



POLITECNICO DI TORINO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

INDIRIZZO BIONANOTECNOLOGIE

**CARBON DOTS DERIVATI DALL'AGLIO:
SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E
SOPPRESSIONE DELLE ROS**

Studente:
Giulia Seganti

Relatore:
PROF. ALBERTO TAGLIAFERRO

Correlatore:
DOTT. MATTIA BARTOLI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

A chi ha avuto paura di deludere le proprie aspettative e quelle degli altri.
A chi ha raggiunto il traguardo e a chi ha cambiato strada.
A chi non smette di sognare mai.

SOMMARIO

ABSTRACT	4
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	5
1.1 Carbon dots	5
1.1.1 Struttura	5
1.1.2 Proprietà.....	7
1.1.3 Metodi di sintesi.....	10
1.1.4 Applicazioni biologiche	13
1.2 Proprietà dell'aglio	15
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI	16
2.1 Sintesi idrotermale dei carbon dots	16
2.2 Spettroscopia IR.....	20
2.3 Spettroscopia Raman.....	21
2.4 Fluorimetro	22
2.5 Spettroscopia UV-Vis	23
CAPITOLO 3 ANALISI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI	27
3.1 Spettroscopia IR.....	27
3.2 Spettroscopia Raman.....	36
3.3 Fluorimetro	37
3.4 Spettroscopia UV-Vis	45
CONCLUSIONI	54
BIBLIOGRAFIA.....	57

ABSTRACT

I carbon dots sono nanoparticelle a base di carbonio che possiedono particolari proprietà di fotoluminescenza, tuning chimico e biocompatibilità, suscitando da qualche decennio un crescente interesse in diversi contesti di ricerca, tra cui quello delle applicazioni biomediche avanzate. Tuttavia, la sintesi di questi nanomateriali richiede spesso l'uso di reagenti tossici e metodi ad elevato consumo energetico, motivo per cui in questo lavoro di tesi si è deciso di promuovere scelte più sostenibili producendo librerie di carbon dots di tipo polimerico utilizzando una sintesi idrotermale a partire da un precursore a base di aglio. La modulazione delle proprietà di fluorescenza è stata ottenuta in modo semplice, mediante la variazione di due parametri di sintesi: temperatura e tempo di reazione. Successivamente, sono state indagate le proprietà strutturali e fotofisiche dei carbon dots ottenuti, attraverso la caratterizzazione della fluorescenza tramite fluorimetro e applicando tecniche di spettroscopia a infrarossi, Raman e UV-Vis. Nell'ottica di sviluppare nuove soluzioni teranostiche, capaci di coniugare gli aspetti diagnostici e terapeutici, si è voluto verificare l'efficacia dei carbon dots a base di aglio nella soppressione delle specie reattive all'ossigeno che causano il fenomeno dello stress ossidativo.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Carbon dots

Nel corso dell'ultimo secolo, la ricerca sui materiali a base di carbonio è progredita notevolmente. L'emergere di allotropi di carbonio nanostrutturati come il fullerene, i nanotubi di carbonio (CNT) e il grafene ha portato ad una svolta nella scienza dei materiali [1]. Analogamente ai fullereni e ai CNT, la scoperta dei carbon quantum dots (CDs) è stata casuale. Nel 2004, Xu et al. [2] hanno lavorato sulla purificazione di CNT ossidati utilizzando tecniche elettroforetiche ed hanno isolato una frazione altamente fluorescente. Questa è stata la prima descrizione dei CDs, anche se una definizione precisa è emersa solo in seguito con il lavoro di Sun et al. [3].

Da allora, i CDs hanno attirato grande attenzione dalla comunità scientifica per la buona biocompatibilità, le proprietà ottiche uniche come l'elevata fluorescenza, il basso costo e l'ecosostenibilità a livello produttivo, l'abbondanza di gruppi funzionali, l'elevata stabilità e la mobilità elettronica. Queste qualità li rendono promettenti in molteplici campi applicativi [4].

1.1.1 *Struttura*

I CDs possono essere considerati come nanostrutture di forma quasi-sferica di tipo core-shell con diametro inferiore a 10 nm in cui il core è grafítico e lo strato esterno contiene vari gruppi funzionali [4]. A seconda della struttura del nucleo, è possibile distinguere vari tipi di CDs, tra cui i graphene quantum dots (GQDs), i carbon nano dots (CNDs) e i carbonized polymer dots (CPDs) [1, 4]. Mentre i CNDs e i CPDs possiedono un nucleo sferico costituito da strutture di grafite a più strati e connesso a gruppi superficiali, i GQDs sintetizzati per la prima volta da Pan et al. nel 2010 [5] presentano una forma circolare o ellittica, con una struttura di uno o pochi strati di grafene con dimensioni laterali maggiori della loro altezza [4, 6].

