.*, **1980**, *1*, 129.
- Chowdhury, M.R.I.; Podder, J.; Islam, A.B.O.M. *Cryst. Res. Technol.*, **2011**, *46*, 267-271.
- Clendenen, R.L.; Drickamer, H.G. *J. Chem. Phys.*, **1966**, *44*, 4223.
- Cölfen, H.; Antonietti, M. *Mesocrystals and Nonclassical Crystallization* (1st ed.); John Wiley & Sons: Chichester, **2008**.
- Conn, P.M. *Essential bioimaging methods* (1st ed.); Academic Press: San Diego, **2009**.
- Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; Murillo, C.A.; Bochmann, M. *Advanced Inorganic Chemistry* (6th ed.); John Wiley & Sons: New York, **1999**.
- Crespy, D.; Landfester, K. *Polymer*, **2009**, *50*, 1616-1620.
- Crosswhite, H.M.; Moos, H.W. *Optical properties of ions in crystals* (1st ed.); Interscience Publishers: New York, **1967**.
- Cushing, B.L.; Kolesnichenko, V.L.; O'Connor, C. *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 3893-3946.
- Dalsin, J.L.; Lin, L.; Tosatti, S.; Vörös, J.; Textor, M.; Messersmith P.B. *Langmuir*, **2005**, *21*, 640-646.
- Damodaran, S. *J. Food Sci.*, **2005**, *70*, 54-66.
- Davies, J.T.; Rideal, E.K. *Interface Phenomena* (2nd ed.); Academic Press: New York, **1963**.
- Dhanam, M.; Kavitha, B.; Priya M.S. *J. Ovonic Res.*, **2010**, *6*, 1-11.
- Di Benedetto F.; Borgheresi, M.; Caneschi A.; Chastanet, G.; Cipriani, C.; Gatteschi, D.; Pratesi, G.; Romanelli, M.; Sessoli, R. *Eur. J. Mineral.*, **2006**, *18*, 283-287.
- Dolcet, P.; Casarin, M.; Maccato, C.; Bovo, L.; Ischia, G.; Gialanella, S.; Mancin, F.; Tondello, E.; Gross, S. *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, 1620-1626.
- Dolcet, P.; Latini, F.; Casarin, M.; Speghini, A.; Tondello, E.; Foss, C.; Diodati, S.; Verin, L.; Motta, A.; Gross, S. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2013**, *13*, 2291-2300.
- Dong, A.; Ye, X.; Chen, J.; Kang, Y.; Gordon, T.; Kikkawa, J.M.; Murray, C.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 998-1006.
- Drexler, E. K. *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing and Computation* (2nd ed.); John Wiley & Sons: New York, **1998**.
- Dutta, A.; Dolui, S.K. *Mater. Chem. Phys.*, **2008**, *112*, 448-452.
- Dutta, A.K.; Das, S.; Samanta, S.; Samanta, P.; Adhikary, B.; Biswas, P. *Talanta*, **2013**, *107*, 361-367.
- Eastoe, J.; Hollamby, M.J.; Hudson, L. *Adv. Colloid Interf. Sci.*, **2006**, *128-130*, 5.
- Eaton, P.; West, P. *Atomic Force Microscopy* (1st ed.); Oxford University Press: Oxford, **2010**.
- Eder, D. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 1348-1385.
- Egerton R. F. *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM* (1st ed.); Springer: New York, **2005**.
- Einstein, A. *Ann. Phys.*, **1905**, *17*, 132.
- Emadi, H.; Salavati-Niasari, M.; Davar, F. *Micro Nano Lett.*, **2011**, *6*, 909-913.
- Erathodiyil, N.; Ying, J.Y. *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 925-935.

- Ernst, R.R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions* (1st ed.); Clarendon Press: Oxford, **1987**.
- Evans, H.T.; Konnert, J.A. *Am. Min.*, **1976**, *61*, 996-1000.
- Famengo, A.; Anantharaman, S.; Ischia, G.; Causin, V.; Natile, M.M.; Maccato, C.; Tondello, E.; Bertagnolli, H.; Gross, S. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, *33*, 5017-5028.
- Fan, D.B.; Yang, X.D.; Wang, H.; Zhang, Y.C.; Yan, H. *Physica B*, **2003**, *337*, 165-169.
- Feldman L.C.; Myer, J.W. *Fundamentals of Surface and Thin Film Analysis* (1st ed.); Elsevier Science: New York, **1986**.
- Feldmann, C.; Jüstel, T.; Ronda, C.R.; Schmidt, P.J. *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13*, 511.
- Fiedler, V.U.; Schwarzmaier, H.J.; Eickmeyer, F.; Müller, F.P.; Schoepp, C.; Verreet, P.R. *J. Magn. Reson. Imaging*, **2001**, *13*, 729-737.
- Förster, S.; Antonietti, M. *Adv. Mater.*, **1998**, *10*, 195.
- Frangioni, J.V. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 626-634.
- Franzmann, E.; Khalil, F.; Weidmann, C.; Schröder, M.; Rohnke, M.; Janek, J.; Smarsly, B. M.; Maison, W. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 8596-8603.
- Gaertner, F.C.; Luxenhofer, R.; Blechert, B.; Jordan, R.; Essler, M. *J. Controlled Release*, **2007**, *119*, 291-300.
- Gaikwad, S.G.; Pandit, A.B. *Ultrason. Sonochem.*, **2008**, *15*, 554-563.
- Gao, L.; Wang, E.; Lian, S.; Kang, Z.; Lan, Y.; Wu, D. *Solid State Commun.*, **2004**, *130*, 309-312.
- Gao, L.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J.B.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T.H.; Feng, J.; Yang, D.L.; Perrett, S.; Yan X.Y. *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, *2*, 577-583.
- Gill, R.; Bahshi, L.; Freeman, R.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1676-1683.
- Gillich, T.; Acikgöz, C.; Isa, L.; Schlüter, A.D.; Textor, M. *ACS Nano*, **2013**, *7*, 316-329.
- Gillich, T.; Benetti, E.M.; Rakhmatullina, E.; Konradi, R.; Li, W.; Zhang, A.; Schlüter, A.D.; Textor, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 10940-10950.
- Gilliland, G.D. *Mater. Sci. Eng.*, **1997**, *R18*, 99-400.
- Goede, O.; Heimbrod, W. *Phys. Stat. Sol. B*, **1988**, *146*, 11.
- Goh, S.W.; Buckley, A.N.; Lamb, R.N. *Miner. Eng.*, **2006**, *19*, 204-208.
- Goldstein, J.; Newbury, D.E.; Joy, D.C.; Lyman, C.E.; Echlin, P.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J.R. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis* (3rd ed.); Springer: New York, **2003**.
- Goodwin, J.W. *Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers – An Introduction* (1st ed.); John Wiley & Sons: New York, **2004**.
- Griffiths, P.R.; de Haseth, J.A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (2nd ed.); John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, **2007**.
- Gross, S.; Armelao, L. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*; Wagner Johanna M. editore, Nova Science Publishers Inc.: New York, **2010**.
- Hahn, M.A.; Singh, A.K.; Sharma, P.; Brown, S.C.; Moudgil, B.M. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *399*, 3-27.
- Hajir, M.; Dolcet, P.; Fischer, V.; Holzinger, J.; Landfester, K.; Muñoz-Espí, R. *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, 5622-5628.

