

**POLITECNICO DI TORINO**  
**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**  
**BIONANOTECNOLOGIE**  
**ANNO ACCADEMICO 2020/2021**



**Sintesi e caratterizzazione di Carbon Dots  
coniugati con particelle a base di Bismuto Ossido**

**RELATORI:**

**PROF. ALBERTO  
TAGLIAFERRO**

**DR. MATTIA BARTOLI**

**CANDIDATO:**

**GIOVANNI LO BELLO**

**MATRICOLA: 270044**

## Sommario

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	4
<b>1.1</b>	<b>CARBON DOTS (CDs)</b>	4
1.1.1	STRUTTURA	5
1.1.2	PROPRIETA'	6
1.1.3	SINTESI	8
1.1.4	Ottimizzazione metodi di sintesi e proprietà	10
1.1.5	APPLICAZIONI	12
<b>1.2</b>	<b>PARTICELLE DI BISMUTO OSSIDO</b>	14
1.2.1	BISMUTO E BISMUTO OSSIDO	14
1.2.2	SINTESI PARTICELLE	14
1.2.3	PROPRIETA'	15
1.2.4	APPLICAZIONI	16
<b>1.3</b>	<b>TERAGNOSTICA</b>	18
<b>2</b>	<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	20
<b>3</b>	<b>MATERIALI, STRUMENTAZIONE E METODI</b>	20
<b>3.1</b>	<b>MATERIALI</b>	20
<b>3.2</b>	<b>STRUMENTAZIONE</b>	20
3.2.1	STRUMENTAZIONE PER LE SINTESI	20
3.2.2	STRUMENTAZIONE PER LA CARATTERIZZAZIONE	21
<b>3.3</b>	<b>METODI DI SINTESI</b>	21
3.3.1	SINTESI CDs	21
3.3.2	SINTESI PARTICELLE	22
3.3.3	PURIFICAZIONE CDs	23
3.3.4	CONIUGAZIONI	24
<b>4</b>	<b>DISCUSSIONE RISULTATI</b>	25
<b>4.1</b>	<b>CDs</b>	25
4.1.1	DIALISI	27
4.1.2	IR	28
4.1.3	RAMAN	35
4.1.4	FLUORIMETRO	36
<b>4.2</b>	<b>PARTICELLE</b>	40
4.2.1	ANALISI FESEM	42
4.2.2	IR	45
4.2.3	RAMAN	47
<b>4.3</b>	<b>CONIUGAZIONI</b>	50

4.3.1	FESEM .....	50
4.3.2	ANALISI IR .....	52
4.3.3	ANALISI RAMAN.....	53
4.3.4	FLUORIMETRO .....	53
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Riferimenti</b> .....	<b>58</b>

# ABSTRACT

Negli ultimi decenni vi è stato un grande incremento nell'utilizzo dei nanomateriali a base di carbonio i quali hanno suscitato l'interesse di molti ricercatori, grazie alle loro molteplici proprietà e le semplici metodologie di preparazione. Tuttavia, la sintesi di questi nanomateriali, richiede un notevole consumo energetico e l'utilizzo di reagenti molto spesso tossici, con tutte le conseguenze che ciò comporta. Per questo motivo sarebbe auspicabile l'utilizzo di materiali che richiedano metodi di preparazione sostenibili. Con l'obiettivo futuro di poter sviluppare nuove piattaforme teragnostiche, il lavoro di tesi è stato condotto preparando una libreria di composti a base di carbonio, coniugata con quattro differenti tipologie di particelle a base di Bismuto. I composti carboniosi sintetizzati e caratterizzati sono Carbon Dots (CDs), ottenuti tramite sintesi termica del Glucosio. Tali librerie sono state ottenute variando solamente il tempo di permanenza nel reattore. Successivamente, si è passati alla sintesi delle particelle ed alla coniugazione di queste con i Carbon Dots ritenuti migliori. Infine, su queste coniugazioni sono state effettuate caratterizzazioni tramite FESEM, IR e fluorimetro per ottenere informazioni riguardo la struttura.

## 1 INTRODUZIONE

### 1.1 CARBON DOTS (CDs)

I carbon dots (CDs) fanno parte di una nuova classe di materiali fluorescenti a base di carbonio, aventi un diametro inferiore a 10nm. La loro scoperta è avvenuta per caso nel 2004, quando dei ricercatori provarono a purificare nanotubi di carbonio a parete singola [1].

Da quel momento sono stati ampiamente utilizzati in quanto hanno mostrato di poter essere una valida alternativa ai quantum dots (QDs), grazie ai metodi economici di preparazione ed alle loro molteplici proprietà quali intrinseca biocompatibilità, idrosolubilità, inerzia chimica, fotoluminescenza etc. [2]

Questo ampio spettro di proprietà permette loro di poter essere adoperati sia in ambito diagnostico che terapeutico, ad esempio come veicolo per il rilascio di farmaci, come molecole sonda (grazie alla loro eccellente proprietà di fluorescenza), oppure per tecniche di bioimaging e biosensing [3]. Vi sono poi stati negli anni studi che hanno cercato di coniugare nanoparticelle magnetiche (NPs) con i CDs per ottenere combinazioni di proprietà utili per applicazioni quali l'ipertermia nel trattamento del cancro ed in generale, in teragnostica [4].

### 1.1.1 STRUTTURA

Per quanto concerne la struttura negli anni vi sono state molte ipotesi, in quanto si è notato che, utilizzando vari precursori, metodi di preparazione differenti e varie combinazioni tra questi, si ottenevano delle strutture anche molto differenti tra loro [5]. Alcuni ricercatori hanno proposto l'esistenza di un core grafítico, con caratteristiche amorphe o cristalline; altri un core amorfo di carbonio puro ibridato sp<sup>3</sup> etc. [6-7].

Nella struttura dei CDs, è stata riscontrata la presenza di vari gruppi funzionali quali gruppi carbossilici (COOH), carbonilici (C=O) e ossidrilici (OH), con la presenza di altri eteroatomi quali zolfo (S), fosforo (P) etc. [8-9].

A seconda della struttura ipotizzata, i CDs possono essere classificati in 3 categorie:

- **Quantum dots di grafene (GQDs):** presentano una struttura simile a quella degli strati di grafene; possono avere forma circolare o ellittica e presentano delle dimensioni laterali maggiori rispetto alla loro altezza.
- **Carbon nanodots (CNDs):** possiedono una forma sferica e possono avere un reticolo cristallino simile alla grafite nei carbon quantum dots (CQDs) o una struttura amorfa in nanoparticelle di carbonio (CNPs);
- **Polimer dots (PDs):** possono essere o polimeri lineari che hanno subito fenomeni di crosslink e aggregazioni oppure catene polimeriche che si sono aggregate attorno ad un core sferico di carbonio.

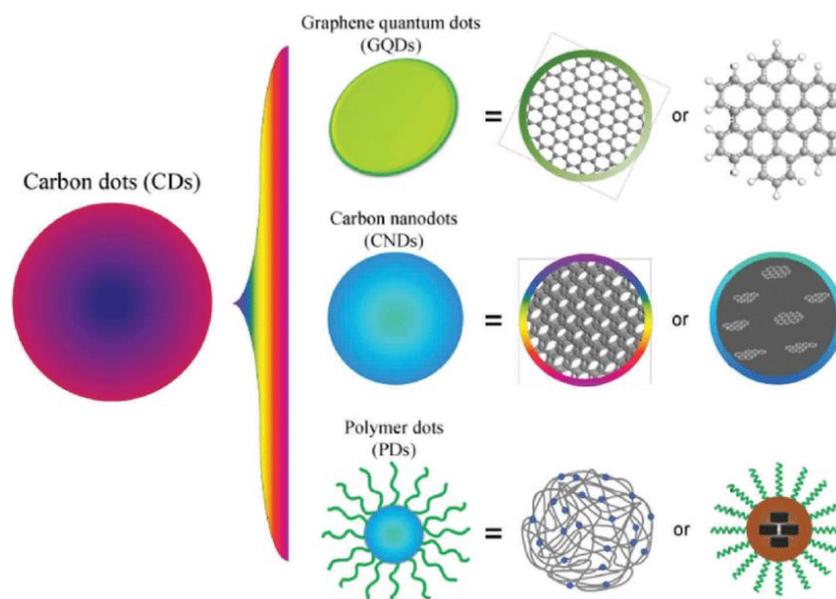


Figura 1 differenti categorie di Carbon Dots (CDs), fonte [10]

Ogni categoria, pur avendo struttura differente dalle altre, esibisce una simile fotoluminescenza [10].

A seconda della struttura e dei componenti dei CDs, si otterranno differenti proprietà.

### **1.1.2 PROPRIETA'**

In quanto nuova classe di nanomateriali di carbonio fluorescenti, i CDs possiedono proprietà attraenti di elevata stabilità chimica, buona conduttività, bassa tossicità, compatibilità ambientale e proprietà ottiche paragonabili ai quantum dots [2]. Facendo una rapida comparazione tra questi nanomateriali, entrambi possiedono sia un'elevata fotoluminescenza che un'altrettanta elevata resa quantica (QY) [11]. La differenza fondamentale tra QDs e CDs consiste nel fatto che i primi sono costituiti da elementi semiconduttori che possiedono un'intrinseca tossicità che al più può essere ridotta tramite onerosi trattamenti chimici, e che limita le loro potenziali applicazioni in vivo [12]. I CDs invece, sono prodotti partendo da semplici composti contenenti carbonio e questo spiega la proprietà di biocompatibilità [13].

I meccanismi fondamentali responsabili della capacità di fluorescenza dei CDs sono molto dibattuti. Alcuni autori hanno fornito prove delle proprietà di fluorescenza dipendenti dalla dimensione, suggerendo che l'emissione derivasse da transizioni elettroniche con il nucleo dei CDs, influenzate dagli effetti di confinamento quantistico, mentre altri lavori hanno piuttosto attribuito la fluorescenza alla ricombinazione di cariche intrappolate in superficie, o hanno proposto una forma di accoppiamento tra il nucleo e gli stati elettronici di superficie [14-15].

Grazie alla presenza di gruppi funzionali sulla superficie, quali gruppi carbossilici (COOH), carbonilici (C=O) ed ossidrilici (OH), i CDs godono di un'eccellente solubilità in acqua e biocompatibilità. Sono anche adatti per la modifica chimica e la passivazione superficiale con vari materiali organici, polimerici, inorganici o biologici. Con la passivazione superficiale, vengono migliorate le proprietà di fluorescenza e le proprietà fisiche dei CDs.

I carbon dots sono stati ampiamente studiati soprattutto per le loro proprietà di emissione di fluorescenza forti e regolabili, che consentono loro applicazioni in vari ambiti [16].

È stato dimostrato che vi è una relazione tra la dimensione dei CDs e lo spettro di emissione. In particolare, si è visto che all'aumentare del diametro dei CDs, corrisponde un'emissione via via shiftata sul rosso [17] in quanto in questo modo diminuisce l'energia del picco di assorbimento.

Inoltre, alcuni ricercatori hanno dimostrato che la presenza di gruppi funzionali quali C=O e C=N possa influenzare le caratteristiche di fluorescenza di questi composti carboniosi [18]. Si è notato in particolare, che all'aumentare della presenza di ossigeno lo spettro di emissione sia shiftato sul rosso.

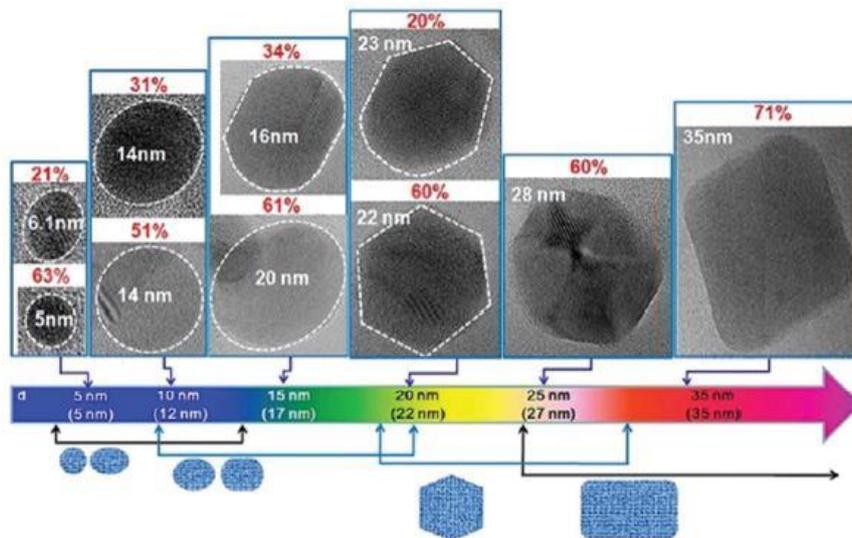


Figura 2: relazione tra dimensione dei CDs e lo spettro di emissione, fonte [17]

I CDs hanno dimostrato di possedere un'elevata resistenza al fotobleaching; questo può essere utile per applicazioni riguardanti l'imaging cellulare a lungo termine [5], [19], [20].

Le eccezionali proprietà elettroniche dei CDs come donatori e accettori di elettroni originano chemiluminescenza e luminescenza elettrochimica, conferiscono loro ampi potenziali in vari ambiti.

I CDs mostrano tipicamente l'assorbimento ottico nella regione UV con una coda che si estende fino all'intervallo visibile.

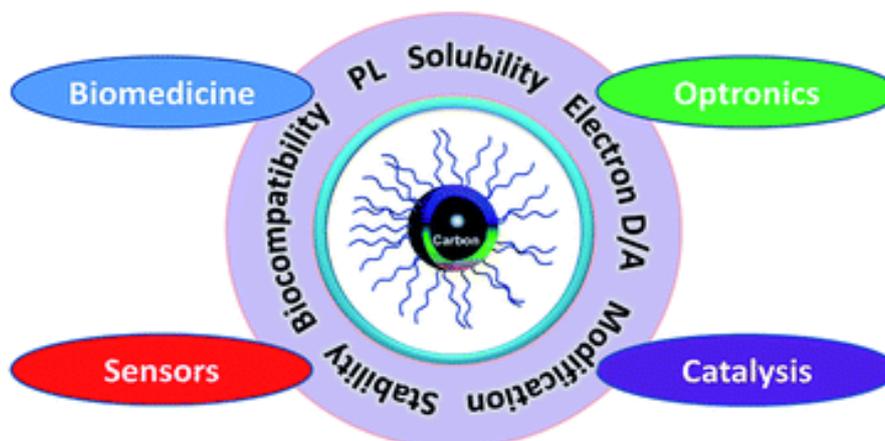


Figura 3 Alcune proprietà dei CDs legate alle applicazioni biomedicali

### 1.1.3 SINTESI

Essenzialmente esistono due metodologie principali per la sintesi dei CDs:

- Approccio **top-down**;
- Approccio **bottom-up**;

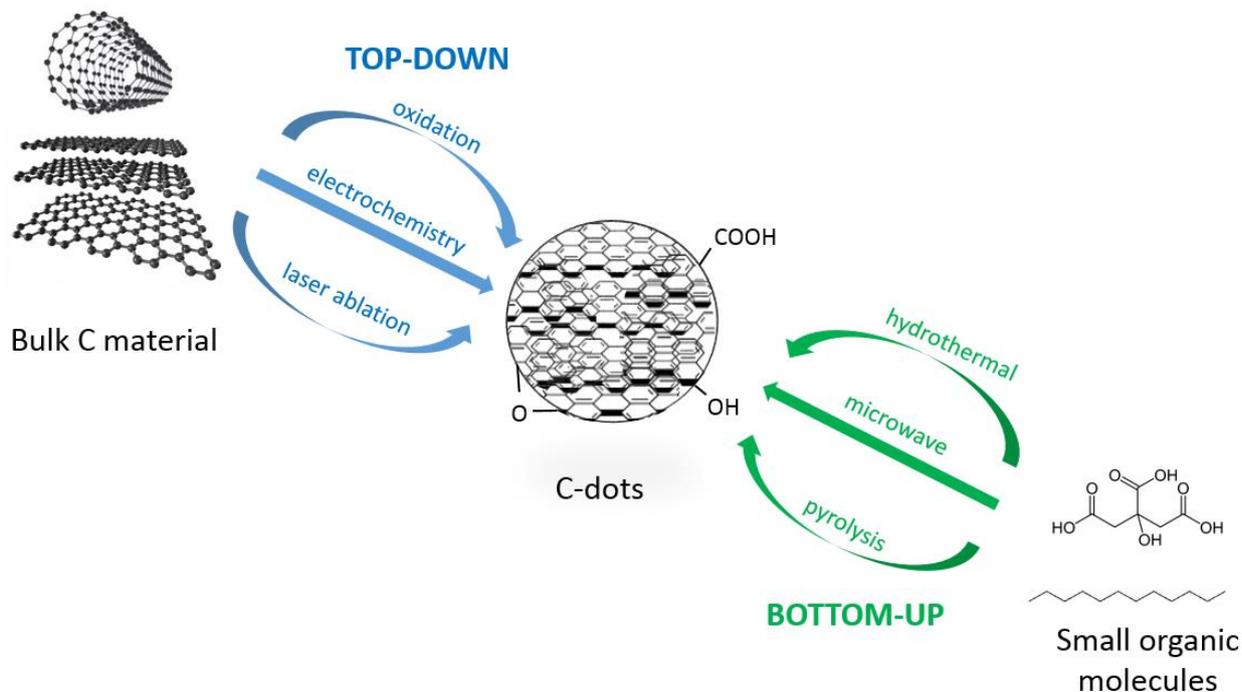


Figura 4: Metodi di sintesi dei CDs.

Il percorso sintetico "top-down" permette l'ottenimento dei CDs grazie alla scomposizione di strutture di carbonio più grandi come grafite, nanotubi di carbonio utilizzando tecniche di ablazione laser, scarica ad arco e tecniche elettrochimiche.

Il percorso sintetico "bottom-up" invece, implica la sintesi di CDs partendo da piccoli precursori come carboidrati, citrato e nanocompositi polimero-silice tramite trattamenti idrotermali e percorsi sintetici a microonde.

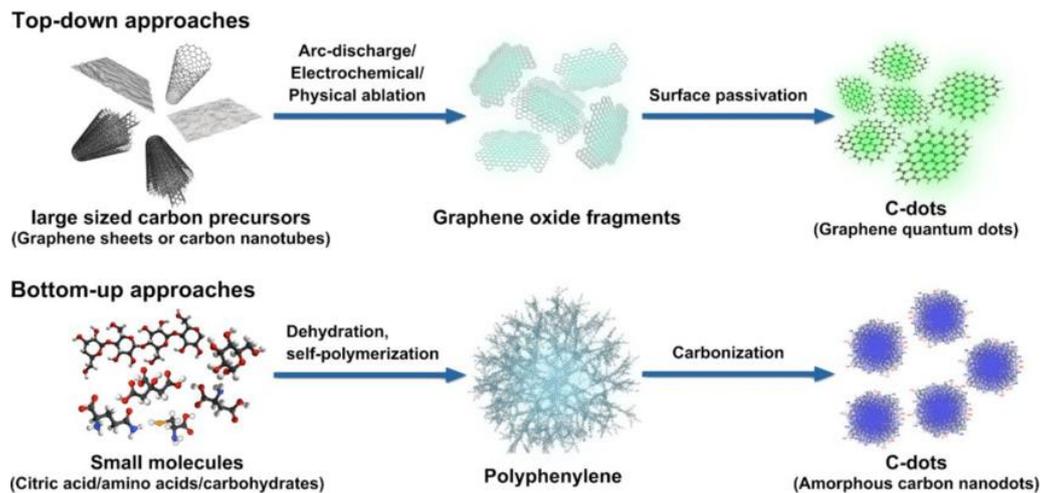


Figura 5: Metodi di sintesi dei CDs, fonte [9]

### 1.1.3.1 Metodi sintetici top-down

#### Ablazione laser

Questa tecnica sfrutta l'utilizzo di una sorgente laser ad alta energia per irradiare la superficie del target. In questo modo, a causa delle elevate temperature e pressioni raggiunte, quest'ultimo evapora e successivamente cristallizza per formare delle nanoparticelle [21]. Complessivamente, l'ablazione laser permette di ottenere dei CDs dotati di una buona solubilità in acqua, elevate caratteristiche di fotoluminescenza ed un'omogenea distribuzione dimensionale, come dimostrato nello studio condotto da Hu et al. [22].

#### Ossidazione acida

È un metodo molto utilizzato che causa esfoliazione e decomposizione di materiali carboniosi in nanoparticelle e simultaneamente permette l'introduzione di gruppi idrofilici quali gruppi ossidrilici e carbossilici sulla superficie dei CDs così ottenuti [23].

### 1.1.3.2 Metodi sintetici bottom-up

#### Irradiazione a microonde

L'irradiazione a microonde di composti organici è un metodo rapido ed economico per sintetizzare i CDs. Questo metodo è stato effettuato nello studio condotto da Zhu et al. Nel quale sono stati sintetizzati dei CDs combinando PEG<sub>200</sub> e glucosio in soluzione acquosa formando una soluzione trasparente ed inserendo il tutto in un forno a microonde [24]. I CDs così ottenuti hanno esibito delle proprietà di fotoluminescenza dipendenti dall'eccitazione.

## **Trattamento idrotermico / solvotermico**

La carbonizzazione idrotermale (HTC) o la carbonizzazione solvotermica è una via a basso costo, rispettosa dell'ambiente e non tossica per produrre nuovi materiali a base di carbonio da vari precursori. Tipicamente, una soluzione di precursore organico viene sigillata e fatta reagire in un reattore idrotermico ad alta temperatura. I CDs possono essere preparati partendo da differenti precursori come glucosio, acido citrico, chitosano, succo di banana, e proteine [24]. In questo caso, quello che viene sfruttato è essenzialmente l'utilizzo di temperature superiori ai punti di fusione dei precursori utilizzati in modo da ottenere, tramite una successione di reazioni di condensazione, strutture carboniose.

### **1.1.4 Ottimizzazione metodi di sintesi e proprietà**

I metodi di sintesi sopra elencati, possono essere ottimizzati o durante la preparazione o il post-trattamento. La modifica dei CDs è molto importante per ottenere buone proprietà superficiali essenziali per la solubilità e per applicazioni selezionate.