- Hauck, T.S.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C. *W. Small*, **2008**, *4*, 153-159.
- Hayes B. L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the speed of light* (1st ed.); Cem Corp: Matthews NC, **2002**.
- Hecht, L.L.; Winkelmann, M.; Wagner, C.; Landfester, K.; Gerlinger, W.; Sachweh, B.; Schuchmann, H.P. *Chem. Eng. Technol.*, **2012**, *35*, 1670-1676.
- Hercules, D.M. *Critical Reviews in Surface Chemistry* (1st ed.); CRC Press: Boca Raton, **1992**.
- Herold, DA.; Keil, K.; Bruns, DE. *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, *38*, 73-76.
- Herschman, H.R. *Science*, **2003**, *302*, 605-608.
- Heutz, N.A.; Dolcet, P.; Birkner, A.; Casarin, M.; Merz, K.; Gialanella, S.; Gross, S. *Nanoscale*, **2013**, DOI: 10.1039/C3NR03977C.
- Holland, N.B.; Qiu, Y.; Ruegsegger, M.; Marchant, R.E. *Nature*, **1998**, *392*, 799-801.
- Holzapfel, V.; Lorenz, M.; Weiss, C.K.; Schrezenmeier, H.; Landfester, K.; Mailänder, V. *J. Phys.: Condens. Matter*, **2006**, *18*, 2581.
- Hoogenboom, R. *Angew. Chem. Int.*, **2009**, *48*, 7978-7994.
- Housecroft, C.E.; Sharpe, A.G. *Inorganic Chemistry* (3rd ed.); Pearson: Londra, **2008**.
- Houšková, V.; Sýtengl, V.; Bakardjieva, S.; Murafa, N.; Kalendová, A.; Opluštil, F. *J. Phys. Chem. A*, **2007**, *111*, 4215-4221.
- Hrkach, J.; Matyjaszewski, K. *Macromol.*, **1992**, *25*, 2070-2075.
- Inácio, A. S.; Mesquita, K. A.; Baptista, M.; Ramalho-Santos, J.; Vaz, W. L. C.; Vieira, O. V. *PLoS ONE*, **2011**, *6*, 19850.
- Jeffery, G.H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney R.C. *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, (5th ed.); Longman Group UK Ltd.: Burnt Mill, Harlow Essex, **1989**.
- Jelinek, A.; Klöcking, HP. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **1998**, *50*, 472-476.
- Jiang, X.; Xie, Y.; Lu, J.; He, W.; Zhu, L.; Qian, Y. *J. Mater. Chem.*, **2000**, *10*, 2193.
- Jiang, C.; Zhang, W.; Zou, G.; Xu, L.; Yu, W.; Qian, Y. *Mater. Lett.*, **2005**, *59*, 1008-1011.
- Jiang, D.; Hu, W.; Wang, H.; Shen, B.; Deng, Y. *Chem. Eng. J.*, **2012**, *189-190*, 443-450.
- Josephy, P.D.; Eling, T.; Mason, R.P. *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 3669-3675.
- Jun, Y.W.; Jung, Y.Y. Cheon, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 615-619.
- Kansal, S.; Kaur, N.; Singh, S. *Nanoscale Res. Lett.*, **2009**, *4*, 709-716.
- Kim, K.S.; *J. Electron. Spectrosc.*, **1974**, *3*, 217.
- Kitchens, C. L.; McLeod, M. C.; Roberts, C. B. *Langmuir*, **2005**, *21*, 5166.
- Koningsberger, D.C.; Prins, R. *X-ray Absorption, Principles, techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES* (1st ed.); John Wiley & Sons: New York, **1988**.
- Konradi, R.; Pidhatika, B.; Mühlenbach, A.; Textor, M. *Langmuir*, **2008**, *24*, 613-616.
- Konradi, R.; Acikgoz, C.; Textor, M. *Macromol. Rapid Commun.*, **2012**, *33*, 1663-1676.

- Koole, R.; Van Schooneveld, M.M.; Hilhorst, J.; Donega, C.D.; Hart, D.C.; van Blaaderen, A.; Vanmaekelbergh, D.; Meijerink, A. *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 2503-2512.
- Korgel, B.A.; Monbouquette, H.G. *Langmuir*, **2000**, *16*, 35883594.
- Kotronarou, A.; Mills, G.; Hoffmann, M.H.; *Environ. Sci. Technol.*, **1992**, *26*, 2420-2428.
- Kristl, M.; Hojnik, N.; Gyergyek, S.; Drogenik, M. *Mater. Res. Bull.*, **2013**, *48*, 1184-1188.
- Kronek, J.; Kronekova, Z.; Luston, J.; Paulovicová, E.; Paulovicová, L.; Mendrek, B. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2011**, *22*, 1725-1734.
- Kruger, R.A. *Med. Phys.*, **1994**, *21*, 127-131.
- Ku, G.; Zhou, M.; Song, S.; Huang, Q.; Hazle, J.; Li, C. *ACS Nano*, **2012**, *6*, 7489-7496.
- Kuchmii, S.Y.; Korzhak, A.V.; Raevskaya, A.E.; Kryukov, A.I. *Theor. Exp. Chem.*, **2001**, *37*, 36-41.
- Kulisch, W.; Reithmaier, J.P.; Petkov, P.; Popov, C. *Nanostructured Materials for Advanced Technological Applications* (1st ed.); Springer: Dordrecht, **2009**.
- Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, TY.; Goswami, LN.; Bonoiu, AC.; Bergey, EJ.; Trampusch, KM.; Maitra, A.; Prasad, PN. *ACS Nano*, **2008**, *2*, 449-456.
- Kumar, P.; Nagarajan, R.; Sarangi, R. *J. Mater. Chem. C*, **2013**, *1*, 2448-2454.
- Lai, C.H.; Lu, M.H.; Chen, L.J. *J. Mater. Chem.*, **2012**, *22*, 19-30.
- Lai, CH.; Huang, KW.; Cheng, JH.; Lee, CY.; Hwang, BJ.; Chen, LJ. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 6638-6645.
- Landfester, K. *Adv. Mater.*, **2001**, *13*, 765-768.
- Landfester, K. *Annu. Rev. Mater. Res.*, **2006**, *36*, 231-279.
- Landfester, K. *Macromol. Symp.*, **2000**, *150*, 171-178.
- Landfester, K. *Top. Curr. Chem.*, **2003**, *227*, 75.
- Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F.; Antonietti, M. *Macromol.*, **1999**, *32*, 5222-5228.
- Landfester, K.; Weiss, C. *Adv. Polym. Sci.*, **2010**, *229*, 1.
- Lauterborn, W.; Ohl CD. *Ultrason. Sonochem.*, **1997**, *4*, 65-75.
- Lee, M. S.; Park, S. S.; Lee, G. D.; Ju, C. S.; Hong, S. S. *Catal. Today*, **2005**, *101*, 283-290.
- Lewis, A.E. *Hydrometallurgy*, **2010**, *104*, 222-234.
- Li, D.; Bancroft, G.M.; Kasrai, M.; Fleet, M. E.; Feng, X. H.; Yang, B. X.; Tan, K. H. *Phys. Chem. Mineral.*, **1994**, *21*, 317-324.
- Li Y.; Lu, W.; Huang, Q.; Li, C.; Chen, W. *Nanomedicine*, **2010**, *5*, 1161-1171.
- Li, X.; Jia, Y.; Cao, A. *ACS Nano*, **2010**, *4*, 506.
- Li, Y.; Ding, Y.; Wang, Z. *Adv. Mater.*, **1999**, *11*, 847-850.
- Liang, W.; Whangbo, M. H. *Solid State Commun.*, **1993**, *85*, 405-408.
- Liu, W.; Greytak, A.B.; Lee, J.; Wong, C.R.; Park, J.; Marshal, L.F.; Jiang, W.; Curtin P.N.; Ting, A.Y.; Nocera, D.G.; Fukumura, D.; Jain, R.K.; Bawendi, M.G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *132*, 472-483.
- Lloret, N.; Frederiksen, R.S.; Møller T.C.; Rieben, N.I.; Upadhyay, S.; De Vico, L.; Jensen, J.H.; Nygard, J.; Martinez, K.L. *Nanotechnology*, **2013**, *24*, 1-9.