Per evitare che le superfici dei CDs vengano inquinate dal loro ambiente, può essere eseguito un trattamento di passivazione superficiale che permetta di alleviare l'influenza dannosa della contaminazione superficiale sulle loro proprietà ottiche. Viene formato un sottile strato isolante per ottenere la passivazione superficiale tramite l'attacco di materiali polimerici sulla superficie dei CDs trattata con acido [25].

Oltre alla passivazione superficiale, il doping è un metodo comune utilizzato per mettere a punto le proprietà dei CDs. Vari metodi di drogaggio con elementi come N, S, P sono stati adoperati per sintonizzare le proprietà dei CDs, tra cui il drogaggio N è il modo più comune per la sua grande capacità di migliorare la fotoluminescenza emessa [26].

I metodi di passivazione superficiale e drogaggio per le modifiche vengono solitamente applicati per migliorare la resa quantica. Questo è un aspetto molto importante da considerare in quanto, per poter competere con i quantum dots semiconduttori convenzionali, è necessario ottenere una resa quantica elevata. Sebbene sia stato sintetizzato un buon esempio di CDs con una resa quantica dell'80% circa, la maggior parte dei CDs sintetizzati ha finora una resa quantica inferiore al 10% [27].

Tutti questi approcci sintetici menzionati precedentemente, tuttavia, richiedono l'utilizzo di reagenti chimici tossici ed elevata energia; ne è un esempio l'ossidazione chimica, la quale sfrutta potenti agenti ossidanti (ad esempio acidi) durante la sintesi dei CDs che sono svantaggiosi per quanto riguarda l'influenza sull'impatto ambientale [28].

Per questo motivo, recentemente sono stati sviluppati approcci "green" per la sintesi dei CDs in modo da trovare proprio un'alternativa all'utilizzo di reagenti tossici e agli sprechi energetici.

Questi metodi innovativi utilizzano precursori ottenuti da biomasse per l'ottenimento dei CDs rendendo i metodi di sintesi molto meno dispendiosi e facili da ottenere. Grazie alla loro grande disponibilità, al basso costo per la loro lavorazione e produzione su larga scala, l'utilizzo di questi precursori grezzi introduce vantaggi significativi per la produzione industriale e per le applicazioni dei CDs. Possono essere utilizzati vari tipi di precursori naturali quali scarti del tè, bucce di arance, caffè etc.

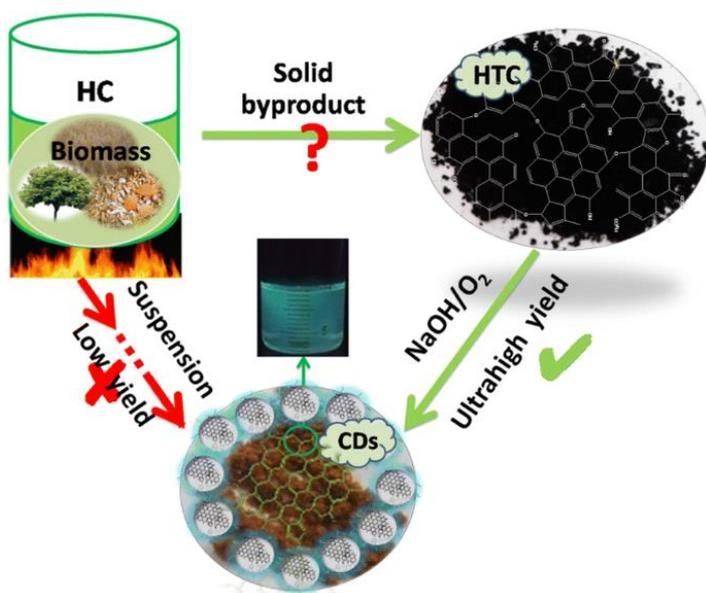


Figura 6: Sintesi green dei CDs, fonte [29]

Un problema di questi approcci green è dato dalla scarsa resa dei CDs. Zhao et al hanno dunque proposto un metodo di sintesi molto efficiente per l'ottenimento di CDs fluorescenti a partire da carbonio idrotermale prodotto da precursori ottenuti da biomassa (HTCs) [29]. Quello che è stato notato è che, rispetto ad altri metodi attuali di sintesi green dei CDs, si è riusciti ad ottenere una resa pari al 42.5% a partire dal peso della biomassa, ed una resa pari al 99.0% a partire dal peso del HTC.

Esistono tre problemi che devono essere affrontati per la sintesi dei CDs [30]:

- **aggregazione carboniosa durante la carbonizzazione:** può essere evitata utilizzando metodi di sintesi elettrochimica o pirolisi confinata;
- **controllo delle dimensioni e uniformità:** possono essere ottimizzate tramite post-trattamento, come l'elettroforesi su gel, la centrifugazione e la dialisi;
- **proprietà della superficie:** fondamentali per le proprietà di solubilità e per le successive applicazioni; possono essere regolate durante la preparazione o il post-trattamento.

Molti sforzi si sono concentrati sulla preparazione di nuovi ibridi costituiti da CDs e nuclei di nanoparticelle inorganiche (*ad es.* Ossido di ferro [3], ossido di zinco, silice [31], e titania [32]). Gli ibridi risultanti hanno dimostrato la capacità di integrare le proprietà di fluorescenza dei CDs con le proprietà magnetiche, ottiche o meccaniche dei nuclei di ossido. Tali ibridi sono molto promettenti come agenti di biomarcatura magneto-ottici o efficienti fotocatalizzatori.

### 1.1.5 APPLICAZIONI

Grazie alle proprietà di fluorescenza e biocompatibilità, i CDs possono essere utilizzati per il bioimaging, biosensing ed anche drug-delivery. Iniettando solventi contenenti CDs in un corpo vivente, è possibile ottenere immagini in vivo a scopo di rilevamento o diagnosi [33].

I CDs applicati nel biosensing hanno mostrato buone capacità come trasportatori di biosensori per la loro flessibilità nella modifica, elevata solubilità in acqua, non tossicità, buona fotostabilità ed eccellente biocompatibilità [34].

In particolare, la non tossicità e la biocompatibilità dei CDs consentono loro ampie applicazioni in biomedicina come trasportatori di farmaci, traccianti fluorescenti e controllo del rilascio di farmaci. Questo è esemplificato dall'uso di CDs come fotosensibilizzatori nella terapia fotodinamica per distruggere le cellule tumorali. I CDs adoperati nel drug delivery spesso sono coniugati con acido aspartico e glicina e sono capaci di incorporare farmaci come la doxorubicina, dotata di elevate capacità antineoplastiche [35].

Grazie poi al successo riscontrato durante gli esperimenti in vitro, alcuni studiosi hanno indagato l'utilità dei CDs tramite esperimenti in vivo su modelli murini, verificando il mantenimento delle proprietà di fluorescenza, non tossicità (per le concentrazioni necessarie alle analisi) e biodistribuzione dei CDs [36-37].

Zheng et al hanno condotto uno studio nel quale hanno dimostrato la possibilità di utilizzare i CDs, ed in particolare i GQDs, per trattamenti contro il cancro. I GQDs, nel momento in cui vengono irraggiati con luce blu, sono in grado di produrre delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) le quali sottopongono ad un elevato stress ossidativo le cellule tumorali inducendone la necrosi [38].

In un altro studio, alcuni ricercatori hanno dimostrato la potenzialità nell'utilizzo dei CDs sia come trasportatori di farmaci capaci di interagire con il nucleo cellulare che come agenti contro le cellule tumorali [39].

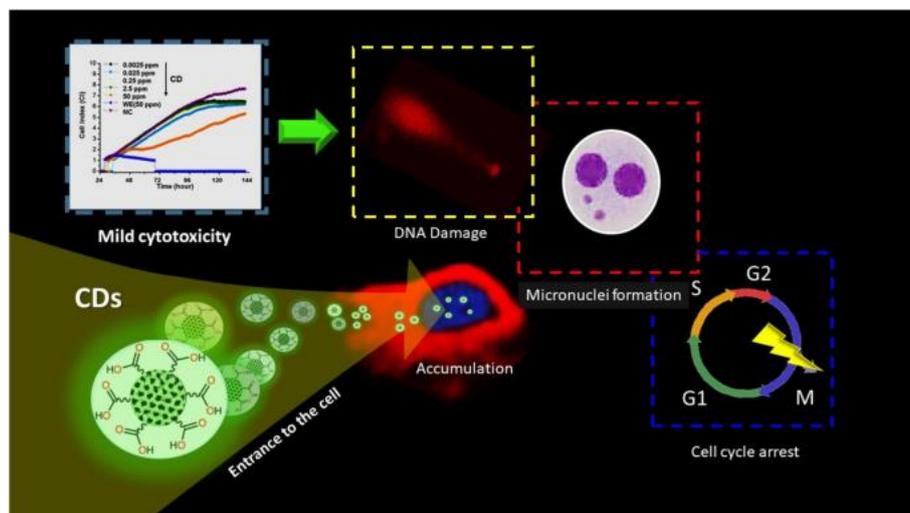


Figura 7: Overview of CD impact on Human Breast Cancer (MCF-7) Cell Line, fonte [39]

## **1.2 PARTICELLE DI BISMUTO OSSIDO**

### **1.2.1 BISMUTO E BISMUTO OSSIDO**

Il Bismuto (Bi), è un metallo pesante diamagnetico dotato di varie proprietà quali non tossicità, elevato coefficiente di attenuazione ai raggi X, elevata assorbanza al NIR; se irradiato, presenta un'eccellente efficienza nella conversione della luce in calore, etc. [40]. Per questi motivi il Bismuto è stato prodotto sottoforma di particelle, cercando di combinare le sue proprietà in ambito biomedico. Sono state esaminate particelle di ossido di Bismuto per scopi terapeutici. L'ossido di Bismuto ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ), è un semiconduttore dotato di eccellenti proprietà fisiche che permettono applicazioni in ambito sensoristica [41] e fotocatalisi [42].

### **1.2.2 SINTESI PARTICELLE**

Negli anni sono stati implementati vari metodi per la sintesi di quest'ossido come sol-gel, trattamenti idrotermali, irradiazione a microonde etc. [43-44] i quali hanno permesso di ottenere diverse morfologie di  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ . Si è inoltre notato che l'utilizzo, durante la sintesi, di differenti surfattanti, come acido oleico [45], glicole etilenico [46] e PEG [47], ha permesso a vari studiosi di ottenere un particolare controllo morfologico, ricavando forme simili a fiori, ad aghi o a tetraedri, dimostrando dunque l'importanza del surfactante utilizzato sulla morfologia del bismuto ossido prodotto.

Un approccio molto comune impiegato nella sintesi di queste particelle è il trattamento idrotermale, il quale permette la nucleazione e crescita di cristalli in soluzione acquosa utilizzando temperature elevate ( $300^\circ\text{C}$ ) ed alta pressione in quanto si è visto che tali reagenti non sono solubili per valori di temperatura pari a  $100^\circ\text{C}$  e pressioni di circa 1 atm. La reazione normalmente avviene in autoclave, un reattore in teflon rivestito di platino, oro o argento per proteggere l'autoclave dalla presenza di agenti corrosivi [48]. Un vantaggio di questo approccio consiste nel fatto che, settando adeguatamente i parametri di reazione quali temperatura, pressione, pH e tempo di reazione, si possano ottenere differenti morfologie di BiNPs.

Cui et al, hanno dimostrato che la dimensione, la forma e l'attività fotocatalitica di alcune particelle a base di Bismuto Ossido siano fortemente dipendenti dal valore di pH (contenuto di NaOH) della soluzione iniziale [40]. Si è notato che, per un valore di pH compreso tra 1 e 4, le particelle presentavano una struttura simile ad un fiore, con una taglia che andava diminuendo all'aumentare del valore di pH.

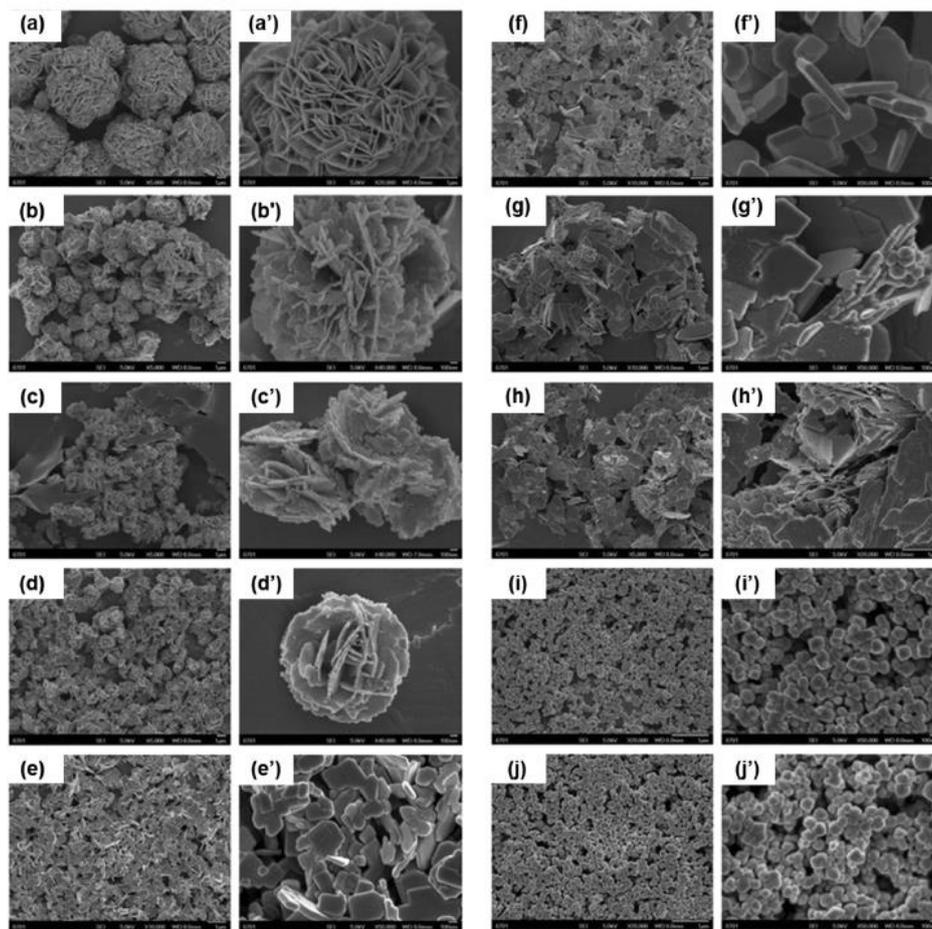


Figura 8: Influenza del pH sulla morfologia e dimensione delle particelle di Bismuto. Immagini SEM di particelle preparate a: (a) pH 1; (b) pH 2; (c) pH 3; (d) pH 4; (e) pH 5; (f) pH 7; (g) pH 8; (h) pH 9; (i) pH 10, e (j) pH 11. Fonte (40).

Altri metodi che vengono utilizzati per la sintesi di queste particelle prevedono l'utilizzo di ultrasuoni o di irradiazione al microonde [40] in quanto permettono l'ottenimento di particelle a base di Bismuto dotate di elevata purezza e varia morfologia, mantenendo un basso tempo di reazione ed un'elevata efficienza energetica.

### 1.2.3 PROPRIETA'

Le particelle a base di Bismuto recentemente hanno suscitato l'attenzione di molti studiosi per via dell'ampio spettro di proprietà mostrato, come ad esempio l'alta stabilità, elevata area superficiale, forte comportamento diamagnetico, elevata magnetoresistenza, facilità di funzionalizzazione, inerzia chimica, basso costo etc. Tutte queste proprietà rafforzano l'idea di poter utilizzare queste particelle per applicazioni in vivo, risolvendo quelli che sono i problemi nell'utilizzo di particelle a base di Argento [49].

## 1.2.4 APPLICAZIONI

Le particelle di bismuto hanno mostrato, grazie alle loro vaste proprietà, di essere adatte per applicazioni biologiche. Hanno dimostrato di possedere un'elevata attività antibatterica contro varie tipologie di batteri [50] pur mantenendo una dose abbastanza ridotta. Possono inoltre essere sfruttate come agenti nella fototerapia in quanto presentano un'elevata assorbanza nel NIR [40]

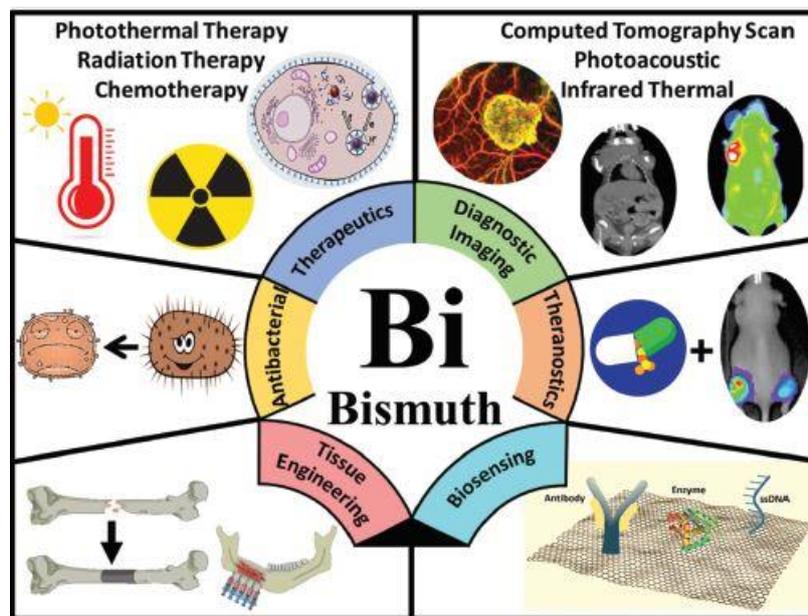


Figura 9: Applicazioni del bismuto, fonte [40]

Un aspetto da attenzionare tuttavia, è il fatto che queste particelle, pur non avendo caratteristiche intrinseche di tossicità, hanno dimostrato un aumento delle problematiche all'aumentare della dose di iniezione. Per cercare di avere una visione più ampia sull'argomento Mishra et al [51] hanno sintetizzato delle particelle a base di Bismuto che sono state successivamente iniettate in modelli murini. Quello che è stato notato era la presenza di specie ROS a livello polmonare, con conseguente stress ossidativo, infiammazione e morte cellulare.

In ambito biomedico, le particelle a base di Bismuto possono essere sfruttate in vari modi. Possono ad esempio essere ricoperte da uno shell polimerico a base di PEG in modo da essere rese "meno visibili" al sistema immunitario durante l'iniezione e ridurre l'effetto tossico sulle cellule a parità di dose.

Per riuscire inoltre a mantenere per più tempo queste particelle in circolo, si è pensato di utilizzare un rivestimento biomimetico, ricoprendo le particelle con la membrana dei globuli rossi [52]. Come si nota dall'immagine sottostante, il rivestimento delle particelle a base di Bismuto permette di mantenere in circolo un maggior quantitativo di particelle, migliorando l'eventuale efficacia del trattamento.

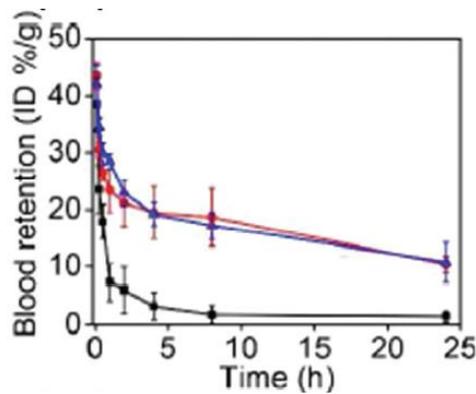


Figura 10: Tempo di circolazione delle BiNPs (curva nera), BiNPs rivestite tramite membrana biomimetica (rossa), BiNPs rivestite da membrana biomimetica modificata con folati, fonte [52]

Anche se un maggior tempo di permanenza in circolo è utile per un miglior effetto terapeutico, le particelle a base di Bismuto, una volta svolta la loro funzione devono essere smaltite dall'organismo. Questo avviene tramite due modalità: la clearance renale e quella epatica. Per quanto riguarda la clearance renale, affinché il meccanismo di smaltimento sia efficiente, le particelle a base di Bismuto non dovrebbero avere delle dimensioni eccessive (circa 6nm). Per riuscire a superare questo ostacolo dovrebbero essere ottimizzati i metodi di sintesi altrimenti le particelle dovrebbero essere degradate in modo da poter essere smaltite in maniera più efficace.

Le particelle di bismuto hanno dimostrato inoltre di poter essere una valida alternativa ad altri agenti di contrasto quali Iodio, Bario, Gadolinio e Tungsteno utilizzati in tomografia computerizzata (CT). Il Bismuto possiede infatti un elevato coefficiente di attenuazione ai raggi X, un minore costo e bassa tossicità.

Li et al [53] hanno sviluppato dei nanocristalli di Bismuto PEGilati (Bi-PEG NCs) come agenti di contrasto per CT ad elevate prestazioni; questi nanocristalli sfruttano l'effetto EPR (maggiore permeabilità e ritenzione) e fenomeni di accumulazione passiva nel tumore causando un aumento progressivo dell'intensità del segnale.

Nell'immagine sottostante di nota come l'imaging di un adenocarcinoma in un modello murino sia più facilmente rilevabile grazie all'accumulo dei nanocristalli di Bismuto iniettati per via intravenosa.

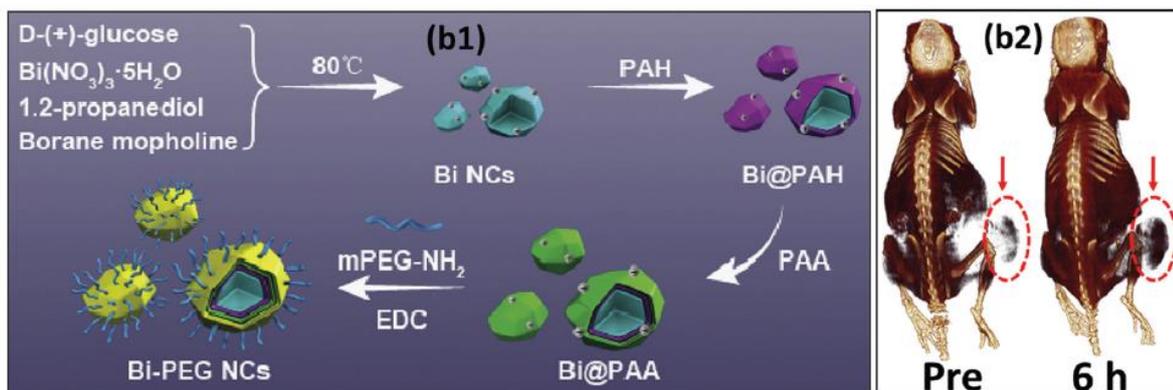


Figura 11: Processo di sintesi dei nanocristalli di Bismuto funzionalizzati con PEG (b1), immagine CT 3D del tumore prima e dopo 6h l'iniezione dei nanocristalli (b2), fonte [53].