- Lokhande, C.D.; Ennaoui, A.; Patil, P.S.; Giersig, M.; Muller, M.; Diesner, K.; Tributsch, H. *Thin Solid Films*, **1998**, *330*, 70-75.
- Lu, J.; Zhao, Y.; Chen, N.; Xie, Y. *Chem. Lett.*, **2003**, *32*, 30-31.
- Luxenhofer, R.; Sahay, G.; Schulz, A.; Alakhova, D.; Bronich, T.K.; Jordan, R.; Kabanov, A.V. *J. Controlled Release*, **2011**, *153*, 73-82.
- Luxenhofer, R.; Schulz, A.; Roques, C. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 4972-4979.
- Okajima, M.; Tohda, T. *J. Cryst. Growth*, **1992**, *117*, 810.
- Mailänder, V.; Landfester, K. *Biomacromol.*, **2009**, *10*, 2379-2400.
- Manahan, S.E. *Quantitative chemical analysis* (1st ed.); Wadsworth Inc.: Belmont, California, **1986**.
- Mancin, F.; Bertazza, L.; Celotti, L.; Fabbrini, G.; Loi, M.A.; Maggini, M.; Marcuz, S.; Menna, E.; Muccini, M.; Tonellato, U. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 10434-10440.
- Mancin, F.; Rio-Echevarria, I.M.; Selvestrel, F.; Segat, D.; Guarino, G.; Tavano, R.; Causin, V.; Reddi, E.; Papini, E. *J. Mat. Chem.*, **2010**, *20*, 2780-2787.
- Massoud, T.F.; Gambhir, S.S. *Genes Dev.*, **2003**, *17*, 545.
- McCreery, R.L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis* (1st ed.); John Wiley & Sons: New York, **2005**.
- McGeehin, P.; Hooper, A. *J. Mater. Sci.*, **1977**, *12*, 1-27.
- Michel, F.M.; Schoonen, M.A.A.; Zhang, X.V.; Martin, S.T.; Parise, J.B. *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, 1726-1736.
- Mikrajuddin, A.; Shi, F. G.; Nieh, T. G.; Okuyama, K. *Microelectr. J.*, **2000**, *31*, 343-351.
- Miles, W.C.; Goff, J.D.; Huffstetler, P.P.; Reinholz, C.M.; Pothayee, N.; Caba, B.L.; Boyd, J.S.; Davis, R.M.; Riffle, J.S. *Langmuir*, **2009**, *25*, 803-813.
- Montaser, A.; Golightly, D.W. *Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry* (1st ed.); VCH Publishers: New York, **1992**.
- Montenegro, R.; Antonietti, M.; Mastay, Y.; Landfester, K. *J. Phys. Chem. B.*, **2003**, *107*, 5088-5094.
- Moulder, J.F.; Stickle, W.F.; Sobol, P.E.; Bomben, K.D. *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*; Physical Electronics Inc.: Eden Prairie, Minnesota, **1992**.
- Mu, J.; Gu, Z.; Wang, L.; Zhang, Z.; Sun, H.; Kang, SZ. *J. Nanopart. Res.*, **2008**, *10*, 97-201.
- Muñoz-Espí, R.; Weiss, C. K.; Landfester, K. *Curr. Opin. Colloid. In.* **2012**, *17*, 212-224.
- Nabih, N.; Landfester, K.; Taden, A. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **2011**, *49*, 5019-5029.
- Nafees, M.; Ali, S.; Rasheed, K.; Idrees, S.; *Appl. Nanosci.*, **2012**, *2*, 157-162.
- Nagarajan, R.; Ruckenstein, E. *J. Colloid Interface Sci.*, **1977**, *60*, 221-231.
- Nair, P.K.; Nair, M.T.S. *Semicond. Sci. Technol.*, **1989**, *4*, 191.
- Nam, J.; Won, N.; Bang, J.; Jin, H.; Park, J.; Jung, S.; Jung, S.; Park, Y.; Kim, S. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2013**, *65*, 622-648.
- Napolitano, A.; d'Ischia, M.; Costantini, C.; Prota, G. *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 8515-8522.
- Newville, M. *Fundamentals of XAFS (Unpublished)*; University of Chicago, Chicago, IL, **2004**.

- Nomura, R.; Inazawa, S.; Kanaya, K.; Matsuda, H. *Appl. Organomet. Chem.*, **1989**, *3*, 195-197.
- Nomura, T.; Kousaka, Y.; Alonso, M.; Fukunaga, M. *J. Colloid Interface Sci.*, **2000**, *223*, 179-184.
- Oswald, S.; Gonzales-Elipse, A.R.; Reiche, R.; Espinos, J.P.; Martin, A. *Surf. Interf. Anal.*, **2003**, *35*, 991-997.
- Pal, A.; Shah, S.; Devi, S. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.*, **2007**, *302*, 483-487.
- Pan, J.; Xi, B.; Li, J.; Yan, Y.; Li, Q.; Qian, Y. *J. Nanopart. Res.*, **2011**, *13*, 3535-3543.
- Pandey, G.; Sharma, H.K.; Srivastava, S.K.; Kotnala, R.K. *Mater. Res. Bull.*, **2011**, *46*, 1804-1810.
- Pang, P.; Englezos, P. *Nord. Pulp Pap. Res. J.*, **2000**, *15*, 387-394.
- Patrick, R. A. D.; Mosselmans, J. F. W.; Charnock, J. M.; England, K. E. R.; Helz, G. R.; Garner, C. D.; Vaughan, D. J. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **1997**, *61*, 2023-2036.
- Pearce, C.I.; Patrick, R.A.D.; Vaughan, D.J. *Rev. Mineral. Geochem.*, **2006**, *61*, 127-180.
- Perrino, C.; Lee, S.; Choi, S. W.; Maruyama, A.; Spencer, N. D. *Langmuir*, **2008**, *24*, 8850-8856.
- Phuruangrat, A.; Thoonchalong, P.; Thongtem, S.; Thongtem, T. *Chalcogenide Lett.*, **2012**, *9*, 421-426.
- Pidhatika, B.; Rodenstein, M.; Chen, Y.; Rakhmatullina, E.; Mühlebach, A.; Acikgöz, C.; Textor, M.; Konradi, R. *Biointerphases*, **2012**, *7*, 1.
- Pileni, MP. *Nature Mater.*, **2003**, *2*, 145-150.
- Pradhan, N.; Katz, B.; Efrima, S. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 13843-13854.
- Psaro, R.; Guidotti, M.; Sgobba, M. *Inorganic and Bio-inorganic Chemistry*; EOLSS Publishers, Oxford vol. 2, **2008**.
- Puglisi, A.; Mondini, S.; Cenedese, S.; Ferretti, A.M.; Santo, N.; Ponti, A. *Chem. Mater.*, **2010**, *22*, 2804-2813.
- Raevskaya, A.E.; Stroyuk, A.L.; Kuchmii, S.Y.; Kryukov, A.I. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **2004**, *212*, 259-265.
- Rajh, T.; Chen, L.X.; Lukas, K.; Liu, T.; Thurnauer, M.C.; Tiede, D.M. *J. Phys. Chem. B.*, **2002**, *106*, 10543.
- Ratanatawanate, C.; Chyao, A.; Balkus, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 3492.
- Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. *Nat. Methods*, **2008**, *5*, 763-775.
- Rizvi, S.B.; Ghaderi, S.; Keshtgar, M.; Seifalian, A.M. *Nano Rev.*, **2010**, *1*, 5161.
- Rodenstein, M.; Zürcher, S.; Tosatti, S.G.P.; Spencer, N.D. *Langmuir*, **2010**, *26*, 16211-16220.
- Rosenthal, D.; Taylor, T.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 2684-2690.
- Rosenthal, D.; Taylor, T.I. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 4169-4174.
- Rossmann, R.; Weiss, C.K.; Geserick, J.; Hüsing, N.; Hörmann, U.; Kaiser, U.; Landfester, K. *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 5768-5780.
- Saegusa, T.; Kobayashi, S.; Yamada, A. *Makromol. Chem.*, **1976**, *177*, 2271.
- Saiwan, C.; Anukunprasert, T.; Traversa, E. *J. Chem. Eng. Japan*, **2004**, *37*, 279-285.