### 1.3 TERAGNOSTICA

Il termine teragnostica appartiene all'ambito della medicina nucleare, nella quale viene definita come l'utilizzo di una specifica sostanza legata ad un radionuclide che rende possibile nei pazienti la diagnosi ed il successivo utilizzo di un agente simile o identico allo scopo di trattare la patologia [54].

La teragnostica, come suggerisce la parola, è una combinazione tra diagnostica e terapia. Tale definizione è molto ampia e può includere numerosi approcci. In ambito medico si può parlare di teragnostica quando si utilizzano dei preparati che sono progettati per rilasciare, ad esempio, farmaci [55] a livello di un determinato target, o per detectare ioni e/o proteine [4], permettendo di ottenere una migliore efficacia nel trattamento.

I CDs hanno dimostrato di avere ampie possibilità nel loro utilizzo in piattaforme teragnostiche: tramite trattamenti superficiali possono essere caricati con farmaci utili per il drug delivery [55].

Combinando la proprietà di fotoluminescenza dei CDs, con le proprietà magnetiche di particelle magnetiche, si ottiene un effetto combinato utile sia per la localizzazione che per il trattamento di un tumore [18].

In questo ambito i CDs vengono molto spesso utilizzati nelle terapie contro il cancro [56]. Essi, grazie alle loro proprietà quali bassa citotossicità, elevato rapporto superficie volume e dimensioni ridotte, possono essere adoperati per rilasciare agenti chemoterapeutici sia a scopo di diagnosi che a scopo terapeutico.

Un grande vantaggio dei CDs è il fatto che essi riescano a variare la loro proprietà di fluorescenza a seconda della temperatura. Questa proprietà è considerata molto utile per usi biomedici, come ad esempio il rilascio di farmaci alla temperatura corporea [57].

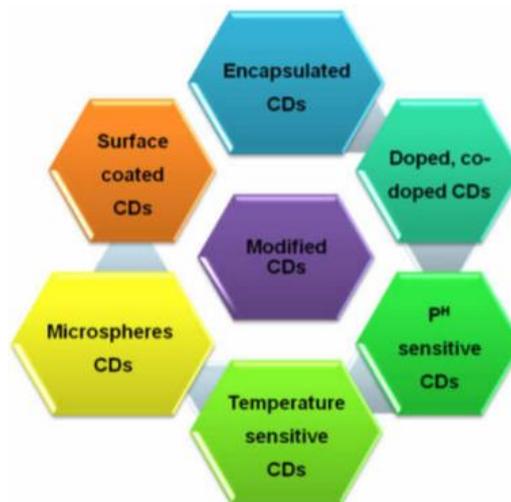


Figura 12: Diagramma schematico di differenti tipi di CDs ottenuti attraverso differenti strategie di sintesi, fonte [56].

## **2 SCOPO DEL LAVORO**

Il lavoro di tesi è stato condotto preparando una libreria di composti a base di carbonio, coniugata con quattro differenti tipologie di particelle di Bismuto ossido con l'obiettivo futuro di poter sviluppare nuove piattaforme teragnostiche. I composti carboniosi sintetizzati sono Carbon Dots (CDs), ottenuti tramite degradazione termica del Glucosio.

## **3 MATERIALI, STRUMENTAZIONE E METODI**

### **3.1 MATERIALI**

Per la sintesi dei CDs da me prodotti è stato semplicemente utilizzato del glucosio anidro (acquistato da Dolcincasa.com S.a.s.).

Per la sintesi delle particelle è stato utilizzato del Bismuto nitrato pentaidrato (acquistato da MERCK.), acido nitrico (acquistato da Sigma-Aldrich), soda caustica (acquistata da Amacasa), PEG<sub>4000</sub> (acquistato da Sigma-Aldrich, Polonia), PVP (acquistato da Alfa Aesar), SDS (acquistato da Carlo Erba Reagents), acido laurico (acquistato da Sigma-Aldrich).

### **3.2 STRUMENTAZIONE**

#### **3.2.1 STRUMENTAZIONE PER LE SINTESI**

Le strumentazioni impiegate per le varie sintesi effettuate sono un sonicatore Vibra Cell (acquistato da Sonics), una piastra calda ed una piastra magnetica (Velp scientifica). Per la sintesi dei CDs sono stati utilizzati dei reattori tubolari realizzati in vetro PYREX. Il processo di purificazione dei CDs ha richiesto l'utilizzo di una membrana per dialisi, avente un cut-off pari a 3500 Da acquistata presso Aliexpress, e successivamente di una piastra magnetica. Per le filtrazioni è stata utilizzata una pompa a vuoto. Infine, per l'essiccazione dei prodotti è stato utilizzato un forno.

### 3.2.2 STRUMENTAZIONE PER LA CARATTERIZZAZIONE

I composti sintetizzati sono stati successivamente analizzati mediante spettroscopia a infrarossi IR, analisi in fluorescenza mediante fluorimetro e microscopio a scansione elettronica FESEM. Gli spettri ottenuti sono stati poi elaborati mediante il software Origin Pro, mentre le schematizzazioni delle varie formule chimiche coinvolte nei diversi processi di reazione sono state realizzate mediante il software ChemDraw.

### 3.3 METODI DI SINTESI

#### 3.3.1 SINTESI CDs

Il processo di preparazione dei CDs da me prodotti è molto semplice; si tratta di una sintesi termica di uno zucchero (glucosio) in atmosfera riducente (in presenza di azoto).

Per l'ottenimento dei CDs sono stati inizialmente pesati 3g di glucosio ed inseriti in un crogiuolo ceramico refrattario, il tutto è stato poi posto in un reattore in vetro pyrex a 200°C per due ore.

Essendo stato questo primo procedimento per la sintesi dei CDs ( $t=120\text{min}$ ,  $T=200^\circ\text{C}$ ) non andato a buon fine, è stato deciso di variare i parametri di reazione. Quello che è stato fatto, è stato aumentare la temperatura di reazione, portandola ad un valore pari a 350°C, indagando l'effetto del tempo di permanenza nel reattore sulla struttura dei CDs. A tal fine, sono state indagati 4 tipologie di CDs utilizzando i seguenti tempi di permanenza nel reattore.

	<b>CDs<sub>30</sub></b>	<b>CDs<sub>60</sub></b>	<b>CDs<sub>90</sub></b>	<b>CDs<sub>120</sub></b>
<b>t (min)</b>	30	60	90	120
<b>T (°C)</b>	350	350	350	350

### 3.3.2 SINTESI PARTICELLE

Sono state sintetizzate 4 tipologie di particelle a base di bismuto ossido ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ). Sono stati pesati 4g di Bismuto nitrato penta idrato ed aggiunti a 40mL di  $\text{H}_2\text{O}$  ed a 5mL di acido nitrico. Per facilitare la reazione di solubilizzazione il Bismuto nitrato è stato precedentemente pestato e posto in agitazione su una piastra magnetica riscaldata per il tempo necessario. Dopodiché la soluzione è stata fatta intiepidire ed è stata aggiunta a poco a poco della soda caustica ( $\text{NaOH}$ ) in sicurezza, essendo questa reazione fortemente esotermica, rendendo la soluzione altamente basica. Per il monitoraggio della variazione del pH della soluzione è stata utilizzata una cartina tornasole. Come ultimo passaggio è stato inserito un tensioattivo differente per ogni tipologia di particella sintetizzata, in quantità pari al 5% in peso del Bi. Anche questo procedimento è stato condotto a temperatura ambiente. Il tutto è stato adagiato su una piastra magnetica riscaldante per 3h ad una temperatura pari a  $80^\circ\text{C}$ .



Figura 13: Sintesi di particelle di Bismuto ossido

A partire dal medesimo metodo di sintesi, sono dunque state prodotte 4 tipologie di particelle, che differiscono solamente per il tipo di tensioattivo che è stato utilizzato.

	<b>MP<sub>SDS</sub></b>	<b>MP<sub>SAL</sub></b>	<b>MP<sub>PEG</sub></b>	<b>MP<sub>PVP</sub></b>
<b>t (min)</b>	180	180	180	180
<b>T (°C)</b>	80	80	80	80
<b>TENSIOATTIVO</b>	SDS	AL	PEG	PVP

### 3.3.3 PURIFICAZIONE CDs

È stato successivamente effettuato un trattamento di purificazione dei CDs sintetizzati precedentemente tramite un trattamento di dialisi, utilizzando una membrana avente un taglio a 3500 Da. È stato pesato 1g di materiale per ogni CDs, successivamente diluito in 6mL di acqua e mescolato in sonicatore per 5 min. Dopodiché è stata preparata la membrana per dialisi, immersa in acqua per permetterne di ammorbidirsi, legata ad un'estremità con dei fili d'alluminio per chiuderne un'apertura.

Nell'altra estremità, tramite l'ausilio di un imbuto, è stata inserita la diluizione e poi anche questa parte della membrana è stata chiusa con dei fili d'alluminio. Questo procedimento è stato ripetuto per tutti e quattro i CDs precedentemente sintetizzati. Terminato ciò, i campioni sono stati inseriti ognuno in un becher contenente un'ancoretta magnetica e sono stati posti in una piastra agitante per due giorni, cambiando l'acqua una volta al giorno.

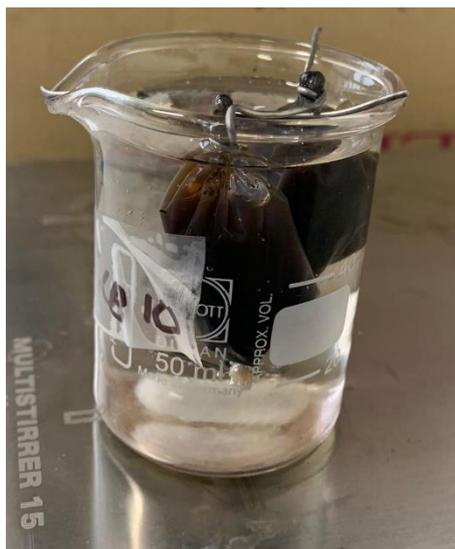


Figura 14: becher contenente CDs da dializzare

### 3.3.4 CONIUGAZIONI

Come ultimo step di sintesi, sono state effettuate delle coniugazioni tra due tipologie dei CDs prodotti (CDs<sub>90</sub>, CDs<sub>120</sub>), con ogni classe di particelle, per un totale di 8 coniugazioni. Per ogni coniugazione effettuata sono stati pesati 50 mg di CDs e 50 mg di particelle; addizionati in 20 mL di H<sub>2</sub>O e sottoposti ad agitazione magnetica per 48h. Infine, le soluzioni sono state recuperate, filtrate e messe a seccare in forno per 24h.

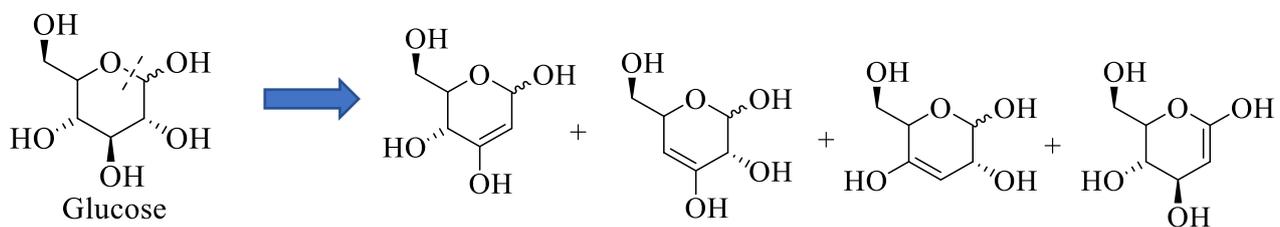


*Figura 155: Esempio di coniugazione tra una tipologia di CDs e particelle di bismuto*

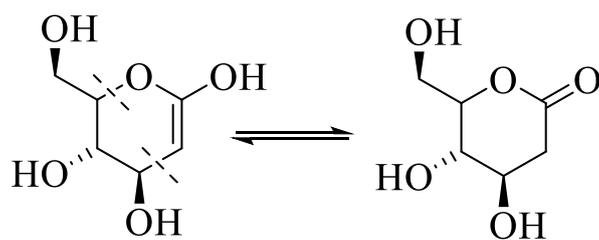
## 4 DISCUSSIONE RISULTATI

### 4.1 CDs

Per l'ottenimento dei CDs è stata effettuata una sintesi termica del glucosio solido. Nel momento in cui il glucosio viene riscaldato esso inizia a perdere gruppi OH sotto forma di molecole di H<sub>2</sub>O. A seconda del gruppo OH perso, si formeranno diverse strutture enoliche.

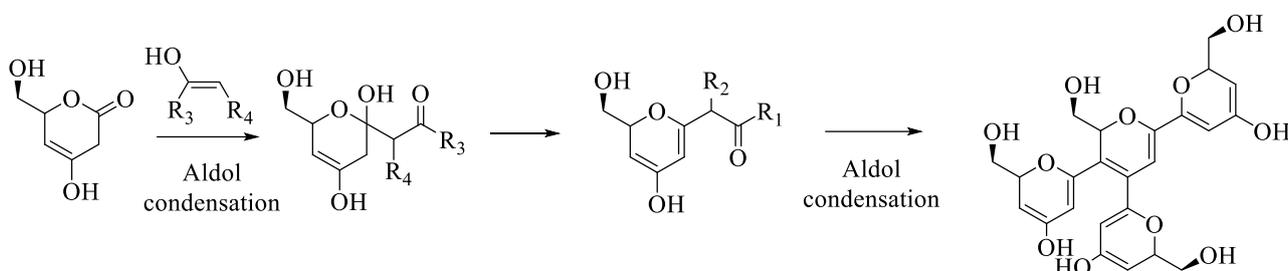


Si nota come, nel caso in cui il gruppo OH uscente sia quello legato all'atomo di carbonio a sua volta legato all'ossigeno, la reazione prevede la formazione di un particolare enolo, contenente un gruppo carbossilico. In questo caso, con il perdurare della reazione, si instaurerà un equilibrio tra le specie enoliche appena formatesi e le loro rispettive forme chetoniche.

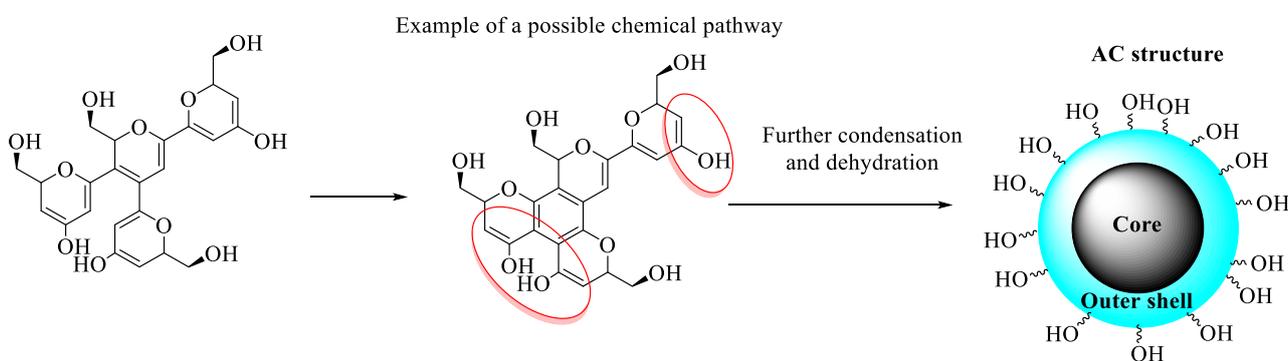


Equilibrio cheto-enolico

Il proseguimento del meccanismo di reazione prevede una serie di processi di condensazione aldolica che via via porteranno alla formazione di strutture sempre più simili a piani grafittici.



Infine, ulteriori reazioni porteranno alla formazione di nanostrutture aventi un core grafittico ed uno shell ricco di varie funzionalità quali gruppi ossidrilici, carbonilici e carbossilici. Questo in quanto, dalle successive analisi IR da me condotte, è stato evidenziato il fatto che non vi siano solamente condensazioni aldoliche, ma c'è anche dell'attività radicalica.



A titolo di esempio viene di seguito mostrato il risultato della sintesi dei CDs, utilizzando un tempo di permanenza nel reattore pari a 60 min (GLB03).



Si è recuperato, dopo il trattamento, un grezzo di reazione solido e compatto dal colore marrone (odore caramellato). Questo è stato poi polverizzato tramite mortaio e pestello. È stato poi prelevato un piccolo campione di questa “polvere”, solubilizzato ed osservato sotto lampada a raggi UV. Si è notata una fotoluminescenza verdastra.

#### 4.1.1 DIALISI

La membrana per dialisi selezionata presentava un taglio a 3500 Da, in modo da far passare tutto ciò che avesse una massa molare inferiore. In questo modo, eventuali oligomeri di unità di glucosio sono stati eliminati, mantenendo all'interno di essa unità strutturali di maggiore dimensione (ovvero proprio i CDs).

Facendo un semplice calcolo matematico, considerando che il peso di un'unità di glucosio è pari a circa 180 g/mol, saranno rigettate tutte quelle aggregazioni che non abbiano raggiunto una massa molare pari ad almeno 20 unità di glucosio.

È stato scelto questo taglio in modo da poter preservare dunque quelle strutture che si pensa abbiano effettuato le reazioni di condensazione aldolica precedentemente menzionate che porteranno alla formazione di una struttura core shell, con all'interno strutture grafite e all'esterno funzionalità quali gruppi ossidrilici, carbonilici e carbossilici.

	<b>MATERIALE RECUPERATO (mg)</b>
<b>CDs<sub>30</sub></b>	280
<b>CDs<sub>60</sub></b>	200
<b>CDs<sub>90</sub></b>	520
<b>CDs<sub>120</sub></b>	675

Nella tabella sovrastante sono riportati i mg di materiale recuperati a seguito del processo di purificazione. Si nota come i CDs<sub>90</sub> e i CDs<sub>120</sub> presentino una maggiore resa, a dimostrazione del fatto che all'aumentare del tempo di permanenza nel reattore vengano favorite le reazioni di condensazione precedentemente menzionate.

## 4.1.2 IR

Il monitoraggio della reazione di formazione dei CDs a partire dal glucosio è stato investigato tramite analisi IR.

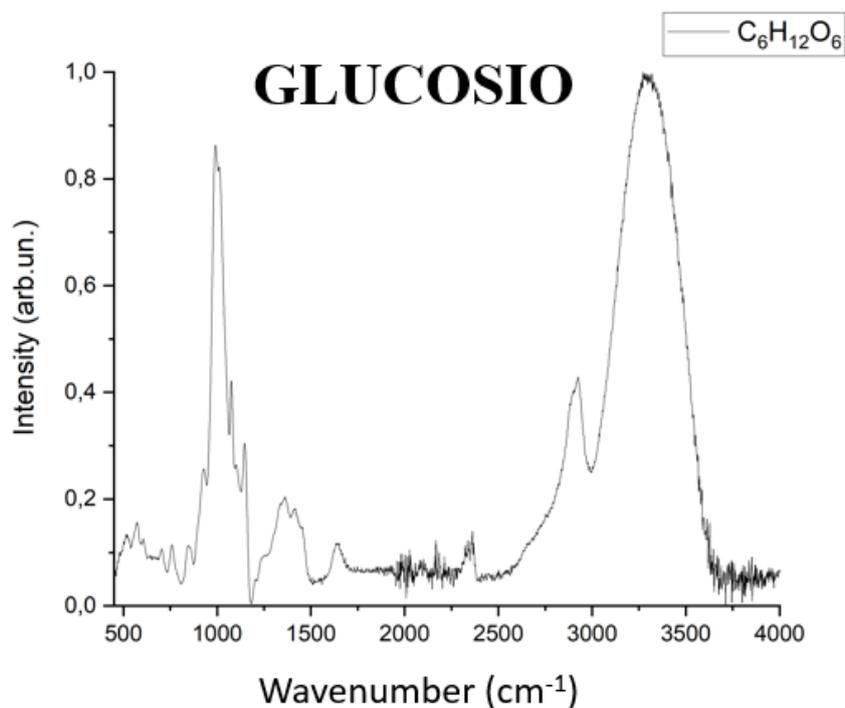


Figura 16: Spettro IR del glucosio

In figura 16 è riportato a titolo di esempio lo spettro IR del glucosio non trattato. Si nota, nella banda compresa tra 2700-3500 cm<sup>-1</sup> la presenza di due picchi: tra 3000-3500 cm<sup>-1</sup> è presente il picco dello  $\nu$ -OH molto pronunciato rispetto all'ampiezza degli altri picchi, nella regione compresa tra 2700-2900 cm<sup>-1</sup> è presente la banda del legame  $\nu$ -CH, poco visibile a causa dell'elevata intensità della banda dello  $\nu$ -OH. Nella banda presente a circa 1000 cm<sup>-1</sup> si nota l'elevata intensità del legame  $\delta$ -C-C e  $\delta$ -C-O, questo è dovuto alla presenza nel glucosio di gruppi eterei (C-O-C). Con l'obiettivo di valutare l'effetto del tempo di reazione sulla struttura del glucosio, il suo spettro è stato confrontato con gli spettri IR delle 4 tipologie dei CDs da me sintetizzati.

Dall'analisi degli spettri rappresentati nelle immagini seguenti possono essere ricavate informazioni strutturali.