- Sakura, T.; Takahashi, T.; Kataoka, K.; Nagasaki, Y. *Colloid Polym. Sci.*, **2005**, *284*, 97-101.
- Salager, J. *Surfactants- Types and Uses*; Laboratorio FIRP Escuela de Ingenieria Quimica, Universidad de Los Andes, Venezuela, **2002**.
- Santra, S.; Yang, H.S.; Holloway, P.H.; Stanley, J.T.; Mericle, R.A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 1656-1657.
- Scherrer, P. *Math Phys.*, **1918**, 98.
- Schiller, R.; Weiss, C. K.; Geserick, J.; Hüsing, N.; Landfester, K. *Chem. Mater.*, **2009**, *21*, 5088-5098.
- Schlecht, S.; Roskamp, M.; Schaper, A.K.; Wendorff, J.H. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**, *17*, 2496-2499.
- Schramm, L.L.; Stasiuk, E.N.; Marangoni D.G. *Annu. Rep. Progr. Chem.*, **2003**, *99*, 3-48.
- Schubert, U.; Hüsing, N. *Synthesis of Inorganic Materials* (2nd ed.); Wiley VCH Verlag: Weinheim, **2005**.
- Sedlacek, O.; Monnery, B. D.; Filippov, S. K.; Hoogenboom, R.; Hruby, M. *Macromol. Rapid Commun.*, **2012**, *33*, 1648-1662.
- Selvan, S.T.; Tan, T.T.Y.; Yi, D.K.; Jana, N.R. *Langmuir*, **2010**, *26*, 11631-11641.
- Selvan, S.T.; Tan, T.T.; Ying, J.Y. *Adv. Mater.*, **2005**, *17*, 1620-1625.
- Shultz, M.D.; Reveles, J.U.; Khanna, S.N.; Carpenter, E.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 2482-2487.
- Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (7th ed.); John Wiley & Sons: New York, **2006**.
- Silverstein, S.C.; Steinman, R.M.; Cohn, Z.A. *Ann. Rev. Biochem.*, **1977**, *46*, 669-722.
- Smith, A.M.; Duan, H.; Mohs, A.M.; Nie, S. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2008**, *60*, 1226-1240.
- Smolensky, E.D.; Park, H.Y. E.; Berquò, T.S.; Pierre, V.C. *Contrast Media Mol. Imaging*, **2011**, *6* 189-199.
- Soenen S.J.; Rivera-Gil, P.; Montenegro, JM.; Parak, WJ.; De Smedt S.C.; Braeckmans, K. *Nano today*, **2011**, *6*, 446-465.
- Soltani, N.; Saion, E.; Hussein, M.Z. *J. Inorg. Organomet. Polym.*, **2012**, *22*, 830-836.
- Sombuthawee, C.; Bonsall, S. B.; Hummel, F. A. *J. Solid State Chem.*, **1978**, *25*, 391.
- Song, WS.; Yang, H. *Chem. Mater.*, **2012**, *24*, 1961-1967.
- Sostaric, J.Z.; Caruso-Hobson, R.A.; Mulvaney, P.; Grieser, F. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1997**, *93*, 1791-1795.
- Sperling, R.A.; Parak, W.J. *Phil. Trans. R. Soc. A*, **2010**, *368*, 1333-1383.
- Steckel, J.; Zimmer, J.P.; Coe-Sullivan, S.; Stott, N.E.; Bulović, V.; Bawendi, M.G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2154-2158.
- Suslick, K.S.; Choe, S.B.; Cichowlas, A.A.; Grinstaff, M.W. *Nature*, **1991**, *353*, 414-416.
- Susumu, K.; Oh, E.; Delehanty, J.B.; Blanco-Canosa, J.B.; Johnson, B.J.; Jain, V.; Hervey, W.J.; Russ Algar, W.; Boeneman, K.; Dawson, P.E.; Medintz, I.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 9480-9496.

- Tabazadeh, A. *Atmos. Environ.*, **2005**, *39*, 5472-5480.
- Taden, A.; Antonietti, M.; Heilig, A.; Landfester, K. *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 50-81.
- Tesch, S.; Freudig, B.; Schubert, H. *Chem. Eng. Technol.*, **2003**, *26*, 569-573.
- Thongtem, T.; Phuruangrat, A.; Thongtem, S. *J. Mater. Sci.*, **2007**, *42*, 9316-9323.
- Thurn, K.T.; Brown, E.M.B.; Wu, A.; Vogt, S.; Lai, B.; Maser, J.; Paunesku, T.; Woloschak, G.E. *Nanoscale Res. Lett.*, **2007**, *2*, 430-441.
- Tiwari, J.N.; Tiwari, R.N.; Kima, K.S. *Prog. Mater. Sci.*, **2012**, *57*, 724-803.
- Tolia, J.; Chakraborty, M.; Murthy, Z. V. P., *Cryst. Res. Technol.*, **2012**, *47*, 909-916.
- Tseng, Y.; He, Y.; Lakshmanan, S.; Yang, C.; Chen, W.; Que, L. *Nanotechnology*, **2012**, *23*, 455708.
- Uskokovic, V.; Drogenik, M. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **2005**, *266*, 168.
- Uzcanga, I.; Bezverkhyy, I.; Afanasiev, P.; Scott, C.; Vrinat, M. *Chem. Mater.*, **2005**, *17*, 3575-3577.
- Valizadeh, A.; Mikaeili, H.; Samiei, M.; Farkhani, S. M.; Zarghami, N.; Kouhi, M.; Akbarzadeh, A.; Davaran, S. *Nanoscale Res. Lett.*, **2012**, *7*, 480.
- Viegas, TX.; Bentley, MD.; Harris, JM.; Fang, Z.; Yoon, K.; Dizman, B.; Weimer, R.; Mero, A.; Pasut, G.; Veronese FM. *Bioconj. Chem.*, **2011**, *22*, 976-986.
- Wagner, C.D. *Anal. Chem.*, **1972**, *44*, 972.
- Waite, J.H.; Tanzer, M.L. *Science*, **1981**, *212*, 1038-1040.
- Wan, S.; Guo, F.; Peng, Y.; Shi, L.; Qian, Y. *Chem. Lett.*, **2004**, *33*, 1068-1069.
- Wang, C.; Ma, Q.; Dou, W.; Kanwal, S.; Wang, G.; Yuan, P.; Su, X. *Talanta*, **2009**, *77*, 1358-1364.
- Wang, H.; Zhang, JR.; Zhao, XN.; Xu, S.; Zhu, JJ. *Mater. Lett.*, **2002**, *55*, 253-258.
- Wang, Y.; Lu, J.; Tong, Z.; Li, B.; Zhou, L. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, **2011**, *25*, 393-398.
- Wang, Z.L. in *Characterization of Nanophase Materials, 1st Ed.*; Wiley-VCH: Weinheim, **2001**.
- Warren, B.E. *X-Ray Diffraction*, Dover: Mineola, **1990**.
- Weast, R.C.; Astle, M.J. *Handbook of Chemistry and Physics* (60th ed.), CRC Press, Inc.: Boca Raton, **1983**.
- Wei, Y.; Yang, J.; Jackie Y.; Ying, J.Y. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3179-3181.
- Weissleder, R.; Mahmood, U. *Radiology*, **2001**, *219*, 316-333.
- Weissleder, R.; Ntziachristos, V. *Nature Med.*, **2003**, *9*, 123.
- Willert, M.; Rothe, R.; Landfester, K.; Antonietti, M. *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 4681-4685.
- Williams, D.F. *Biomaterials*, **2008**, *29*, 2941-2953.
- Worrell, W. L.; Iskoe, J. L. *Fast Ion Transport in Solids*; Van Gool Edit.: North Holland, **1973**.
- Xu, C.; Horton, N.G.; Wang, K.; Kobat, D.; Clark, C. G.; Wise, F.W.; Schaffer, C.B. *Nat. Photonics*, **2013**, *7*, 205-209.
- Xu, C.; Wang, L.; Zou, D.; Ying, T. *Mater. Lett.*, **2008**, *62*, 3181-3184.
- Xu, J.; Cui, X.; Zhang, J.; Liang, H.; Wang, H.; Li, J. *Bull. Mater. Sci.*, **2008**, *31*, 189-192.

- Yang, Y.A.; Chen, O.; Angerhofer, A.; Cao, Y.C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 12428-12429.
- Yi-Hsuan, Y.; Tseng, YH.; Yuan, H.; Que, L. *Analyst.*, **2013**, *138*, 3053-3057.
- Yu, XF.; Chen, LD.; Li, M.; Xie, MY.; Zhou, L.; Li, Y.; Wang, QQ. *Adv. Mater.*, **2008**, *20*, 4118-4123.
- Yu, X.; Li-Yun, C.; Jian-feng, H.; Jia, L.; Jie, F.; Chun-yan, Y. *J. Alloys Compd.*, **2013**, *549*, 1-5.
- Zakhalyavko, G.A.; Gorokhovatskaya, N.V.; Goncharuk, V.V. *Chem. Technol. Water*, **1987**, *9*, 459.
- Zangh, HJ.; Zhang, ZZ.; Guo, F.; Jiang, W.; Wang, K. *J. Compos. Mater.*, **2010**, *44*, 2461-2472.
- Zha, Z.; Zhang, S.; Deng, Z.; Li, Y.; Lia, C.; Dai, Z. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 3455-3457.
- Zhang, N.; Yi, R.; Wang, Z.; Shi, R. R.; Wang, H. D.; Qiu, G. Z.; Liu, X. H. *Mater. Chem. Phys.*, **2008**, *111*, 13-16.
- Zhang, X.V.; Martin, S.T.; Friend, C.M.; Schoonen, M.A.A.; Holland, H.D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 11247-11253.
- Zhang, Y.; Pan, C.; Zhang, Y.; He, W. *Cryst. Res. Technol.*, **2011**, *46*, 718-722.
- Zhang, YC.; Wang, H.; Wang, B.; Xu, HY.; Yan, H.; Yoshimura, M. *Opt. Mater.*, **2003**, *23*, 433-437.
- Zhong, X.H.; Feng, Y.Y.; Knoll, W.; Han, M.Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 13559-13563.
- Zou, J.; Jiang, J.; Huang, L.; Jiang, H.; Huang, K. *Solid State Sci.*, **2011**, *13*, 1261-1267.