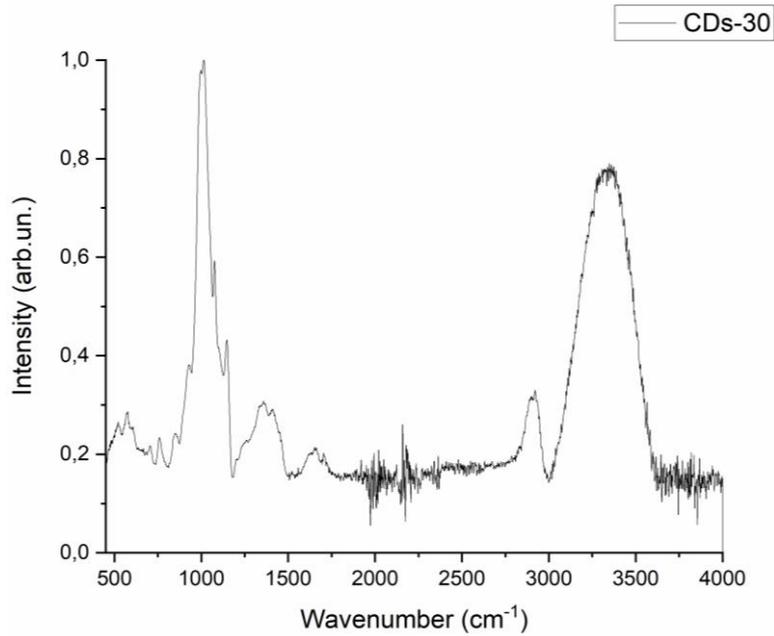


Figura 1/1/: Spettro IR del glucosio trattato termicamente per 30 min

Quello che si è notato è che nel range compreso tra 1500-1800  $\text{cm}^{-1}$ , banda nella quale si ha il  $\nu\text{-C=O}$  e il  $\nu\text{-C=C}$ , il glucosio non trattato non presenta picchi che invece sono sempre più evidenti nelle varie tipologie di CDs sintetizzati. La banda del C=O infatti supporta la formazione di gruppi carbossilici nello shell esterno.

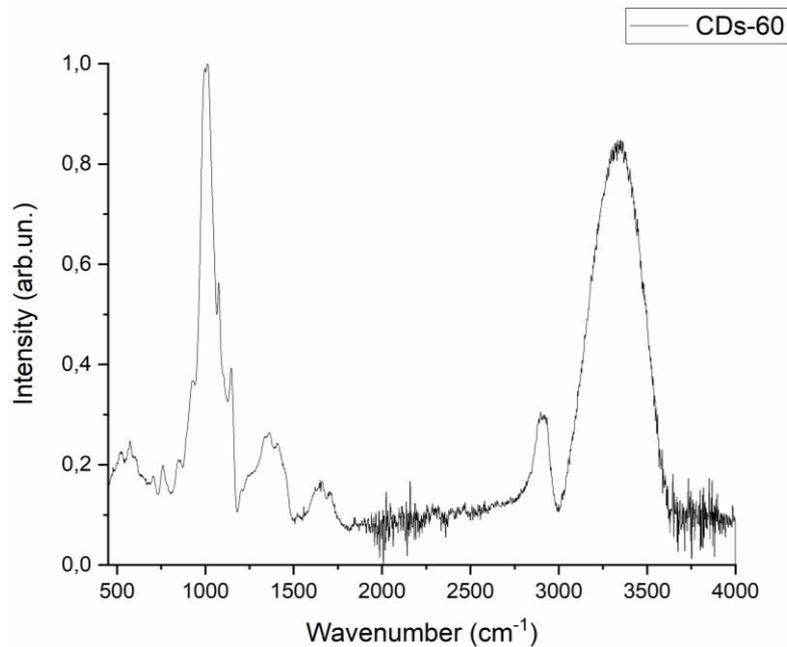


Figura 1818: Spettro IR del glucosio trattato termicamente per 60 min

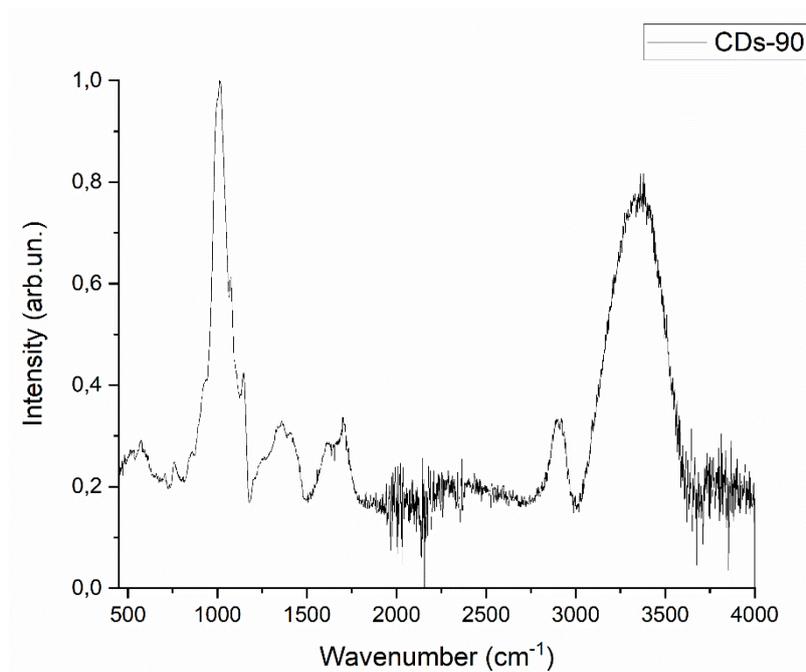


Figura 19: Spettro IR del glucosio trattato termicamente per 90 min

Dall'analisi di questi spettri si evince come, all'aumentare del tempo di permanenza nel reattore, vi sia una progressiva strutturazione verso la formazione di strutture grafittiche. Questi picchi formati provengono dall'aromatizzazione e dunque dalla perdita di molecole d'acqua avvenute durante la reazione di disidratazione del glucosio e dalla formazione di enoli che evolvono in quelle specie esteree.

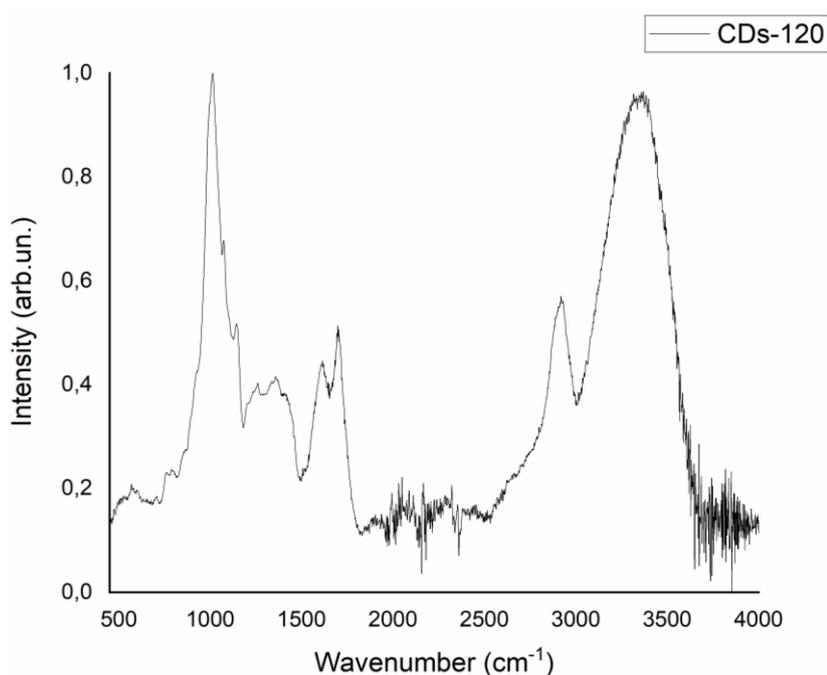


Figura 20: Spettro IR del glucosio trattato termicamente per 120 min

Quello che si è notato complessivamente dall'analisi degli spettri IR dei CDs sintetizzati è un aumento progressivo dell'intensità relativa dei picchi del  $\nu\text{-C=O}$  a discapito di quello dell'OH, all'aumentare del tempo di permanenza nel reattore. Una considerazione analoga può essere effettuata per la banda compresa tra  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , relativa ai picchi del  $\nu\text{-C=C}$ .

Ciò supporta l'ipotesi dell'avvenimento di quel meccanismo di reazione di condensazione illustrato precedentemente, che ha portato via via alla formazione di strutture insature dotate di un core grafitico con funzionalità ossidriliche nello shell esterno.

Un fattore che ha stupito durante l'analisi degli spettri è stato il mantenimento dell'elevata intensità della banda presente a circa  $1000\text{ cm}^{-1}$ , tipica della vibrazione  $\delta\text{-CO}$ . Questo probabilmente è dovuto alla presenza di oligomeri di glucosio non reagiti e che dunque non hanno subito tutte quelle reazioni di condensazione responsabili della formazione di strutture insature.

Proprio per tale motivo è stato deciso di effettuare un trattamento di purificazione mediante dialisi.

Di seguito sono riportate le analisi di spettroscopia IR per le 4 tipologie di CDs sintetizzati e purificati tramite il trattamento di dialisi.

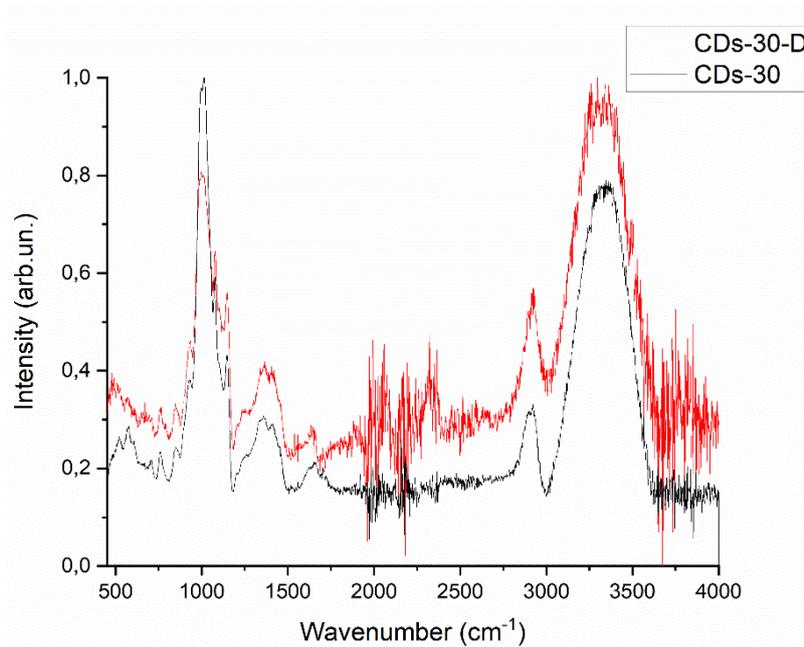


Figura 21: Confronto spettri IR del glucosio trattato termicamente per 30 min prima e dopo il processo di purificazione

Dal confronto degli spettri, si comprende come il trattamento di purificazione abbia permesso di ottenere dei CDs più strutturati, in quanto nella sacca di dialisi si concentra la parte aromatica.

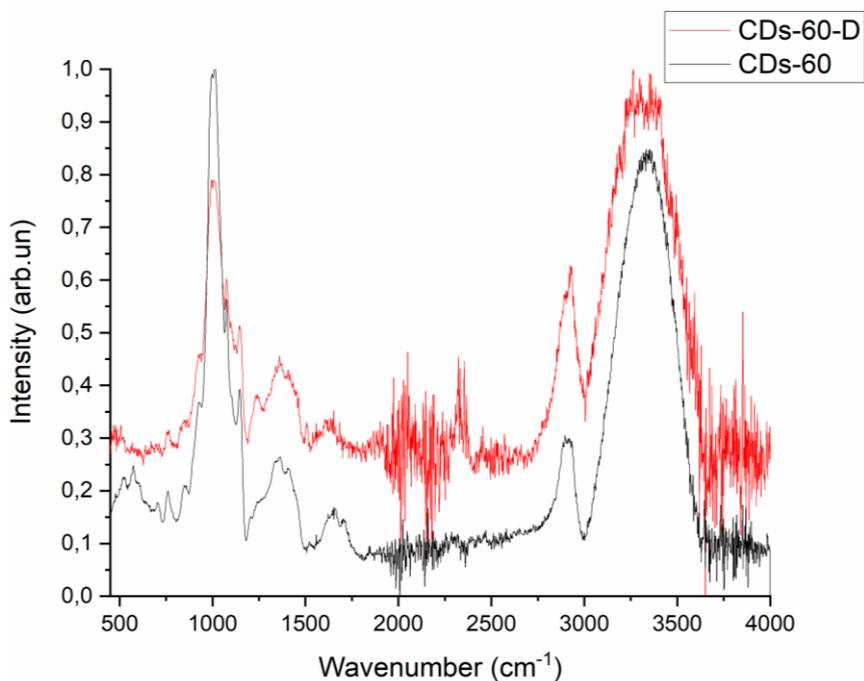


Figura 22: Confronto spettri IR del glucosio trattato termicamente per 60 min prima e dopo il processo di purificazione

Si ricorda a tal punto che il trattamento di dialisi è stato effettuato con il fine di preservare, all'interno della membrana utilizzata, delle strutture più "mature", ovvero in cui tutte quelle reazioni di disidratazione e condensazione mostrate precedentemente sono avvenute, rigettando quelle unità di glucosio, non abbastanza strutturate, che non hanno reagito.

Dato che i valori di tempo e temperatura impostati per la sintesi non sono molto spinti, ci si aspetta che vi possano essere nei CDs prodotti, degli oligomeri di glucosio che non abbiano subito tutti quegli step di reazione di condensazione che avrebbero portato alla formazione di nanostrutture carboniose core-shell.

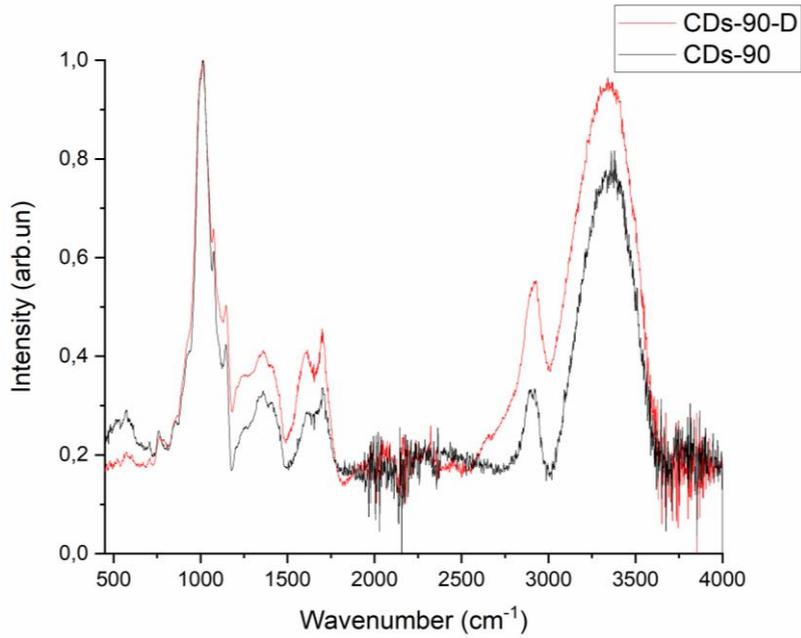


Figura 23: Confronto spettri IR del glucosio trattato termicamente per 90 min prima e dopo il processo di purificazione

Quello che si è notato, per tutte e 4 tipologie di CDs prodotti, è stata una purificazione via via più efficiente all'aumentare del tempo di permanenza nel reattore. Come ci si aspettava, infatti, la resa maggiore è stata ottenuta per i CDs<sub>90</sub> e i CDs<sub>120</sub> in quanto, il maggior tempo di reazione ha permesso la formazione di strutture più grandi.

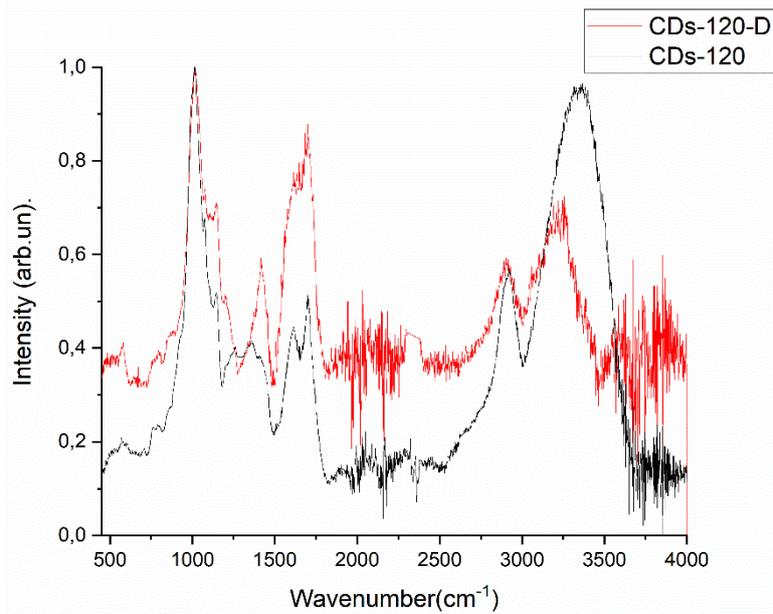


Figura 24: Confronto spettri IR del glucosio trattato termicamente per 120 min prima e dopo il processo di purificazione

Riassumendo, complessivamente si è notato che, con l'aumentare del tempo di reazione, l'intensità della banda tra  $1650-1800\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{-C=O}$ ) aumentava, fino a raggiungere la stessa intensità della banda degli OH ( $3500\text{ cm}^{-1}$ ). Un andamento analogo è stato seguito per la banda compresa tra  $1500-1650\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{-C=C}$ ).

Il trattamento di purificazione, ottenuto tramite dialisi, ha permesso la preservazione di strutture più pure, rimuovendo quelle unità di glucosio che durante il processo di sintesi non avevano raggiunto una massa molare pari ad almeno  $3500\text{ Da}$ . Nella figura 24, concentrandosi sulle intensità relative dei picchi, si nota come il processo dialitico abbia avuto una notevole efficacia, in quanto il picco nella banda tra i  $1500-1800\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{-C=O}$ ) eguaglia l'intensità di quello della banda dello  $\nu\text{-OH}$ . Questo inoltre è una dimostrazione dell'avvenimento del meccanismo di reazione mostrato precedentemente che prevedeva una serie di condensazioni aldoliche che portano alla formazione di strutture insature.

Si è notata infine, una diminuzione dell'intensità del picco del legame  $\delta\text{-CO}$ , presente a circa  $1000\text{ cm}^{-1}$  a discapito di un aumento dei picchi relativi alla banda dei doppi legami  $\text{C=C}$  e  $\text{C=O}$  presente tra i  $1500-1800\text{ cm}^{-1}$ . Questa è stata l'evidenza che ha dimostrato l'efficacia del processo di purificazione effettuato mediante dialisi.

### 4.1.3 RAMAN

Di seguito sono riportate le analisi Raman dei composti carboniosi sintetizzati. Tutti gli spettri riportati sono stati normalizzati rispetto al valore massimo. In tutte le analisi effettuate sui CDs sintetizzati si è notata una grande difficoltà nell'interpretazione degli spettri.

La presenza, sulla superficie dei CDs, di varie funzionalità quali gruppi carbossilici, carbonilici e ossidrilici, ha reso difficoltosa l'analisi in quanto questi gruppi hanno mostrato una fluorescenza tale da oscurare le bande normalmente visibili al Raman.

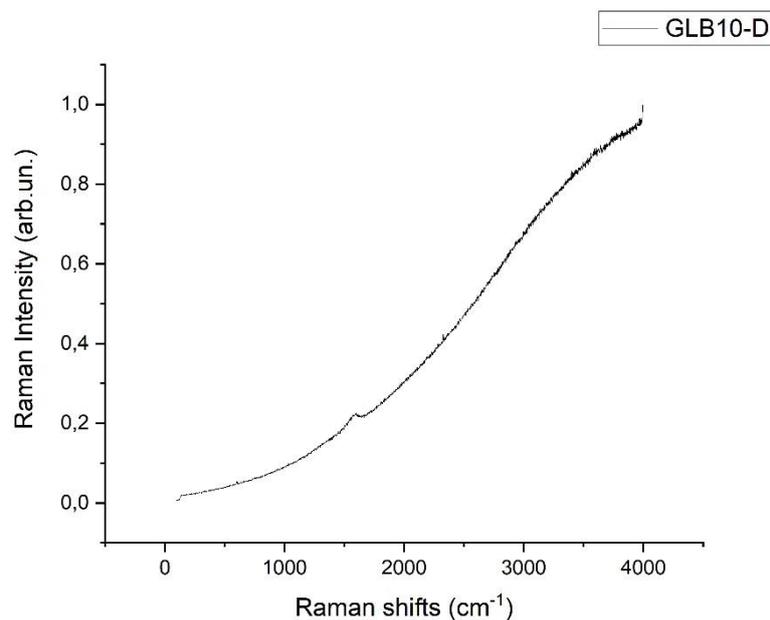


Figura25: Analisi Raman dei CDs<sub>120</sub>

A titolo d'esempio è stata riportata l'analisi Raman effettuata sui CDs<sub>120</sub> e, come si può notare dalla figura 25, non è stato possibile ricavare informazioni riguardanti la struttura dei composti a livello del core.

#### 4.1.4 FLUORIMETRO

Di seguito sono riportate le analisi effettuate al fluorimetro per ogni tipologia di CDs sintetizzata. Si è partiti da una lunghezza d'onda d'eccitazione pari a 275nm e si è arrivati fino ad un valore pari a 525 nm a passi di 25 nm. Tutti gli spettri sono stati normalizzati rispetto al valore massimo.

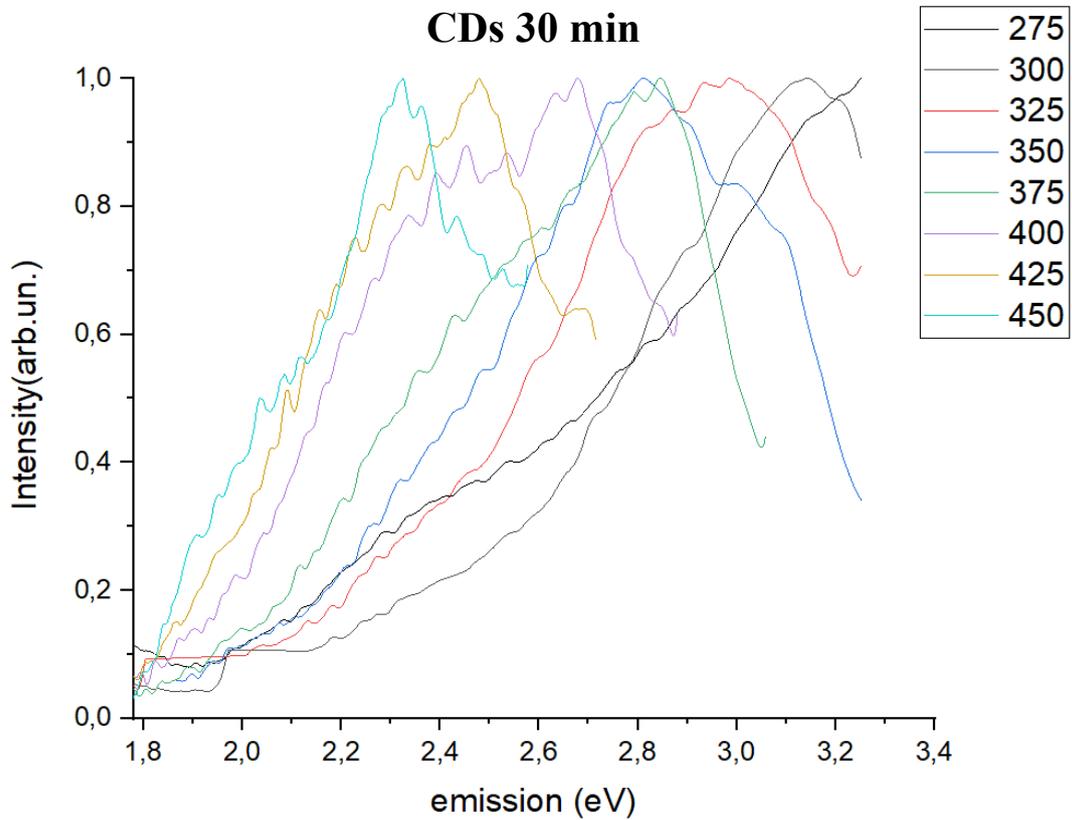


Figura 26: Analisi al fluorimetro dei  $CDs_{30}$

Si è notato come, per lunghezze d'onda di eccitazione comprese tra 475-525 nm, i CDs non fossero responsivi per tale motivo non sono stati riportati gli spettri per tali lunghezze d'onda.

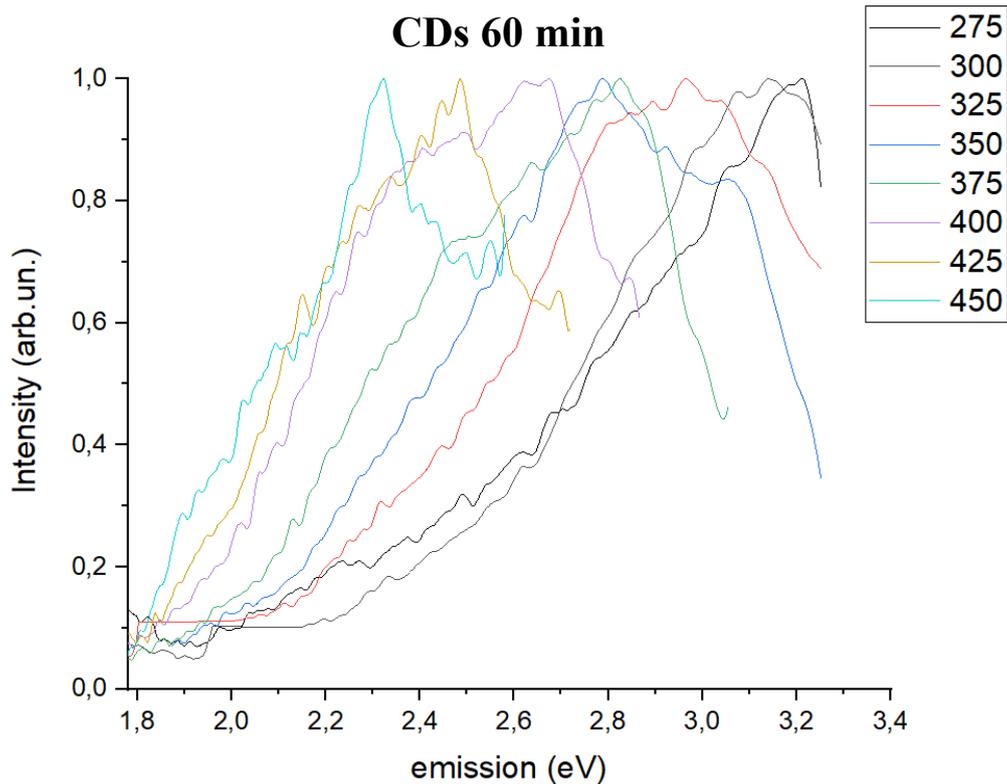


Figura 27: Analisi al fluorimetro dei  $CDs_{60}$

Come si può notare dai grafici sopra e sotto riportati, i CDs sintetizzati hanno mostrato delle proprietà di fluorescenza, con uno spettro di emissione dipendente dall'eccitazione.

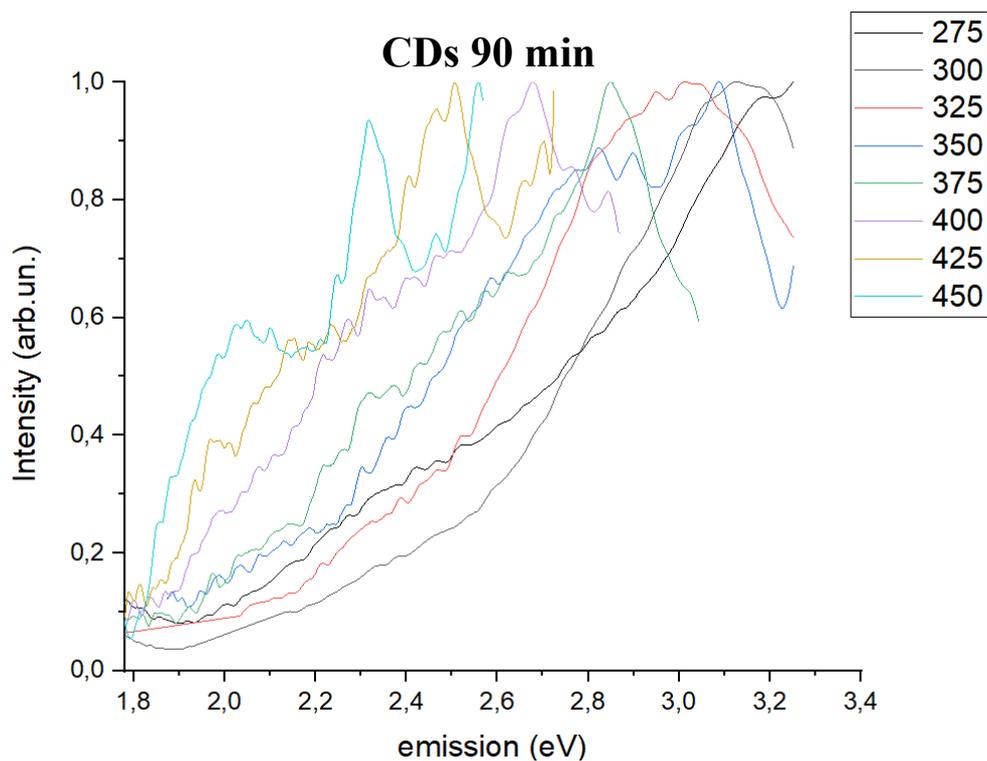


Figura 28: Analisi al fluorimetro dei  $CDs_{90}$

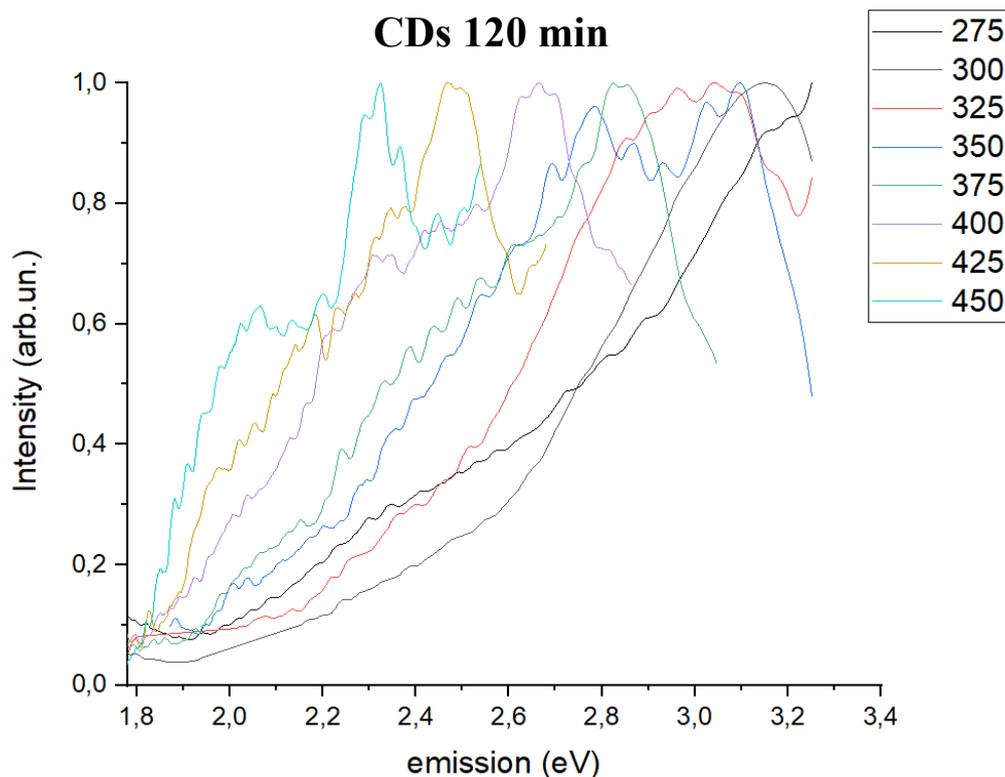


Figura 29: Analisi al fluorimetro dei  $CDs_{120}$

Un'altra caratteristica evidenziata dall'analisi di questi spettri è il fatto che i picchi di emissione, per ogni tipologia di CDs preparata, siano molto ampi; si è notato infatti che i CDs sintetizzati emettessero in un range che va da circa 300 nm a 475 nm. Questo trova riscontro con risultati ottenuti in letteratura [58]. I grandi picchi d'emissione si pensa siano dovuti ad un maggior numero di livelli energetici vibrazionali rispetto a quelli trovati in altre specie fluorescenti. Si è notato inoltre come, per eccitazioni a basse lunghezze d'onda (275-300 nm), a causa dell'effetto non radiativo i CDs emettessero nel rosso. Questo può essere dovuto al fatto che per la sintesi dei CDs è stata utilizzata una temperatura elevata la quale ha causato la formazione di composti aromatici impilati.

Per osservare nel complesso le proprietà di fotoluminescenza dei CDs, si è pensato di graficare l'emissione in funzione dell'energia di eccitazione in eV.

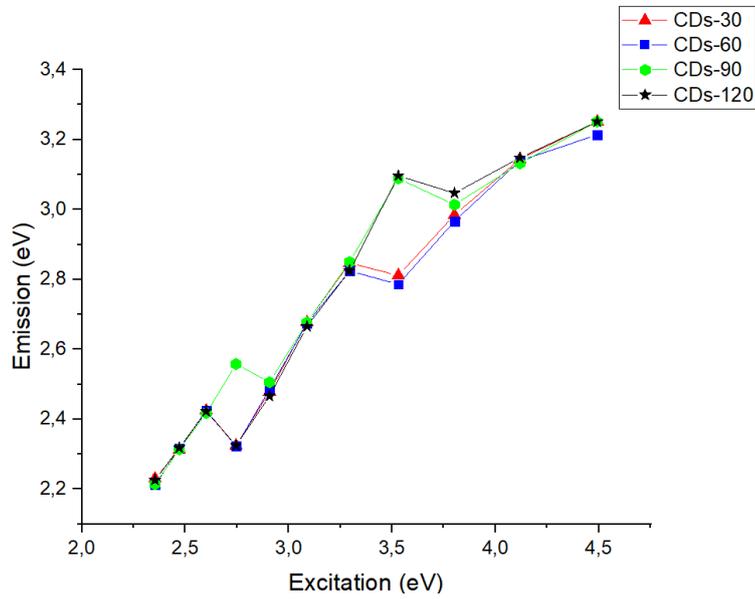


Figura 30: andamento dei picchi d'emissione dei CDs sintetizzati in funzione dell'eccitazione

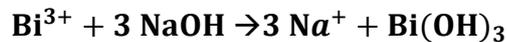
Si è notata una grande sovrapposibilità tra i dati in quanto tutte le emissioni presentano bene o male lo stesso andamento. I CDs<sub>90</sub> hanno mostrato maggiore emissione rispetto agli altri sintetizzati per una lunghezza d'onda d'eccitazione pari a 450 nm.

## 4.2 PARTICELLE

Per la sintesi delle particelle a base di Bismuto ossido, è stato eseguito un processo a 3 step:



- 1) La prima reazione consiste nella solubilizzazione in ambiente acido del Bismuto nitrato. Questo primo step può essere svolto sia a freddo che in temperatura per accelerare la solubilizzazione del sale, normalmente poco solubile.



- 2) La seconda reazione viene svolta a freddo, aspettando che la soluzione precedente si intiepidisca, in quanto fortemente esotermica. Nel momento in cui si cessa l'agitazione, quello che si è notato era la tendenza della soluzione a formare immediatamente un precipitato. Il precipitato formatosi è l'idrossido di Bismuto. In questo caso è stata aggiunta una quantità di soda caustica non precisa ma sufficiente a rendere l'ambiente basico.



- 3) La terza reazione consiste in un trattamento in piastra riscaldante a 80°C per 3h e permette di ottenere un precipitato che è il bismuto ossido. Infine, è stata rimossa la fase acquosa tramite filtrazione ed è stata recuperata la fase solida di Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Sono stati utilizzati 4 tensioattivi differenti:

- **Sodio dodecil solfato (SDS)**: tensioattivo anionico; svolge correttamente la sua funzione in quanto si scioglie bene e forma delle micelle in soluzione.
- **Acido laurico (AL)**: tensioattivo anionico; non riesce a svolgere bene la sua funzione in quanto si ipotizza che la sua scarsa solubilità nella soluzione basica, non permetta la sua efficiente strutturazione in micelle che portano così ad una successiva stabilizzazione delle particelle di Bismuto.
- **Polietilenglicole (PEG)**: tensioattivo non ionico; svolge correttamente la sua funzione in quanto si scioglie bene e forma delle micelle in soluzione.
- **Polivinilpirrolidone (PVP)**: tensioattivo non ionico; presenta una scarsa solubilità in ambiente acquoso che non permette di svolgere correttamente la sua funzione.

La differenza tra queste tipologie di particelle riguarda unicamente il tensioattivo utilizzato. Sono stati utilizzati due tipi di tensioattivi: ionici (SDS, acido laurico) e non ionici (PEG, PVP).

Il ruolo dei tensioattivi è quello di formare delle micelle attorno alle particelle, con l'obiettivo di aumentare l'energia necessaria per far avvenire l'interazione tra le particelle, impedendone dunque l'aggregazione e garantendo un'elevata stabilità dimensionale [59].

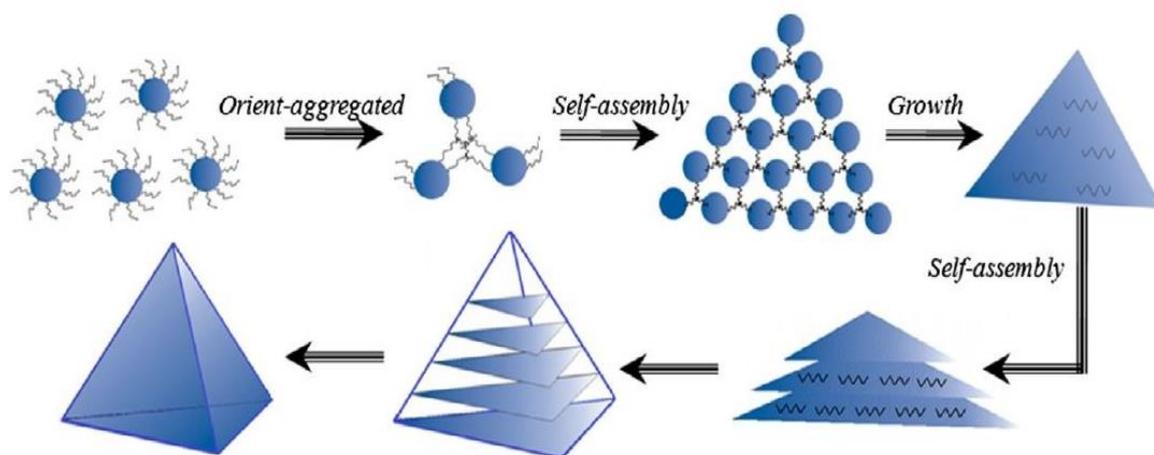


Figura 31: Schema esemplificativo del meccanismo di accrescimento particellare, fonte [59]

La differenza tra ionico e non ionico è da ricercarsi nel modo in cui impediscono l'aggregazione particellare. I tensioattivi ionici formano micelle attorno le particelle esponendo le teste polari nella fase acquosa; in più sfruttano meccanismi di repulsione elettrostatica. I tensioattivi non ionici, invece, svolgono la loro funzione solo per ingombro sterico. I vari tensioattivi sono stati inseriti tra lo step 2 e 3 perché, se fossero stati aggiunti nello step 3, si sarebbero già formate particelle più aggregate.

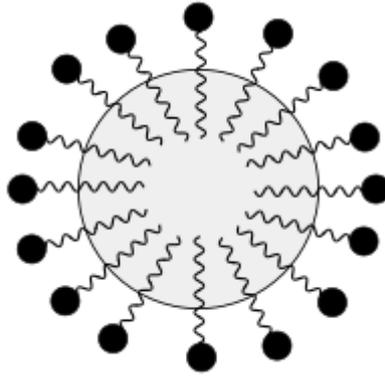


Figura 32: Schema raffigurante la formazione di micelle

#### 4.2.1 ANALISI FESEM

Di seguito sono riportate le analisi effettuate al FESEM sia per i CDs che per le particelle sintetizzate.

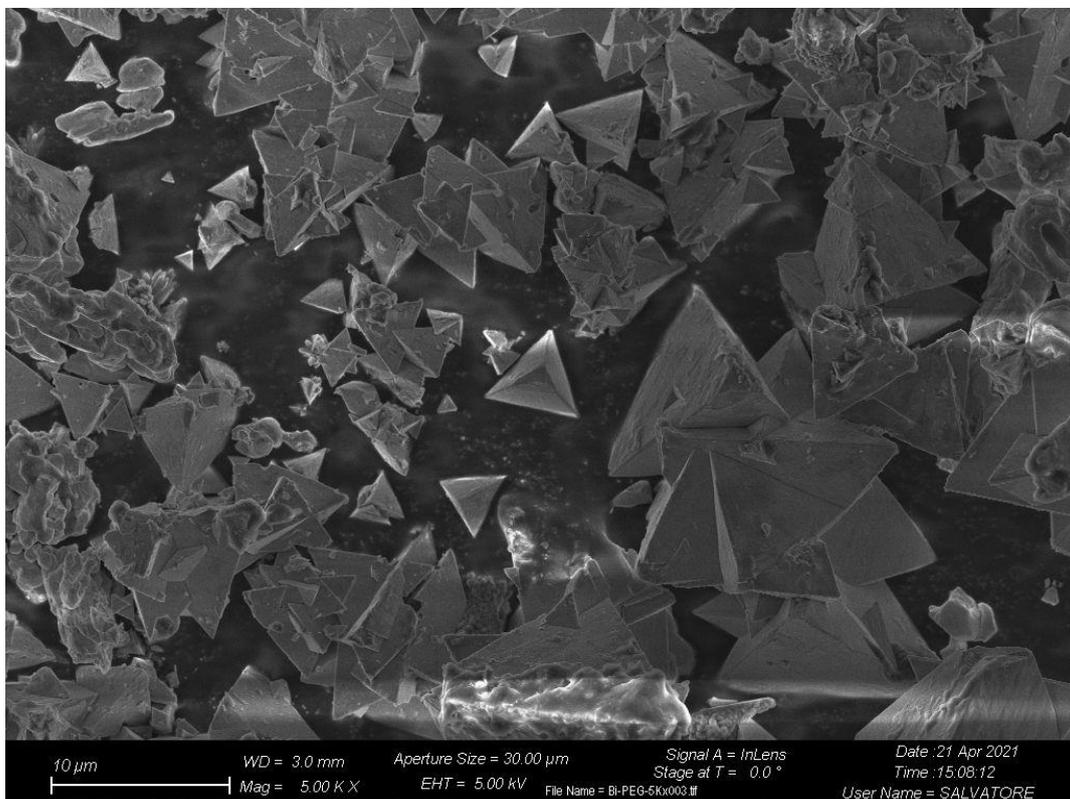


Figura 33: Analisi FESEM di particelle di Bismuto ossido utilizzando il PEG come tensioattivo

Come si può notare dall'immagine soprariportata, le particelle di Bismuto ossido prodotte utilizzando il PEG come tensioattivo mostrano una morfologia di tipo tetraedrico ed una disposizione spaziale abbastanza regolare. Questo a dimostrazione dell'efficacia del trattamento delle particelle con un tensioattivo.