Appendice

Si riportano gli spettri NMR eseguiti sui prodotti dei singoli stadi della reazione di sintesi del legante PMOXA-nitrodopamina, con le relative attribuzioni.

Dallo spettro in figura A1, relativo al prodotto ottenuto dopo terminazione della polimerizzazione (stadio B dello schema 7b), si può calcolare il numero delle catene costituenti il polimero sintetizzato che risulta pari a 26, coerentemente con quanto atteso dal rapporto monomero:iniziatore utilizzato per la sintesi.

Gli spettri riportati nelle figure A1, A2, A3 sono stati effettuati in CDCl_3 , mentre lo spettro in figura A4 è in D_2O . In quest'ultimo si nota la presenza di picchi relativi ai protoni della dimetilformammide (contrassegnati da * in figura), solvente utilizzato nello stadio E della reazione. Poiché essi cadono nello stesso intervallo di ppm dei protoni metilenici della nitrodopamina, questi non sono osservabili nello spettro registrato.

Infine, in figura A5 si mostra lo spettro in D_2O della nitrodopamina sintetizzata in questo lavoro di tesi per funzionalizzare il polimero mediante lo stadio E.

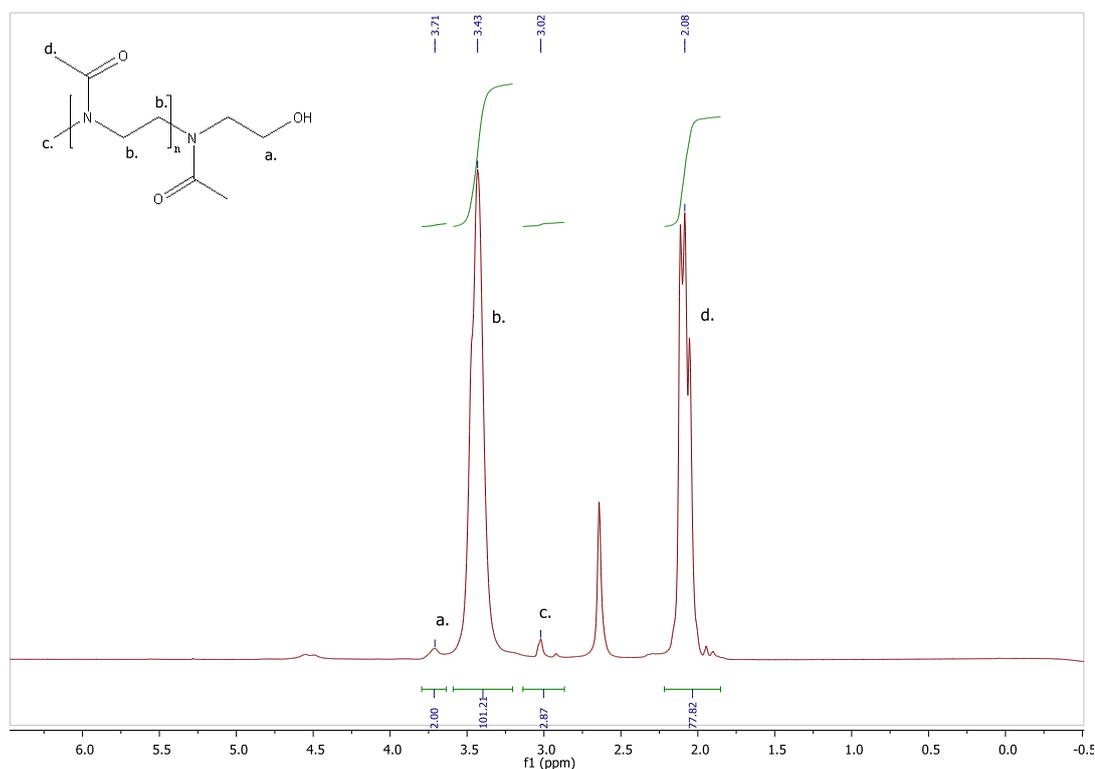


Figura A1. Spettro NMR del prodotto dello stadio B.

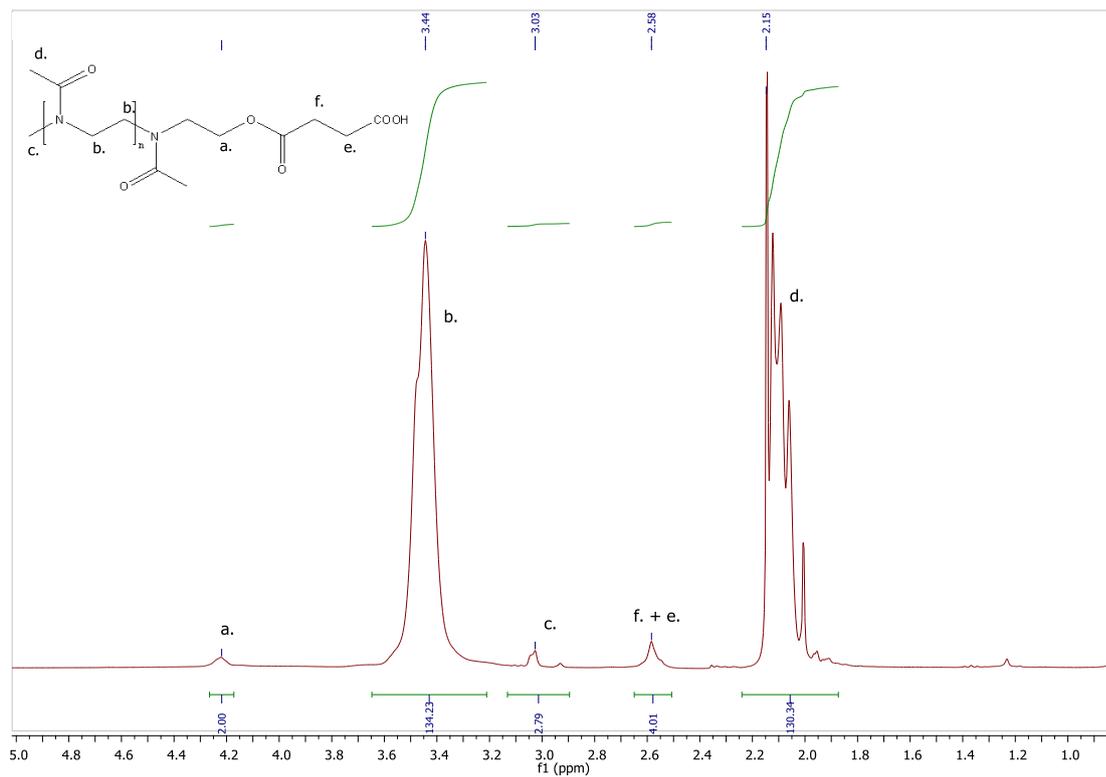


Figura A2. Spettro NMR del prodotto dello stadio C.