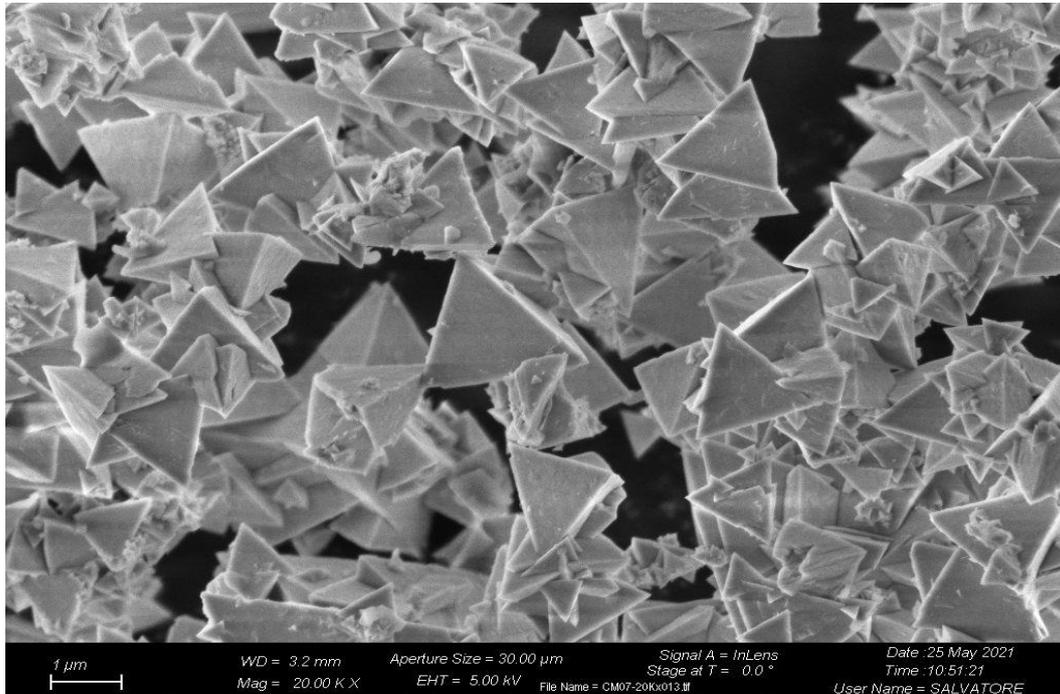


Figura 34: Analisi FESEM di particelle di Bismuto ossido utilizzando il SDS come tensioattivo

Un risultato simile è stato ottenuto analizzando le particelle di Bismuto ossido prodotte utilizzando il SDS come tensioattivo. Anche in questo caso si è osservata una morfologia tetraedrica delle particelle ed una grande regolarità spaziale. Un aspetto importante da analizzare è il fatto che, se si volesse migliorare l'omogeneizzazione dimensionale delle particelle, si potrebbe aumentare la percentuale in peso del tensioattivo oppure aumentare la temperatura di reazione.

I buoni risultati riscossi da queste due analisi sono dovuti al fatto che il SDS (anionico) è molto solubile bene e forma in soluzione delle micelle che si dispongono attorno alle MPs impedendone l'aggregazione grazie ad interazioni elettrostatiche e al contempo promuovendone la crescita regolare. Il PEG, pur essendo un tensioattivo non ionico, è molto solubile ed in soluzione riesce a formare delle micelle e ad impedire l'aggregazione particellare sfruttando l'ingombro sterico.

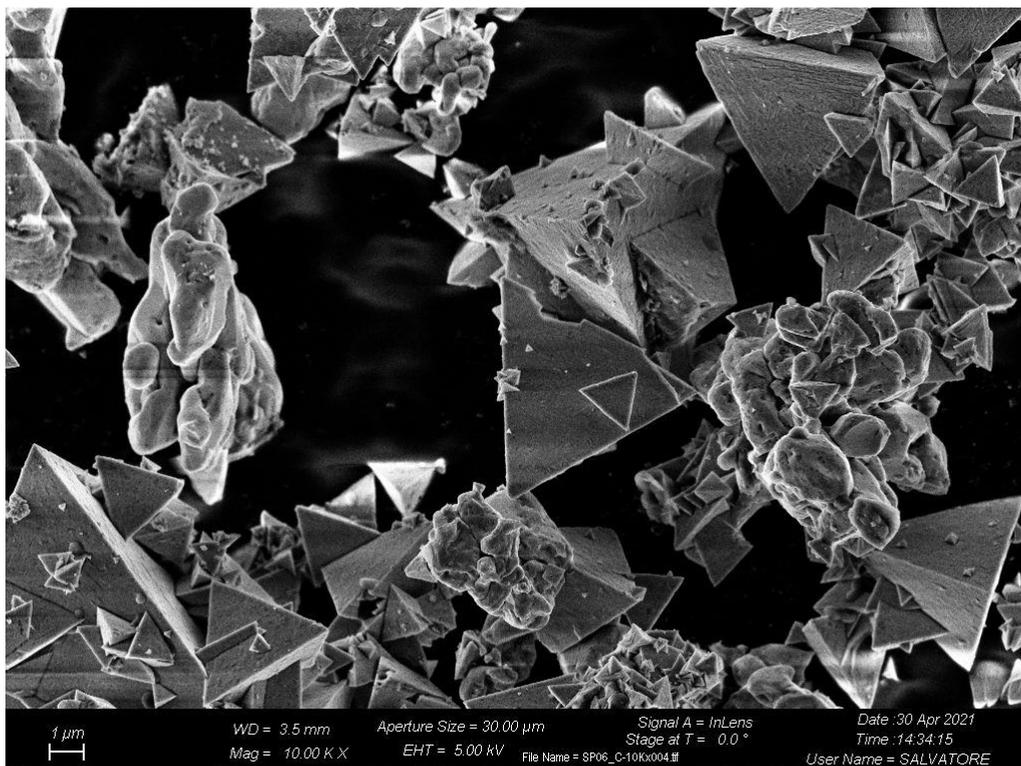


Figura 35: Analisi FESEM di particelle di Bismuto ossido utilizzando il PVP come tensioattivo

Risultati meno soddisfacenti sono stati ottenuti per le particelle di Bismuto ossido utilizzando il PVP e l'acido laurico come tensioattivi.

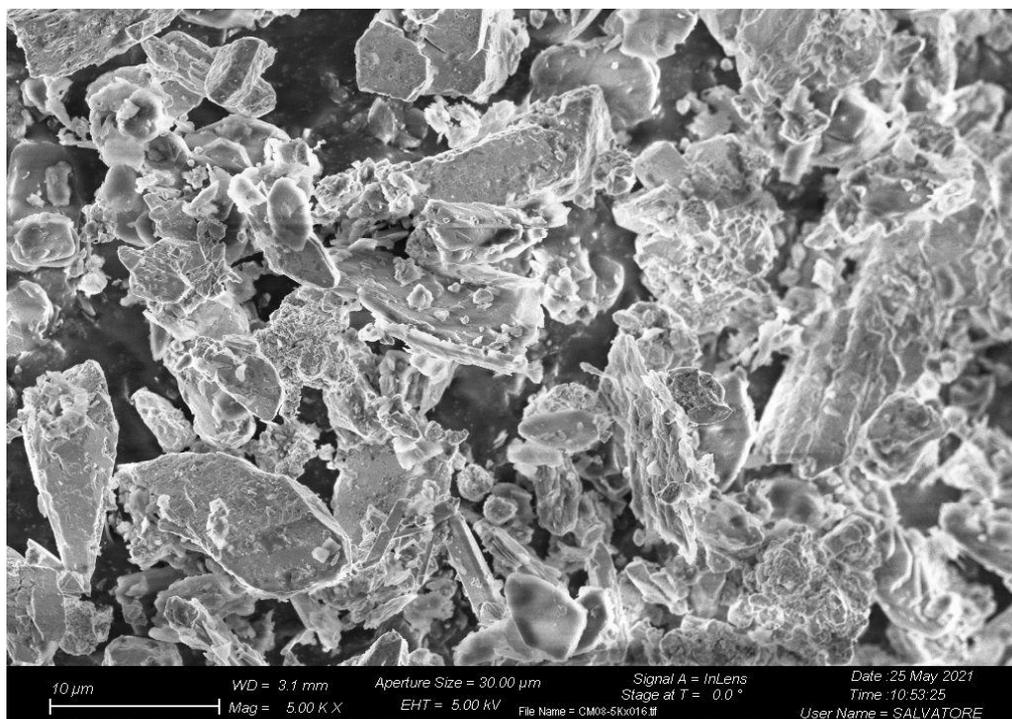


Figura 36: Analisi FESEM di particelle di Bismuto ossido utilizzando l'acido laurico come tensioattivo

Quello che è evidente dalle ultime due immagini (fig.35 e fig.36) è che le particelle non abbiano una morfologia regolare, soprattutto in quelle prodotte utilizzando l'acido laurico come tensioattivo. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che l'acido laurico non è solubile in ambiente basico e dunque non porti a quella formazione micellare che permette a sua volta di ottenere la regolarità strutturale.

Le particelle sintetizzate, come evidenziato dalle analisi al FESEM effettuate, sono tutte in scala micrometrica. Questa scala dimensionale permette vantaggi a livello applicativo in quanto, al momento di un'eventuale iniezione in un organismo, le particelle non riuscirebbero a penetrare all'interno delle cellule o ad attraversare la barriera ematoencefalica (BBB) e dunque il rilascio di ROS rimarrebbe localizzato nei siti di interesse.

## 4.2.2 IR

Di seguito sono riportate le analisi di spettroscopia IR per le particelle di Bismuto prodotte e delle coniugazioni effettuate.

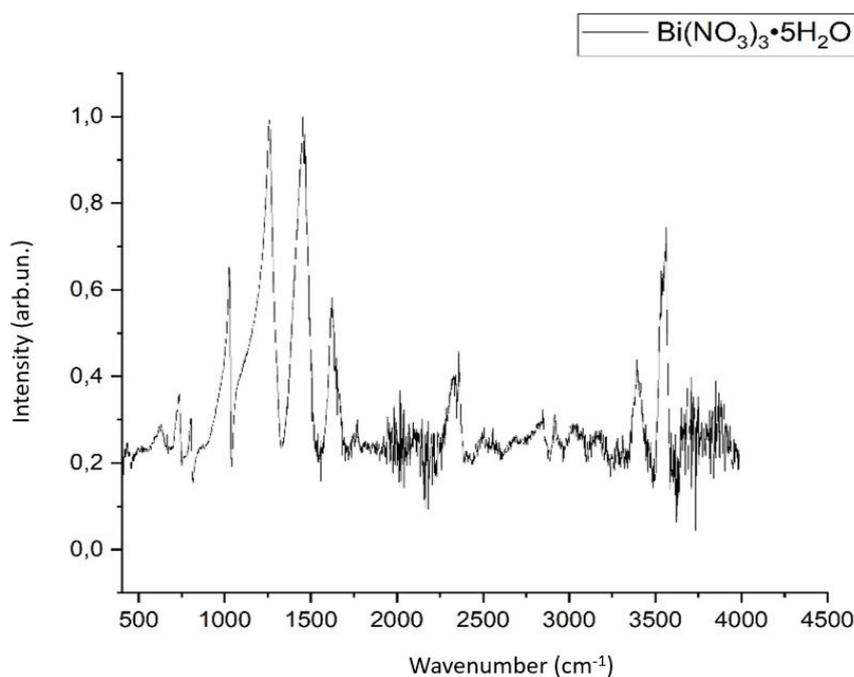


Figura 37: Analisi IR del Bismuto Nitrate pentaidrato  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Nella figura sopra riportata si può osservare lo spettro IR del precursore utilizzato per la sintesi delle particelle. Si notano i picchi dello stretching N-O nella banda a  $1500 \text{ cm}^{-1}$  e quelli dello  $\nu\text{-OH}$  a  $3500 \text{ cm}^{-1}$ , essendo il Bismuto nitrate penta-idrato.

In figura 38 è riportato lo spettro IR del Bismuto ossido, risultato della sintesi delle particelle prodotte.

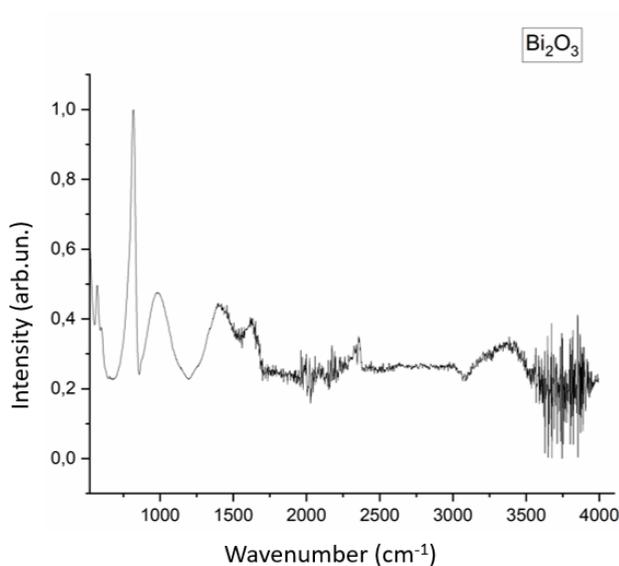


Figura 38: Analisi IR del Bismuto ossido Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Comparandolo con lo spettro del precursore utilizzato si nota come la banda compresa tra 3000-3500 cm<sup>-1</sup>, relativa al picco dello ν-OH non sia del tutto scomparsa in quanto probabilmente, a seguito del trattamento di essiccazione, sia rimasta dell'acqua residua. Si nota inoltre la comparsa di picchi nelle bande tra 500-800 cm<sup>-1</sup> che potrebbero essere dovuti alla presenza di [BiO<sub>3</sub>]<sup>3-</sup> e dunque alla presenza del legame ν-Bi-O; il tutto è concorde con i risultati ottenuti da Mallahi et al [60].

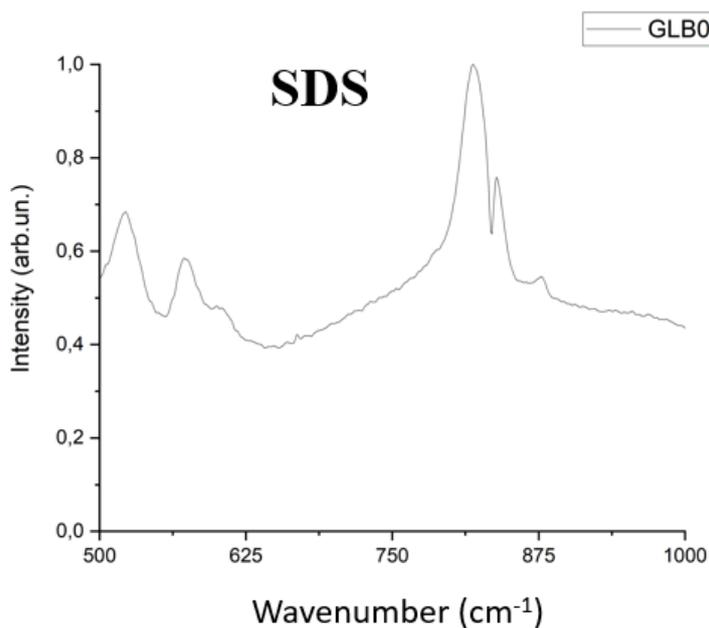


Figura 39: Analisi IR delle particelle di Bismuto ossido prodotte utilizzando SDS come tensioattivo

A titolo di esempio è riportato lo spettro IR delle particelle di Bismuto Ossido prodotte utilizzando SDS come tensioattivo. È stato deciso di analizzare tramite spettroscopia IR questa tipologia di particelle in quanto i risultati dell'analisi al FESEM hanno mostrato una morfologia ed organizzazione strutturale più regolare. Si nota come lo spettro non sia molto ricco di picchi in quanto le particelle di Bismuto hanno normalmente poco assorbimento all'IR, ma nella banda tra 500-550  $\text{cm}^{-1}$  si è notato il mantenimento dell'impronta digitale tipica del Bismuto. Risultati analoghi sono stati ottenuti con le particelle di Bismuto Ossido prodotte utilizzando il PEG come tensioattivo.

### 4.2.3 RAMAN

Di più facile interpretazione si sono rivelate le analisi Raman relative alle particelle a base di Bismuto. Anche in questo caso, tutti gli spettri riportati sono stati normalizzati rispetto al valore massimo.

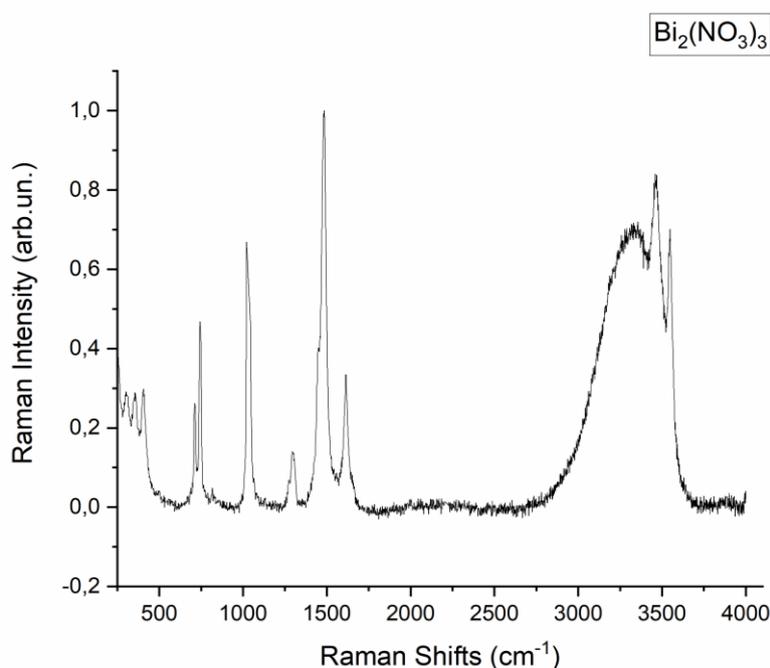


Figura 40: Analisi Raman  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$

Dallo spettro soprariportato si notano dei picchi caratteristici del  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ . Si osserva a 300  $\text{cm}^{-1}$  l'impronta digitale tipica del bismuto; nella banda compresa tra i 1000-1500  $\text{cm}^{-1}$  si notano i picchi relativi al gruppo  $\text{NiO}_3$  (rispettivamente stretching simmetrico e asimmetrico).

Essendo il precursore utilizzato Bismuto nitrato penta-idrato, è stato evidenziato un ampio picco nella regione compresa tra 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$ , indice della presenza di legami  $\nu\text{-OH}$ .

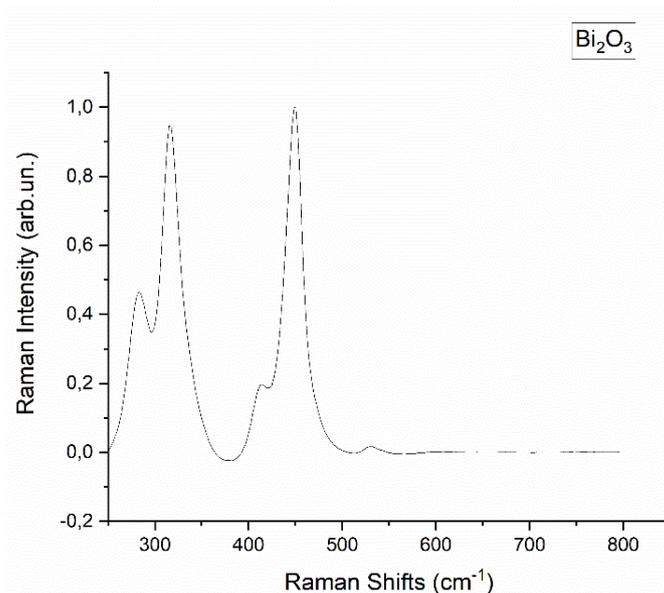


Figura 41: Analisi Raman del  $\text{Bi}_2\text{O}_3$

Nella figura 41, è possibile osservare lo spettro Raman relativo al  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , componente principale delle particelle sintetizzate. È stato osservato il mantenimento del picco a 300  $\text{cm}^{-1}$ , relativo all'impronta digitale del Bismuto ( $\nu\text{-Bi-O}$ ). Altro fattore rilevante è stato la scomparsa del picco presente nella banda tra 1000-1500  $\text{cm}^{-1}$ , relativo al gruppo  $\text{NiO}_3$ ; questo a supporto dell'avvenuta reazione di sintesi delle particelle.

Lo spettro del  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  infatti non presenta componenti oltre i 700-800  $\text{cm}^{-1}$ , in quanto le bande successive sono relative a gruppi che non sono più presenti nel Bismuto ossido sintetizzato, presente in fase  $\gamma$ . Osservando la banda che va da 280-320  $\text{cm}^{-1}$  e quella che va da 450-530  $\text{cm}^{-1}$ , vi sono picchi tipici del Bismuto in fase  $\gamma$  [61].

In figura 42 sono riportati gli spettri Raman delle particelle a base di Bismuto sintetizzate. Quello che appare evidente è il mantenimento del picco presente a  $300\text{ cm}^{-1}$ , relativo all'impronta digitale del Bismuto. Altro fattore rilevante è il fatto che gli spettri relativi a queste quattro tipologie di particelle siano sostanzialmente identici, a dimostrazione del fatto che l'inserimento di un altro componente, durante il processo di sintesi, non abbia intaccato il meccanismo di reazione. Un'unica differenza appare nella banda compresa tra i  $500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  in quanto nelle particelle prodotte utilizzando il PVP come tensioattivo è presente un picco che non trova riscontro negli altri grafici.

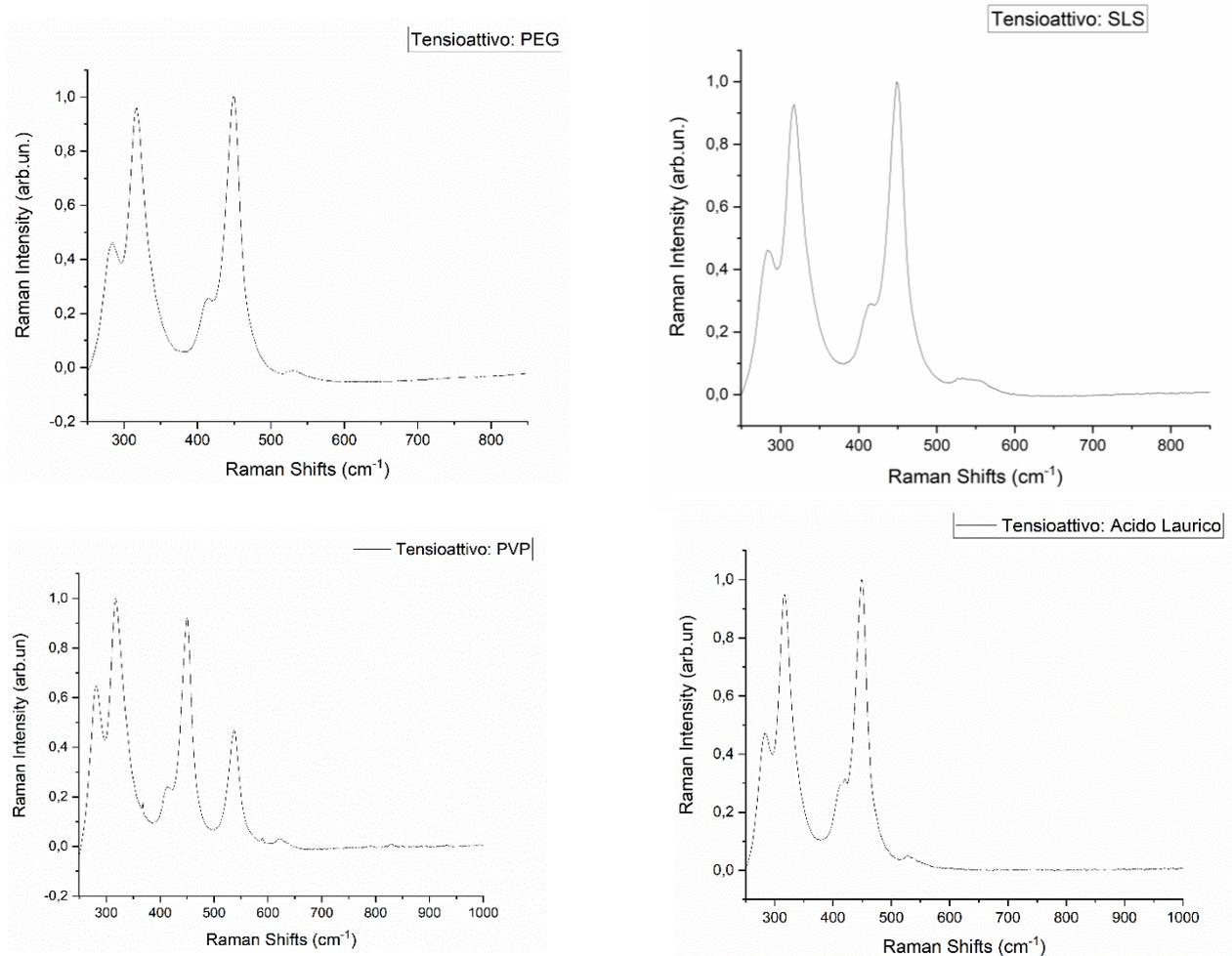


Figura 42: Analisi Raman delle particelle a base di Bismuto prodotte

Si può ipotizzare, facendo riferimento alle analisi effettuate al FESEM mostrate precedentemente, che in questo caso le particelle a base di Bismuto Ossido sintetizzate, potrebbero essere in una fase differente da quelle delle altre particelle prodotte utilizzando gli altri tensioattivi.

Sarebbero pertanto necessarie ulteriori analisi, ad esempio tramite XRD, per confermare questa ipotesi. Complessivamente tuttavia, le particelle sintetizzate presentano uno spettro analogo a quello del Bismuto ossido, a dimostrazione del fatto che i tensioattivi utilizzati non abbiano causato variazioni strutturali.

## 4.3 CONIUGAZIONI

I CDs sintetizzati sono stati coniugati con le particelle prodotte con lo scopo di sviluppare nuove piattaforme teragnostiche. Ciò che permette ai CDs di legarsi alle particelle a base di Bismuto è la presenza di interazioni a idrogeno tra i gruppi ossidrilici dei CDs con dei possibili gruppi OH presenti nelle particelle di Bismuto a causa di difetti superficiali. Altre interazioni possibili sono quelle di Van der Waals o dipolo-dipolo.

### 4.3.1 FESEM

Vengono riportate in seguito le analisi FESEM effettuate per due coniugazioni; queste sono state ottenute combinando le particelle a base di Bismuto ossido prodotte utilizzando SDS come tensioattivo con CDs<sub>90</sub> e con CDs<sub>120</sub>.

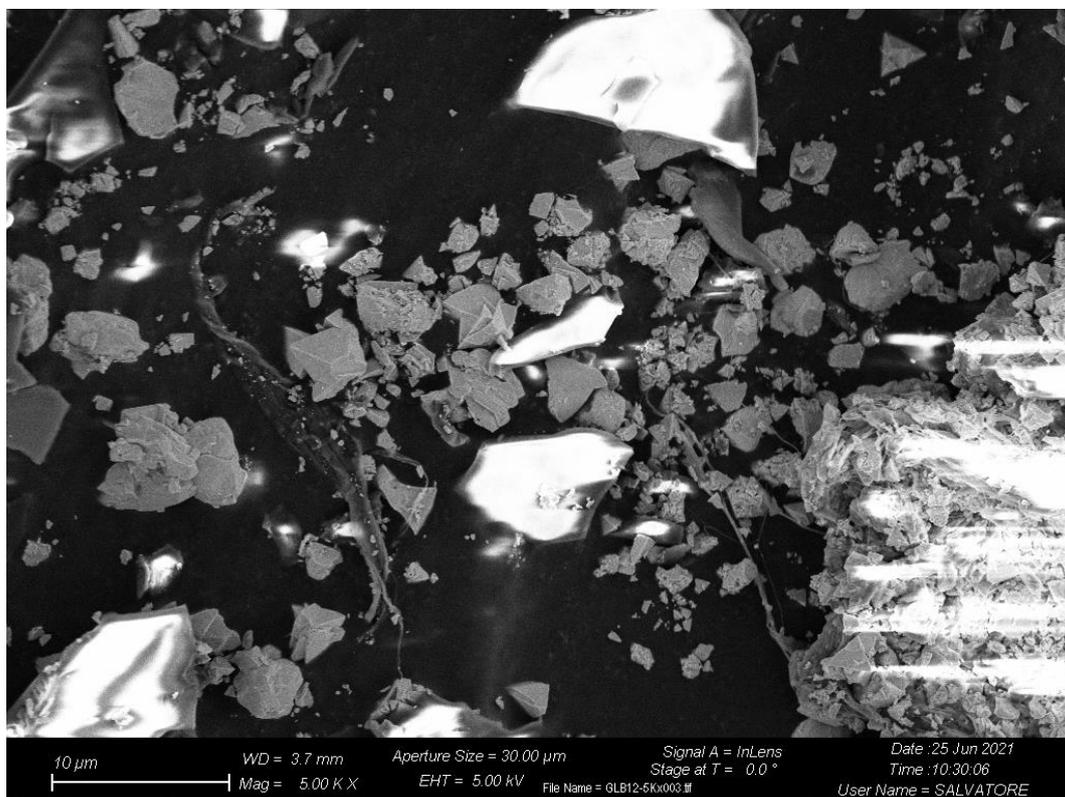


Figura 43: Analisi FESEM della coniugazione effettuata tra le particelle a base di Bismuto ossido utilizzando SDS come tensioattivo e i CDs<sub>90</sub>

Dall'analisi al FESEM sopra riportata si può notare come la coniugazione abbia avuto successo in quanto si osserva come i CDs, più ricchi nella parte ad alto contrasto nell'immagine, abbiano ricoperto le particelle a base di Bismuto ossido.

Quello che si osserva in entrambe le immagini è il fatto che il processo di coniugazione abbia causato uno sfaldamento dei piani delle particelle. Questo potrebbe essere dovuto alla formazione di composti di intercalazione che hanno portato all'esfoliazione delle particelle che sono effettivamente non singoli cristalli tetraedrici ma cristalli tetraedrici formati da lamelle sovrapposte.

Anche per la coniugazione effettuata utilizzando i CDs<sub>120</sub>, sono stati ottenuti buoni risultati, come si nota dalla figura 44. Un fattore da considerare è il fatto che la coniugazione non è stata effettuata in condizioni spinte dunque, se si volesse migliorare il risultato di questa reazione, si potrebbe effettuare una sonicazione per avere una più intima miscelazione dei reagenti.

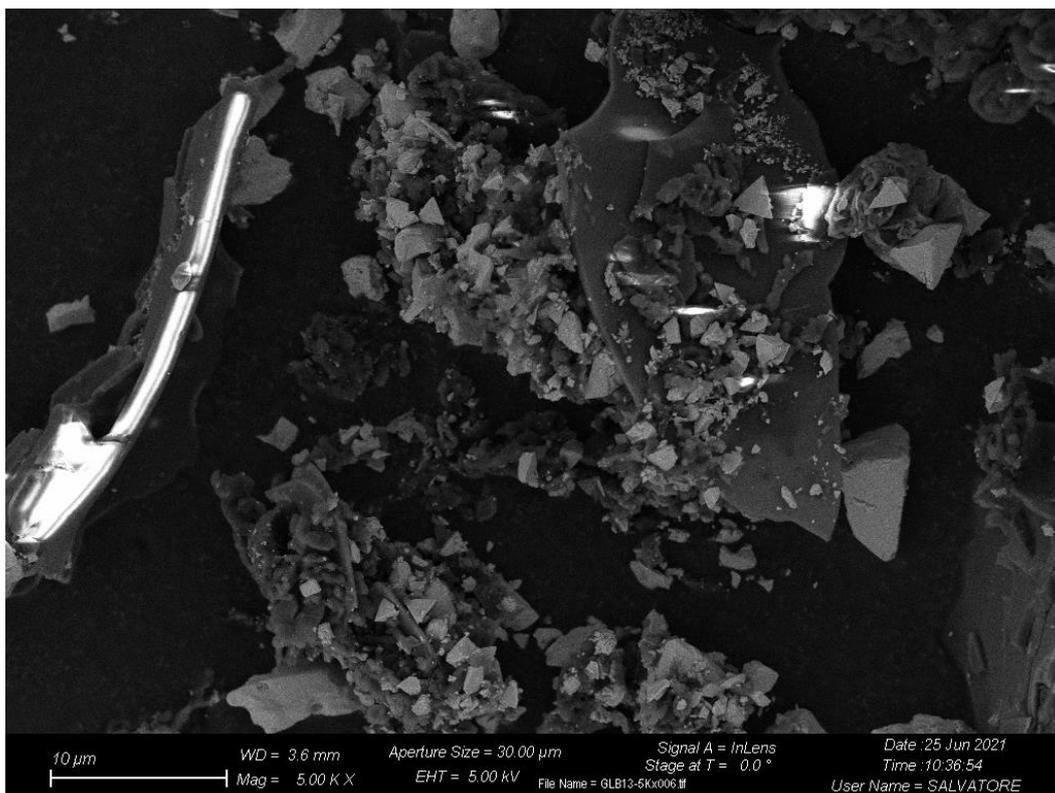


Figura 44: Analisi FESEM della coniugazione effettuata tra le particelle a base di Bismuto ossido utilizzando SDS come tensioattivo e i CDs<sub>120</sub>

### 4.3.2 ANALISI IR

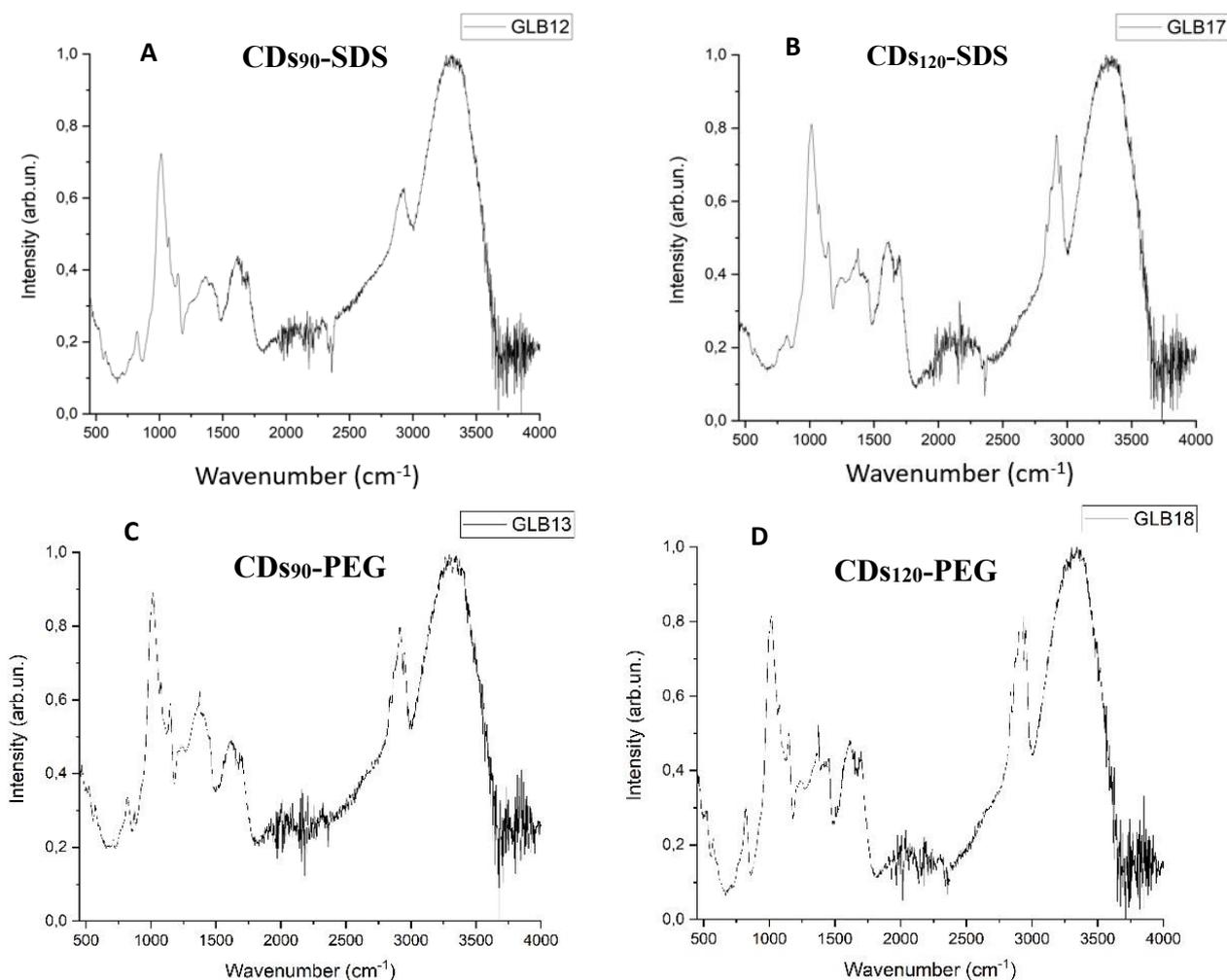


Figura 45: Analisi IR delle coniugazioni ottenute combinando le particelle di Bismuto ossido prodotte utilizzando SDS (A e B) e PEG (C e D), come tensioattivo, con i CDs<sub>90</sub> e i CDs<sub>120</sub>

In figura 45 sono rappresentati gli spettri IR delle coniugazioni ritenute migliori. Queste sono state ottenute combinando le particelle di Bismuto Ossido prodotte utilizzando SDS e PEG come tensioattivo con CDs<sub>90</sub> e i CDs<sub>120</sub>. Come si può notare dagli spettri l'impronta digitale del Bismuto, presente tra 500-550 cm<sup>-1</sup> si è mantenuta, a dimostrazione del fatto che la coniugazione sia avvenuta con successo. Si può notare anche come, nella banda tra 2700-2900 cm<sup>-1</sup>, vi è una variazione dell'intensità dei picchi a favore della formazione di legami C-H, indice dell'avvenuta interazione tra i CDs e le particelle a base di Bismuto sintetizzate. Si osserva come in tutte le coniugazioni effettuate vi sia un ampio spettro nella banda dello ν-OH, probabilmente relativo alla formazione di legami ad idrogeno tra i CDs e le particelle.

### 4.3.3 ANALISI RAMAN

Anche in questo caso, in tutte le analisi effettuate sulle coniugazioni si è notata una grande difficoltà nell'interpretazione degli spettri. Questo è dovuto alla presenza, sulla superficie dei CDs, di varie funzionalità quali gruppi carbossilici, carbonilici e ossidrilici, i quali hanno reso difficoltosa l'analisi dello spettro Raman in quanto questi gruppi hanno mostrato una fluorescenza tale da oscurare le bande normalmente visibili.

Si può tuttavia ipotizzare che le coniugazioni effettuate non abbiano causato quenching dei CDs in quanto la loro fotoluminescenza è tale da non permettere analisi di questo tipo.

### 4.3.4 FLUORIMETRO

Di seguito sono riportate le analisi effettuate al fluorimetro per le coniugazioni effettuate tra i CDs<sub>90</sub> e i CDs<sub>120</sub> con le particelle di Bismuto preparate utilizzando SDS come tensioattivo.

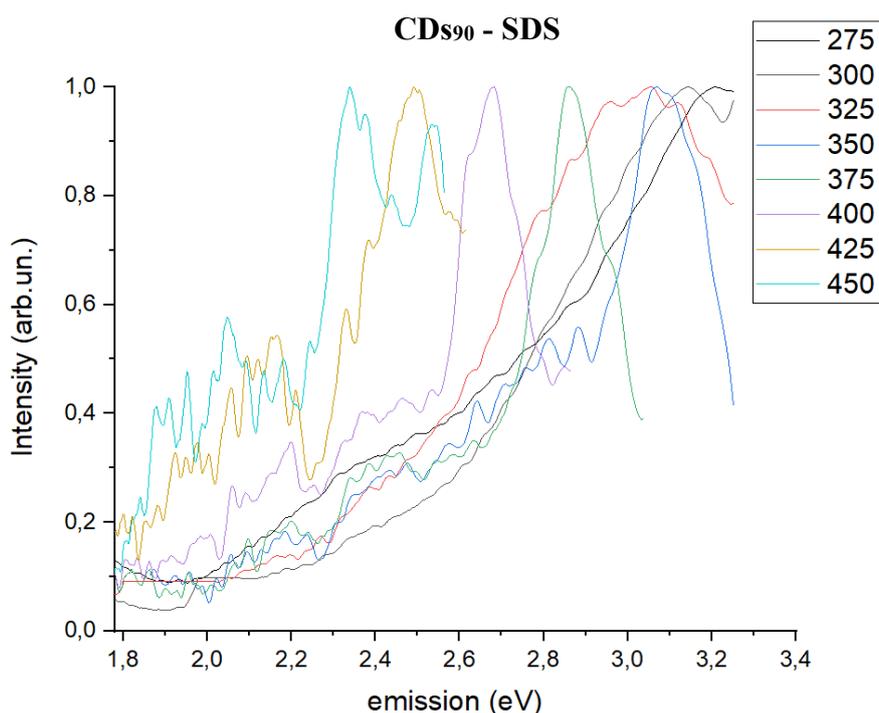


Figura 46: Analisi al fluorimetro dei CDs<sub>90</sub> coniugati con particelle di Bismuto ottenute utilizzando SDS come tensioattivo

Anche in questo caso si sono ottenuti risultati simili a quelli mostrati nei grafici precedenti. Si nota come siano presenti tanti picchi d'emissione dipendenti dall'eccitazione. La coniugazione dunque non ha quenched la fluorescenza originaria dei CDs.

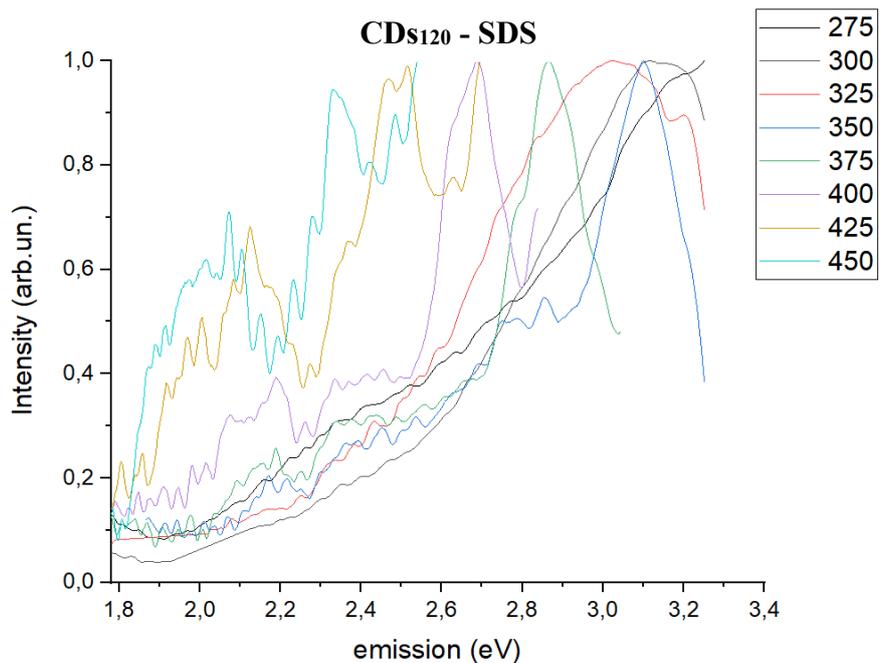


Figura 47: Analisi al fluorimetro dei  $CDs_{120}$  coniugati con particelle di Bismuto ottenute utilizzando SDS come tensioattivo

Si nota nei due grafici mostrati, come siano presenti degli spettri d'emissione dipendenti dall'eccitazione. In questo caso tuttavia, è presente una certa rumorosità probabilmente dovuta all'inserimento delle particelle a base di Bismuto.