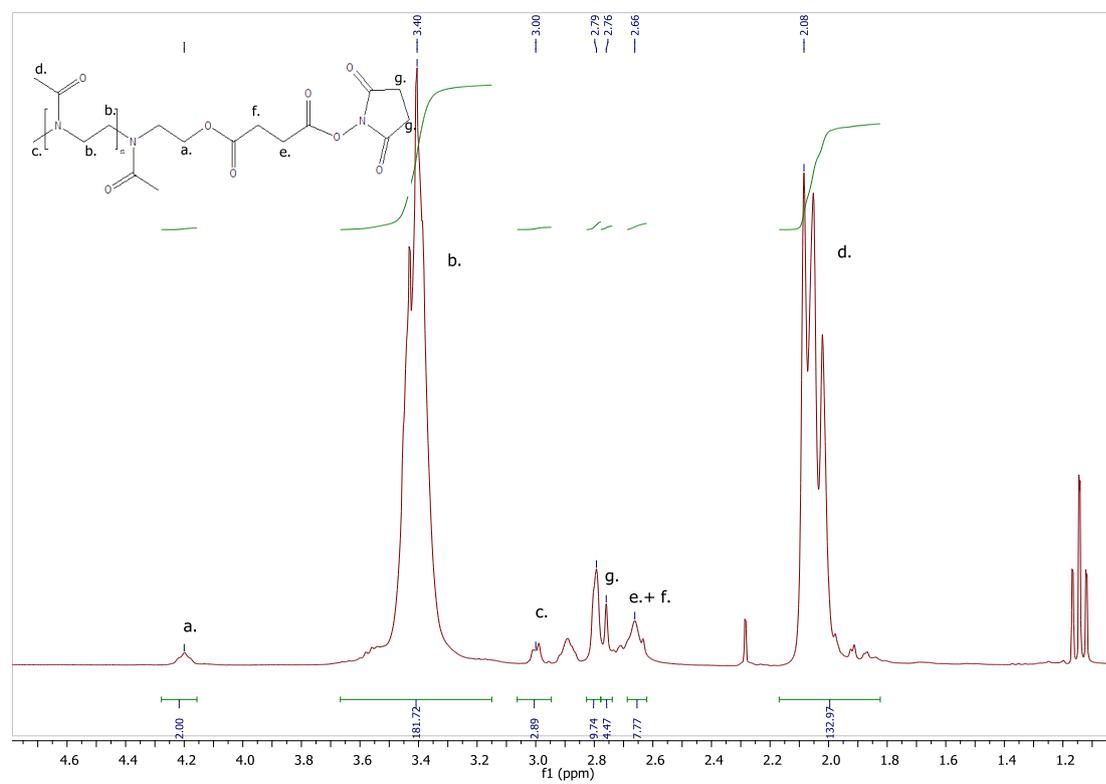


Figura A3. Spettro NMR del prodotto dello stadio D.

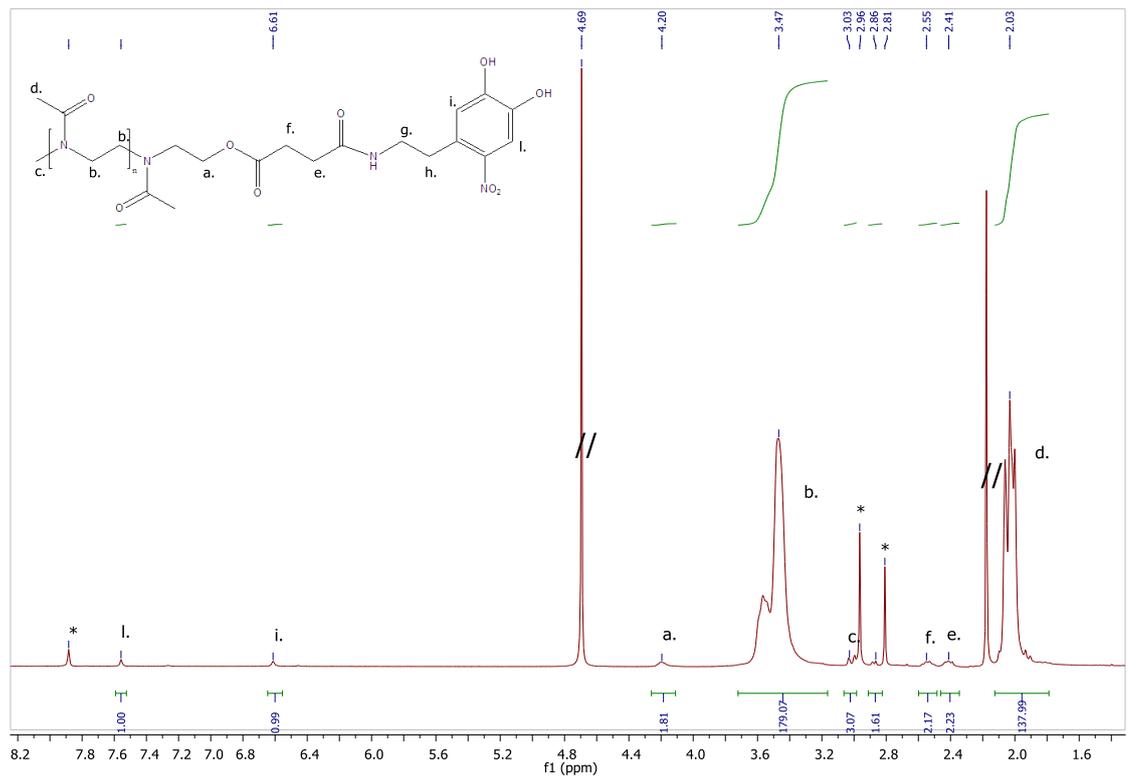


Figura A4. Spettro NMR del prodotto dello stadio E.

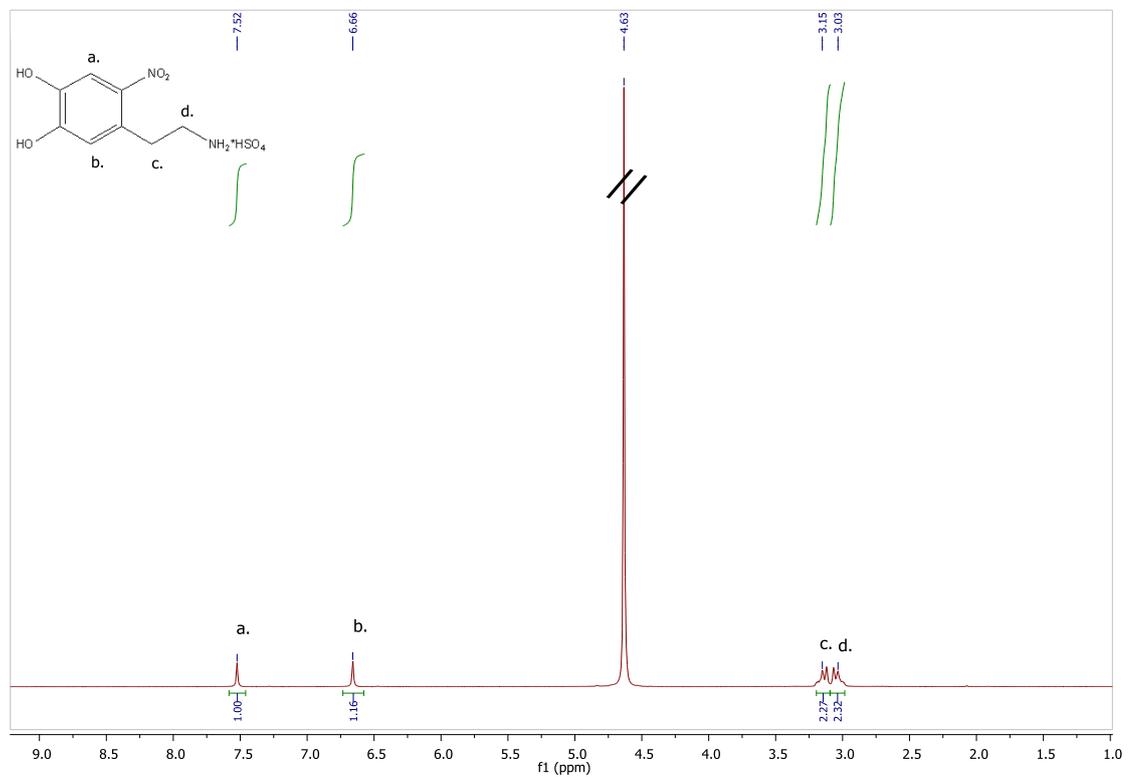


Figura A5. Spettro NMR della nitrodopamina.

Analogamente si riportano gli spettri NMR in CDCl_3 dei primi tre stadi della reazione di sintesi del legante a peso molecolare maggiore (circa doppio) del precedente. Anche in questo caso, dallo spettro in figura A6 è possibile ricavare il numero di catene costituenti il polimero sintetizzato, che risulta pari a 58. Oltre che per il numero di catene, i due polimeri differiscono per il tipo di terminatore utilizzato che, essendo una piperidina sostituita, determina comparsa di picchi relativi ai protoni di questa molecola, non riscontrabili negli spettri precedentemente riportati.

L'ultimo stadio, di cui non si riporta lo spettro NMR, prevede la funzionalizzazione del prodotto dello stadio D con la nitrodopamina.

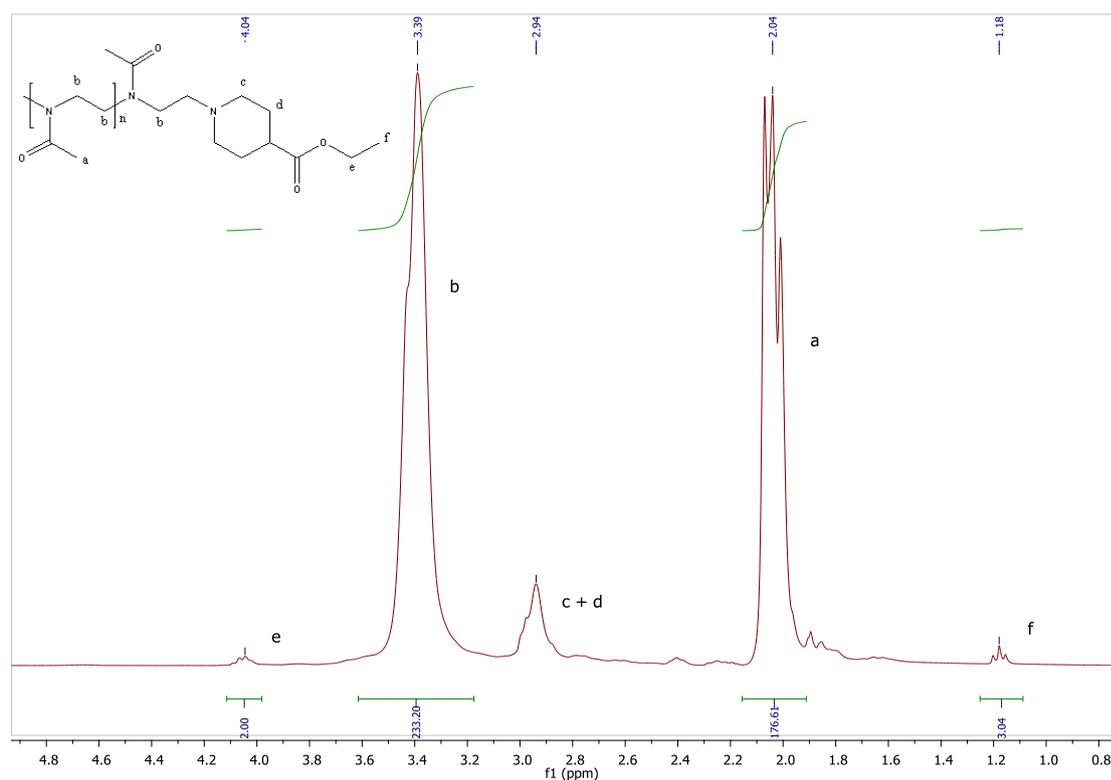


Figura A6. Spettro NMR del prodotto dello stadio B.

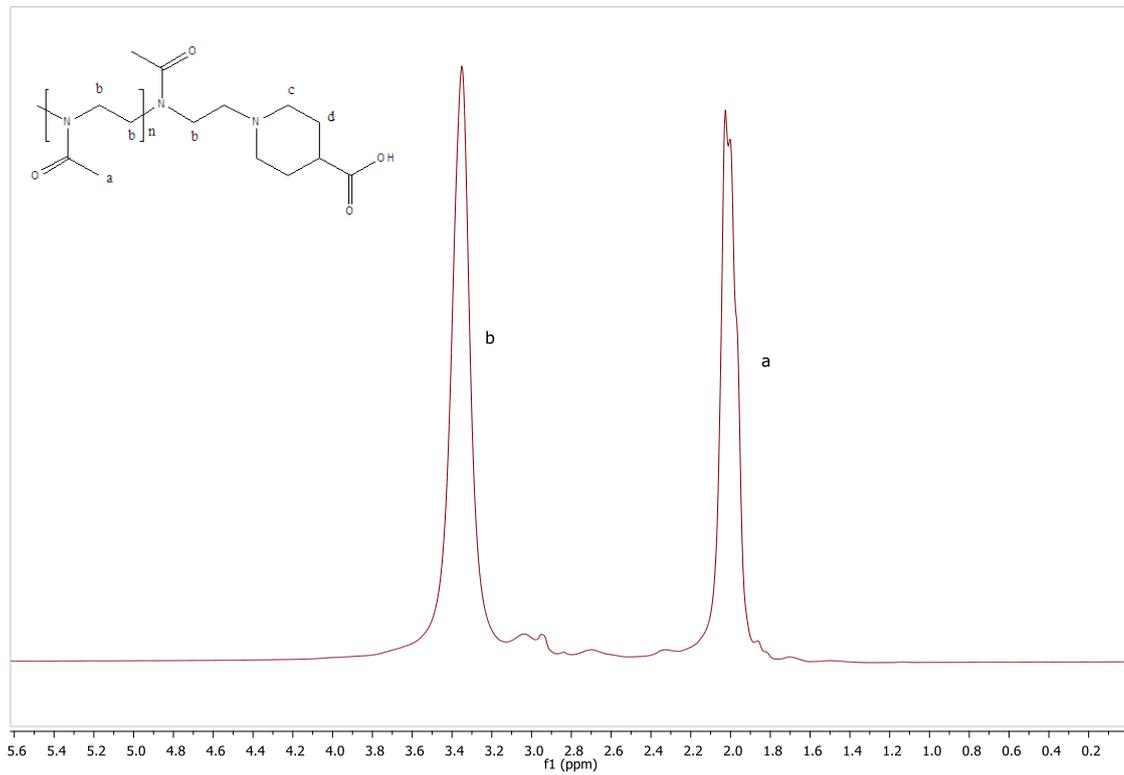


Figura A7. Spettro NMR del prodotto dello stadio C.

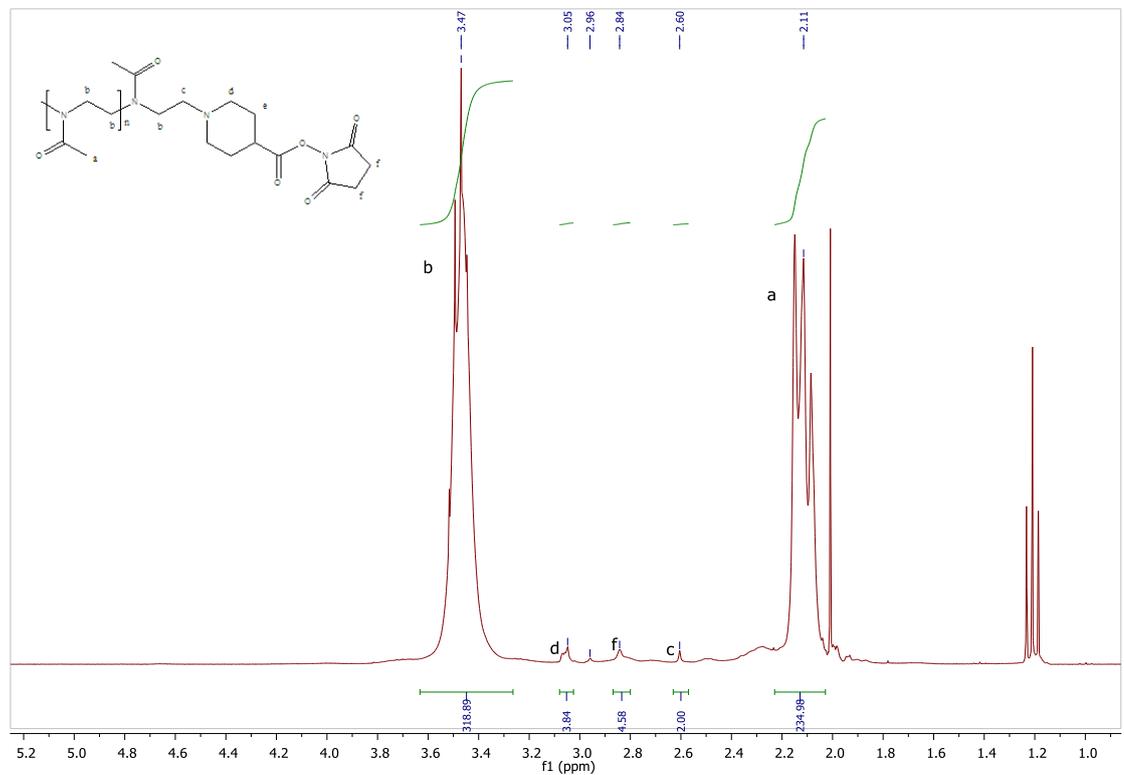


Figura A8. Spettro NMR del prodotto dello stadio D.