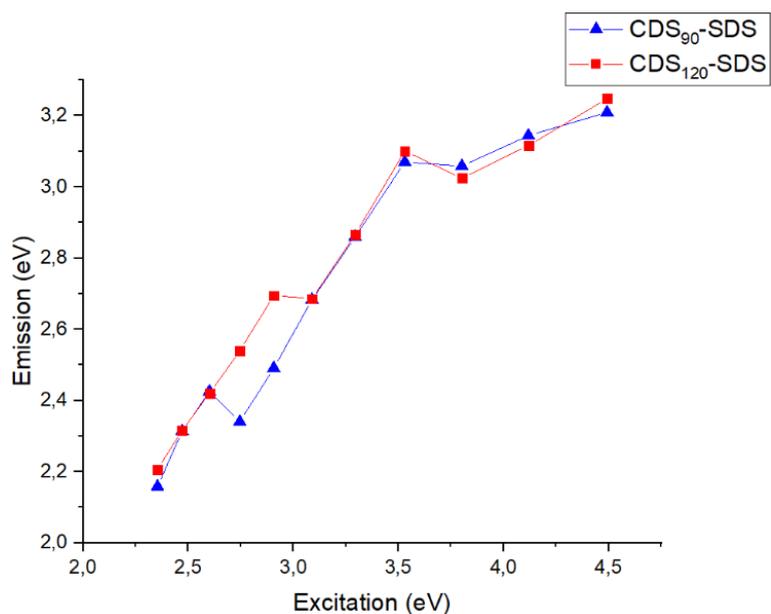


Figura 19: andamento dei picchi di emissione dei  $CDs_{90}$  e i  $CDs_{120}$  coniugati con le particelle di Bismuto utilizzando SDS come tensioattivo in funzione dell'eccitazione

## 5 CONCLUSIONI

Per lo svolgimento del lavoro di Tesi sono state sintetizzate 4 tipologie di CDs, partendo dal glucosio solido come unico reagente. È stata settata una temperatura pari a 350°C ed un tempo di permanenza nel reattore in atmosfera riducente variabile tra 30 min e 120 min. Da questa semplice sintesi è stata ricavata una libreria di composti a base di carbonio sulla quale sono state poi condotte analisi spettroscopiche per ottenere informazioni strutturali e composizionali.

Tramite analisi IR delle 4 tipologie di CDs prodotti, è stato investigato l'effetto del tempo di permanenza nel reattore sulla struttura dimostrando come, mantenendo per più tempo i componenti nel reattore, si verifica una diminuzione dell'intensità del picco relativa allo  $\nu$ -OH ed un conseguente aumento dell'intensità della banda compresa tra 1500-1800  $\text{cm}^{-1}$ , relativa ai legami  $\nu$ -C=O e  $\nu$ -C=C. Questo a dimostrazione dell'avvenuta condensazione del glucosio ed alla formazione di strutture insature.

Dal confronto degli spettri dei CDs con quelli dei rispettivi dializzati è stata dimostrata l'efficacia del trattamento di purificazione in quanto questo ha permesso la preservazione di unità strutturali di maggiore dimensione (come dimostrato dalla resa ottenuta dai CDs<sub>90</sub> e dai CDs<sub>120</sub>). Il trattamento di purificazione eseguito ha permesso di eliminare degli oligomeri di glucosio non sufficientemente reagiti e ciò ha trovato riscontro negli spettri analizzati, nei quali si è notata una diminuzione dell'intensità del picco presente a circa 1000  $\text{cm}^{-1}$  relativa al  $\delta$ -C-O con un conseguente aumento dell'intensità delle bande relative alla formazione di doppi legami.

Non è stato possibile ottenere informazioni dalla spettroscopia Raman in quanto la presenza, sulla superficie dei CDs, di varie funzionalità ha reso difficoltosa l'analisi in quanto questi gruppi hanno mostrato una fluorescenza tale da oscurare le bande normalmente visibili al Raman.

Dall'analisi Raman relativa alle particelle a base di Bismuto è stato possibile notare come l'utilizzo di un tensioattivo, inserito durante il processo di sintesi, non abbia intaccato il meccanismo di reazione. Il tutto è anche stato confermato dalle analisi condotte al FESEM. I risultati migliori sono stati ottenuti utilizzando SDS e PEG come tensioattivi, permettendo la formazione di particelle a morfologia tetraedrica.

Sono state successivamente effettuate delle coniugazioni tra i CDs<sub>90</sub> e i CDs<sub>120</sub>, con le particelle a base di Bismuto ossido ottenute utilizzando SDS come tensioattivo. Si è scelto di usare questa tipologia di particelle in quanto, dalle analisi al FESEM, è emerso che questo tensioattivo ha permesso di ottenere un'elevata omogeneità e grande stabilità dimensionale, evitando dunque l'aggregazione particellare.

Dall'analisi al FESEM delle coniugazioni effettuate sembra che i CDs siano riusciti a decorare la superficie delle particelle. Quello che si è notato è che il processo di coniugazione abbia causato uno sfaldamento dei piani delle particelle le quali, sono costituite da cristalli tetraedrici formati da piani sovrapposti. L'ipotesi è stata confermata dall'analisi degli spettri IR delle coniugazioni effettuate, in quanto si è notato un aumento dell'intensità dei picchi nella banda compresa tra 2700-2900 cm<sup>-1</sup> (ν-C-H).

L'interazione tra le particelle a base di Bismuto ed i CDs è resa possibile grazie alla presenza dei gruppi funzionali presenti nei CDs (OH, C=O, COOH) che possono reagire con dei gruppi OH presenti nelle particelle di Bismuto a causa della presenza di alcuni difetti superficiali di natura morfologica e/o chimica. Altri tipi di interazioni possibili sono quelle di Van der Waals, ma anche interazioni dipolo-dipolo o interazioni tra i sistemi orbitalici.

Sono state infine effettuate delle analisi al fluorimetro sia per i CDs che per le coniugazioni effettuate. Quello che si è notato è come i CDs sintetizzati manifestino un ampio range di emissione eccitazione-dipendente. Dai grafici si è osservato come anche le coniugazioni effettuate mostrino lo stesso comportamento, a dimostrazione del fatto che i legami formati tra i CDs e le particelle non abbiano inficiato la fotoluminescenza dei CDs. Tra le aspettative future, sarebbe molto utile investigare le proprietà delle coniugazioni effettuate in vitro.

Rimangono tuttavia altre analisi da effettuare quali XRD, analisi termogravimetriche (TGA), analisi all'XPS utili per indagare con maggiore precisione le superfici dei materiali in modo da riconoscere gli elementi chimici costituenti e determinare lo stato di legame tra questi.

Si può concludere comunque come complessivamente siano stati ottenuti buoni risultati sia per quanto riguarda la formazione di nanostrutture carboniose che per quanto riguarda le coniugazioni effettuate. Ovviamente vi sono possibilità di ottimizzazione dei processi. Riguardo la sintesi delle particelle, nel caso in cui si volesse migliorare l'omogeneizzazione, si potrebbe ad esempio aumentare la concentrazione di tensioattivo da utilizzare oppure aumentare la temperatura di reazione.

Per le coniugazioni, essendo stato il processo effettuato non particolarmente spinto, si potrebbe effettuare una sonicazione in modo da ottenere una miscelazione più intima dei reagenti.

## **6 RINGRAZIAMENTI**

Un ringraziamento al Professor Alberto Tagliaferro per la professionalità, la chiarezza delle spiegazioni e la disponibilità con cui mi ha seguito durante l'elaborazione della tesi.

Un ringraziamento al Dr. Mattia Bartoli per avermi sostenuto nel mio percorso di ricerca e per avermi fornito indicazioni e correzioni preziose nella stesura dell'elaborato.

Ringrazio i miei colleghi di corso per avermi sempre incoraggiato e sostenuto durante il percorso di studi; per aver condiviso, in questo particolare periodo in cui i contatti umani ci sono stati negati, non solo ore in facoltà ma anche ore ed ore di connessione da remoto.

Un particolare ringraziamento ai miei colleghi di laboratorio Andrea, Cristian, Filippo e Mya con i quali ho potuto condividere questa esperienza.

Ringrazio i miei genitori e mio fratello per avermi sostenuto durante gli anni di studio, permettendomi di seguire qualunque sogno avessi, senza mai perdere la fiducia ed incoraggiandomi nei momenti difficili.

## 7 Riferimenti

- 1) Xu, Xiaoyou; Ray, Robert; Gu, Yunlong; Ploehn, Harry J.; Gearheart, Latha; Raker, Kyle; Scrivens, Walter A. (2004). "Analisi elettroforetica e purificazione di frammenti di nanotubi di carbonio a parete singola fluorescente". *Giornale della American Chemical Society*. 126 (40): 12736–7. doi : 10.1021 / ja040082h . PMID 15469243.
- 2) Lim, Shi Ying; Shen, Wei; Gao, Zhiqiang (2015). "Carbon quantum dots and their applications".
- 3) Wang, Y. and A. Hu (2014). "Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications." *Journal of Materials Chemistry C* 2(34): 6921-6939.
- 4) 'Carbon dots prepared by hydrothermal treatment of dopamine as an effective fluorescent sensing platform for the label-free detection of iron(III) ions and dopamine' Qu KG, Wang JS, Ren JS, Qu XG (2013).
- 5) Liu, Meng & Chen, Bin & Li, Chun & Huang, Cheng. (2019). Carbon dots: Synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. *Green Chemistry*. 21. 10.1039/C8GC02736F.
- 6) A. Kellarakis, From highly graphitic to amorphous carbon dots: a critical review, *MRS Energy Sustain. 1 (E2) (2014) 1e15.*, [S. Wei, X. Yin, H. Li, X. Du, L. Zhang, Q. Yang, R. Yang, Multi-color fluorescent carbon dots: non-size effect dominate graphitized sp<sup>2</sup> conjugated domain and surface state energy level co-modulate band-gap, *Chem. Eur J.* 26 (2020) 8129e8136.
- 7) Y.-P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K.S. Fernando, P. Pathak, M.J. Mezziani, B.A. Harruff, X. Wang, H. Wang, Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (24) (2006) 7756e7757.
- 8) Li, Yan; Zhao, Yang; Cheng, Huhu; Hu, Yue; Shi, Gaoquan; Dai, Liming; Qu, Liangti (2012). "Nitrogen-Doped Graphene Quantum Dots with Oxygen-Rich Functional Groups". *Journal of the American Chemical Society*.
- 9) Miao, S., K. Liang, Jun-jie Zhu, Bai Yang, Dongyuan Zhao and Biao Kong. "Hetero-atom-doped carbon dots: Doping strategies, properties and applications." *Nano Today* 33 (2020): 100879.
- 10) Koutsogiannis, Panagiotis & Thomou, Eleni & Stamatis, Haralambos & Gournis, Dimitrios & Rudolf, Petra. (2020). Advances in fluorescent carbon dots for biomedical applications. *Advances in Physics: X*. 5. 1758592. 10.1080/23746149.2020.1758592.
- 11) M. L. Liu, B. B. Chen, Z. X. Liu and C. Z. Huang, *Talanta*, 2016, 161, 875–880.

- 12) Mo, Y.-M.; Tang, Y.; Gao, F.; Yang, J.; Zhang, Y.-M. *Synthesis of fluorescent CdS quantum dots of tunable light emission with a new in situ produced capping agent. Ind. Eng. Chem. Res.* 2012, 51, 5995–6000. [CrossRef].
- 13) R. S. Li, P. F. Gao, H. Z. Zhang, L. L. Zheng, C. M. Li, J. Wang, Y. F. Li, F. Liu, N. Li and C. Z. Huang, *Chem. Sci.*, 2017, 8, 6829–6835.
- 14) Sì, Ruquan; Xiang, Changsheng; Lin, Jian; Peng, Zhiwei; Huang, Kewei; Yan, Zheng; Cuoco, Nathan P.; Samuel, Errol LG; Hwang, Chih-Chau; Ruan, Geden; Ceriotti, Gabriel; Raji, Abdul-Rahman O.; Martí, Angel A.; Tour, James M. (2013). "Il carbone come fonte abbondante di punti quantici di grafene". *Comunicazioni Natura*. 4: 2943. Bibcode : 2013NatCo...4.2943Y . doi : 10.1038/nmms3943 . PMID 24309588 .
- 15) Li, Haitao; Lui, Xiaodie; Kang, Zhenhui; Huang, Hui; Liu, Yang; Liu, Jinglin; Lian, Suoyuan; Tsang, ChiHimA.; Yang, Xiaobao; Lee, Shuit-Tong (2010). "Punti quantici di carbonio fluorescente solubile in acqua e design fotocatalizzatore". *Angewandte Chemie Edizione Internazionale*. 49 (26): 4430-4. doi : 10.1002/anie.200906154. PMID 20461744.
- 16) Rimal, Vishal; Shishodia, Shubham; Srivastava, PK (2020). "Novel sintesi di punti di carbonio ad alta stabilità termica e nanocompositi da acido oleico come substrato organico". *Nanoscienza applicata*. 10 (2): 455–464. doi: 10.1007/s13204-019-01178z. S2CID 203986488.
- 17) Shi DL, Cho HS, Chen Y, Xu H, Gu HC, Lian J, Wang W, Liu GK, Huth C, Wang LM. *Fluorescent polystyrene- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> compositenanospheres for in vivo imaging and hyperthermia. Adv Mater* 2009;21:2170–2173.
- 18) Kim, S., et al. (2012). "Anomalous Behaviors of Visible Luminescence from Graphene Quantum Dots: Interplay between Size and Shape." *ACS Nano* 6(9): 8203-8208.
- 19) M. L. Liu, B. B. Chen, Z. X. Liu and C. Z. Huang, *Talanta*, 2016, 161, 875–880.
- 20) A. Chandra and N. Singh, *Chem. Commun.*, 2018, 54, 1643–1646.
- 21) Donate-Buendia, C., Torres-Mendieta, R., Pyatenko, A., Falomir, E., Fernandez-Alonso, M., and Miguez-Vega, G. (2018). *Fabrication by laser irradiation in a continuous flow jet of carbon quantum dots for fluorescence imaging. ACS Omega* 3, 2735–2742. doi: 10.1021/acsomega.7b02082.
- 22) Hu, S.-L., Niu, K.-Y., Sun, J., Yang, J., Zhao, N.-Q., and Du, X.-W. (2009). *One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation. J. Mater. Chem.* 19, 484–488. doi: 10.1039/B812943F.

- 23) Yang, S., Sun, J., Li, X., Zhou, W., Wang, Z., He, P., et al. (2014). Large-scale fabrication of heavy doped carbon quantum dots with tunable-photoluminescence and sensitive fluorescence detection. *J. Mater. Chem. A* 2, 8660–8667. doi: 10.1039/c4ta00860j.
- 24) Zhu, H., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F., and Yang, X. (2009). Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. *Chem. Commun.* 4, 5118–5120. doi: 10.1039/b907612c.
- 25) Wang, M. Gao and G. W. Ho, *J. Mater. Chem. A*, 2014, 2, 5703.
- 26) Nicollian, E. H. (1971). "Surface Passivation of Semiconductors". *Journal of Vacuum Science and Technology.* 8 (5): S39–S49.
- 27) P. Ayala, R. Arenal, A. Loiseau, A. Rubio and T. Pichler, *Rev. Mod. Phys.*, 2010, 82, 1843.
- 28) X. T. Zheng, A. Ananthanarayanan, K. Q. Luo and P. Chen, *Small*, 2015, 11, 1620-1636.
- 29) *Opportunities and Challenges of Fluorescent Carbon Dots in Translational Optical Imaging* Junqing Wang, Gang Liu, Ken Cham-Fai Leung, Romaric Loffroy, Pu-Xuan Lu and Yi Xiang J. Wang.
- 30) B. B. Chen, Z. X. Liu, W. C. Deng, L. Zhan, M. L. Liu and C. Z. Huang, *Green Chem.*, 2016, 18, 5127–5132.
- 31) H. Zhang, H. Ming, S. Lian, H. Huang, H. Li, L. Zhang, Y. Liu, Z. Kang and S.-T. Lee, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 10822.
- 32) H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C. H. A. Tsang, X. Yang and S. T. Lee, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 4430.
- 33) *Synthesizing green carbon dots with exceptionally high yield from biomass hydrothermal carbon* Yushuang Zhao, Shuangshuang Jing, Xinwen Peng, Zehong Chen, Yijie Hu, Hao Zhuo, Runcang Sun Linxin Zhong.
- 34) "Photoluminescent Carbon Dots as Biocompatible Nanoprobes for Targeting Cancer Cells in Vitro" Qin Li, Tymish Y. hulchanskyy, Ruili Liu, Kaloian Koynov, Dongqing Wu, Andreas Best, Rajiv Kumar, Adela Bonoiu, Paras N. Prasad.
- 35) "Carbon nanodot-based self-delivering microRNA sensor to visualize microRNA124a expression during neurogenesis" Noh EH, Ko HY, Lee CH, Jeong MS, Chang YW, Kim S (2013).
- 36) Zhu, S., Song, Y., Zhao, X. et al. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano Res.* 8, 355–381 (2015).

- 37) 'Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents' Sheng-Tao Yang, Xin Wang, Haifang Wang, Fushen Lu, Pengju G. Luo, Li Cao, Mohammed J. Meziani, Jia-Hui Liu, Yuanfang Liu, Min Chen, Yipu Huang, Ya-Ping Sun.
- 38) 'In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite' Tao HQ, Yang K, Ma Z et al (2012).
- 39) Zheng, X.T., Ananthanarayanan, A., Luo, K.Q. and Chen, P. (2015), *Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications*. *Small*, 11: 1620-1636.
- 40) Shahbazi, M.-A., et al. (2020). "The versatile biomedical applications of bismuth-based nanoparticles and composites: therapeutic, diagnostic, biosensing, and regenerative properties." *Chemical Society Reviews* 49(4): 1253-1321.
- 41) Zhu, Shoujun; Meng, Qingnan; Wang, Lei; Zhang, Junhu; Song, Yubin; Jin, Han; Zhang, Kai; Sun, Hongchen; Wang, Haiyu; Yang, Bai (2013). "Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging". *Angewandte Chemie International Edition*. 52 (14): 3953–7.
- 42) Yu Y., Lu S., Bao S., ET AL.: 'Nanostring-cluster hierarchical structured Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: synthesis, evolution and application in biosensing', *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, 18, (3), pp. 1931–1936.
- 43) Y. Ramos Reynoso, A. Martinez-Ayala, M. Pal, F. Paraguay-Delgado and N. R. Mathews, *Adv. Powder Technol.*, 2018, 29, 3561–3568.
- 44) G. Li, Y. Ding, Y. Zhang, Z. Lu, H. Sun and R. Chen, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, 363, 497–503.
- 45) Xiao X., Hu R, Tu S., ET AL.: 'One-pot synthesis of micro/nano structured  $\beta$ -Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with tunable morphology for highly efficient photocatalytic degradation of methylparaben under visible-light irradiation', *RSC Adv.*, 2015, 5, (48), pp. 38373–38381.
- 46) Gou X., Li R., Wang G., ET AL.: 'Room-temperature solution synthesis of Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanowire for gas sensing application', *Nanotechnology*, 2009, 20, pp. 495–501.
- 47) Tseng T.K., Choi J., Jung D.W., ET AL.: 'Three-dimensional self-assembled hierarchical architectures of gamma-phase  $\square$ owerlike bismuth oxide', *ACS Appl. Mater. Interf.*, 2010, 2, pp. 943–946.
- 48) Y. Xuan, X.-L. Song, X.-Q. Yang, R.-Y. Zhang, Z.-Y. Song, D.-H. Zhao, X.-L. Hou, J. An, X.-S. Zhang and Y.-D. Zhao, *Chem. Eng. J.*, 2019, 375, 122000.

- 49) *Şimşek, S., Şüküroğlu, A.A., Yetkin, D. et al. DNA-damage and cell cycle arrest initiated anti-cancer potency of super tiny carbon dots on MCF7 cell line. Sci Rep 10, 13880 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70796-3>.*
- 50) *Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Diaz D, et al. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit Streptococcus mutans growth and formation of biofilm. Int J Nanomedicine. 2012;7: 2109-2113. doi: 10.2147/IJN.S29854.*
- 51) *Mishra, V., Baranwal, V., Mishra, R.K. et al. Immunotoxicological impact and biodistribution assessment of bismuth selenide (Bi<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>) nanoparticles following intratracheal instillation in mice. Sci Rep 7, 18032 (2017).*
- 52) *Deng J, Xu S, Hu W, Xun X, Zheng L, Su M. Tumor targeted, stealthy and degradable bismuth nanoparticles for enhanced X-ray radiation therapy of breast cancer. Biomaterials. 2018 Feb;154:24-33. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.048. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29120816.*
- 53) *Z. Li, J. Liu, Y. Hu, Z. Li, X. Fan, Y. Sun, F. Besenbacher, C. Chen and M. Yu, Biomaterials, 2017, 141, 284–295.*
- 54) *Silberstein EB. Radioiodine: the classic theranostic agent. Semin Nucl Med. 2012;42:164-170.*
- 55) *“Swarming carbon dots for folic acid mediated delivery of doxorubicin and biological imaging” Ashmi Mewada, Sunil Pandey, Mukeshchand Thakur, Dhanashree Jadhav and Madhuri Sharon.*
- 56) *Nanotheranostic Carbon Dots as an Emerging Platform for Cancer Therapy Sumiya Haque Adrita, Khandaker Nujhat Tasnim, Ji Hyun Ryu and Shazid Md. Sharker.*
- 57) *Mazrad, Z.A.I.; Kang, E.B.; Nuraeni, N.; Lee, G.; In, I.; Park, S.Y. Temperature-sensitive carbon dots derived from poly(N-isopropylacrylamide) for fluorescence on–off properties. RSC Adv. 2017, 7, 11149–11157. [CrossRef]*
- 58) *P. Namdari, B. Negahdari, A. Eatemadi, Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: an updated review, Biomed. Pharmacother. 87 (2017) 209e222.*
- 59) *Wang Y., Li Y.: ‘Metastable  $\gamma$ -Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tetrahedra: phase-transition dominated by polyethylene glycol, photoluminescence and implications for internal structure by etch’, J. Colloid Interface Sci., 2015, 454, pp. 238–244.*
- 60) *Mallahi, M. & Shokuhfar, Ali & Vaezi, M.R. & Esmailirad, Ahmad & Mazinani, Vahid. (2014). Synthesis and characterization of Bismuth oxide nanoparticles via sol-gel method. Am. J. Eng. Res.. 3. 162-165.*

61) *Franklin D. Hardcastle, Israel E. Wachs, The molecular structure of bismuth oxide by Raman spectroscopy, Journal of Solid State Chemistry, Volume 97, Issue 2, 1992, Pages 319-331, ISSN 0022-4596, [https://doi.org/10.1016/0022-4596\(92\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0022-4596(92)90040-3).*