Ringraziamenti

Se mi accingo a scrivere questa pagina vuol dire davvero che il mio lavoro e il mio periodo di ricerca nell'ambiente che è stato la mia seconda casa per gli ultimi mesi stanno per finire. Guardandomi indietro rivivo la curiosità dei primi momenti, la voglia di imparare, di fare, la paura di sbagliare qualcosa, i dubbi di fronte all'inspiegabile, le domande a cui trovare risposta più o meno plausibile, la soddisfazione dei primi risultati, le corse da un laboratorio all'altro per portare avanti i progetti, la stanchezza dell'ultimo periodo e l'ansia per quello che mi aspetta.

Dal punto di vista accademico, sono tante le persone che hanno contribuito a rendere il mio lavoro degno di questo nome. Con alcune ho collaborato solo a distanza, con altre più da vicino ma a tutte devo dei ringraziamenti sentiti.

Grazie al Prof. Stefano Gialanella dell'Università di Trento per aver condotto le analisi TEM sui miei campioni e per la disponibilità dimostrata in fase di elaborazione. Grazie anche al Prof. Adolfo Speghini del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona per l'accoglienza e la possibilità di assistere alle misure di luminescenza offertami e per il tempo dedicato all'interpretazione dei risultati. Vorrei ringraziare anche il Prof. Fabrizio Mancin per avermi dato accesso alla strumentazione DLS, il Dott. Denis Badocco e la Dott.ssa Roberta Saini rispettivamente per le analisi ICP e TGA-DSC e infine il Prof. Michele Maggini per avermi dato la possibilità di svolgere parte della mia attività sperimentale nel Suo laboratorio.

Un grazie speciale va a Valerio e a Eddy, mi sono trovata bene a lavorare con voi! A Valerio, grazie per la disponibilità al confronto e al ragionamento, per la presenza in qualsiasi momento e per la serenità nell'affrontare le problematiche. A Eddy, grazie per avermi introdotta alla sintesi dei polimeri, per avermi insegnato un sacco di cose, per aver risposto alle mie perplessità sempre con altre domande, facendomi riflettere su quello che avevo di fronte, per avermi fatto da correlatore ufficioso e soprattutto per il tempo che hai dedicato alla nostra collaborazione.

Non potrei non ringraziare Silvia! Mi sono trovata bene fin dal primo giorno, mai a disagio e sempre libera di dire la mia. Grazie per l'accoglienza, per la fiducia che mi hai dato fin da subito, per l'entusiasmo che trasmetti e perché ci tieni a noi. Grazie per l'esperienza vissuta e per aver contribuito a rendere questo mio ultimo periodo in dipartimento piacevole. Vado via contenta, con tanti bei ricordi da raccontare e tante nuove competenze da sfruttare.

E ora tocca a voi del gruppo di laboratorio! Grazie Stefano per le spiegazioni dei programmi e delle tecniche meno intuitive, grazie Gabri per aver allietato i nostri pranzi nello stanzino buio, grazie mille a Erika, Paolo e Mari, i miei compagni di merende e non solo! Devo spendere due parole per ognuno di voi! Erika, grazie per il sostegno, l'incoraggiamento nei momenti di depressione acuta e per le chiacchierate spensierate. Paolo, grazie per la pazienza, per l'aiuto che mi hai dato sempre, anche quando eri preso da mille altre cose, per il tempo passato insieme (anche se poco, visti i miei impegni di raccoglitrice di margherite!!) e per la varietà degli argomenti di conversazione. Mari, a te devo dire grazie per avermi fatto compagnia in laboratorio dopo un periodo di solitudine prolungato, per aver condiviso con me tutti i momenti di sclero per gli esperimenti non riusciti, l'ansia per la stesura della tesi e la soddisfazione per i risultati; grazie anche per le chicche musicali delle nostre pause pranzo e per i commenti in diretta su tutto quello che abbiamo vissuto.

Ora apro una parentesi meno accademica ma troppo importante per non essere citata! Da quando Padova mi ha adottata cinque anni fa, la mia famiglia si è allargata e ha fatto spazio a

delle persone che mi hanno fatto sentire a casa, fin dal primo giorno di trasferta! Grazie Rita, Giorgia, Claudia, Frunz, Chiara, Giulia, Marta e Zrna..i miei ricordi più belli sono legati a voi! Grazie a Giorgia che, si può dire, ha sempre vissuto con me! Grazie perché ci sei sempre, perché sai sempre cosa dire per tirarmi su, perché con te non mi annoio mai e sei un'amica meravigliosa a cui non si può non voler bene! Grazie Giulia perché tutte le volte che ci vediamo è come se vivessimo ancora insieme! Grazie Frunz per gli anni passati insieme da compagne di stanza e non! Grazie Zrna per la serenità che mi hai trasmesso in questi mesi, per il sostegno nei momenti più difficili e per la semplicità delle serate passate in compagnia, anche solo a chiacchierare! Marta, non mi sto dimenticando di te! Grazie perché senza di te, la casa è diversa (..e non mi riferisco all'apparenza!), il tuo entusiasmo è contagioso, con te si può davvero parlare di tutto e qualsiasi proposta viene accolta bene! Sei una persona fantastica e non sai quanto sono felice che tu sia stata una delle mie coinquiline quest'anno! Grazie per i consigli, per le risate e per le chiacchierate!

Grazie anche a Tiffany, la new entry estiva di casa XX Settembre che ha assistito ai miei momenti di agitazione pre-consegna, ai miei scleri davanti al computer e ai miei crolli di stanchezza serale e ha saputo renderli più leggeri dandomi coraggio, facendomi ridere e svagare!

Manca ancora qualcuno all'appello! Gli scout del Padova 6 che voglio ringraziare per avermi accolta a scatola chiusa, senza sapere niente di me e che mi hanno permesso di conoscere una realtà diversa da quella cui ero abituata e a cui mi sono molto affezionata in questi anni! Grazie Cri, la prima padovana con cui mi sono trovata davvero bene! Un'amica eccezionale, piena di voglia di fare, di cose da dire e di energia da donare! Sei la prima persona a cui penso quando mi succede qualcosa da raccontare! Grazie per le risate fatte insieme, per l'ascolto delle mie paranoie, per tutte le volte che sei venuta a trovarmi, per le nostre cene in posti ignoti, per gli scambi di idee su qualsiasi cosa, dalla più stupida alla più seria, per le avventure scout e non che abbiamo vissuto insieme e per gli abbracci che mi dispensi nei momenti in cui meno me l'aspetto! Grazie mamma e grazie papà per avermi permesso di vivere fuori e di fare la più bell'esperienza della mia vita. Grazie per la fiducia che mi avete dato, più e più volte, per aver messo da parte le preoccupazioni, pur di farmi continuare questa vita e per il sostegno che mi avete dato nei momenti di stanchezza e bisogno. Grazie Franci!! Sei la persona che mi è mancata di più in questi anni, ma che c'è sempre stata lo stesso. Grazie perché credi in me e mi dai sempre forza, perché sai come prendermi e sei speciale.

Ci sarebbero tantissime altre persone da nominare: i compagni di corso, le conoscenze fatte in aula studio, gli amici di amici..ma mi fermo qui. Spero di essere riuscita a restituire a tutti, almeno un po' di quello che ho ricevuto!