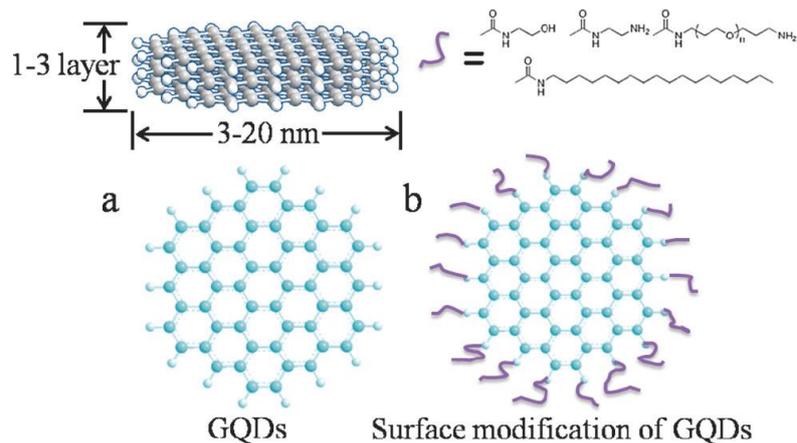


Figura 3: rappresentazione dei GQDs (a) e modello strutturale in seguito alla funzionalizzazione con reagenti di passivazione della superficie (b) [10]

1.1.2 Proprietà

Nonostante i QDs tradizionali presentino eccellenti proprietà di fotoluminescenza multicolore, la loro origine dai semiconduttori li rende tossici [6, 20]. Inoltre, la loro sintesi prevede metodi poco sostenibili, il che spinge verso altre soluzioni. D'altro canto, i CDs sono superiori perché presentano delle proprietà ottiche simili a quelle dei QDs, come l'emissione di fluorescenza regolabile, non intermittente e stabile [11], vantando anche altre proprietà come la solubilità in acqua, la robustezza chimica, la predisposizione ad essere facilmente funzionalizzati, l'elevata resistenza alla fotodegradazione, la bassa tossicità, la biocompatibilità e l'ecosostenibilità [12], che li rendono promettenti in molteplici applicazioni.

Come nel caso dei QDs, lo spettro di fotoluminescenza dei CDs è generalmente ampio e dipende dalla lunghezza d'onda di eccitazione: le diverse dimensioni delle nanoparticelle e i loro vari siti emissivi fanno sì che l'emissione sia determinata dall'eccitazione, come si può notare dalla figura 4 [3].

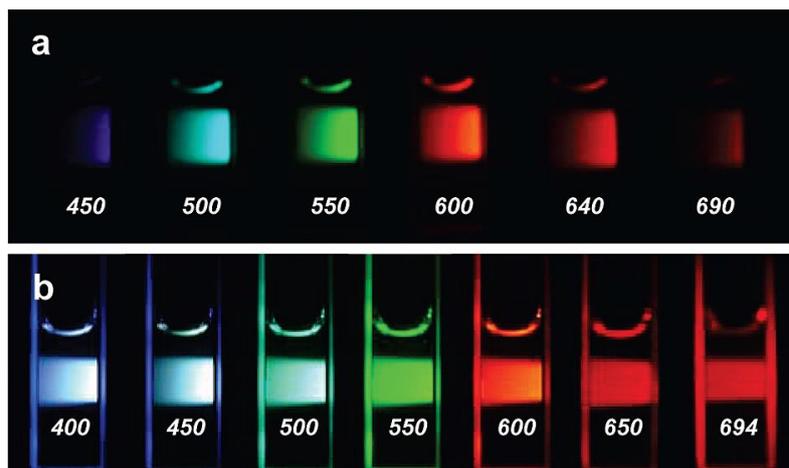


Figura 4: soluzioni acquose di CDs eccitate a 400 nm e fotografate mediante filtri passa-banda di lunghezze d'onda differenti indicate in foto (a); gli stessi campioni eccitati alle lunghezze d'onda indicate in immagine e fotografate direttamente [3]

Per esempio, nel lavoro di Jiang et Al. sono stati analizzati dei CDs che presentano alterazioni dell'emissione di fotoluminescenza causate dalla differenza nelle dimensioni delle nanoparticelle e dal contenuto di azoto variabile [13].

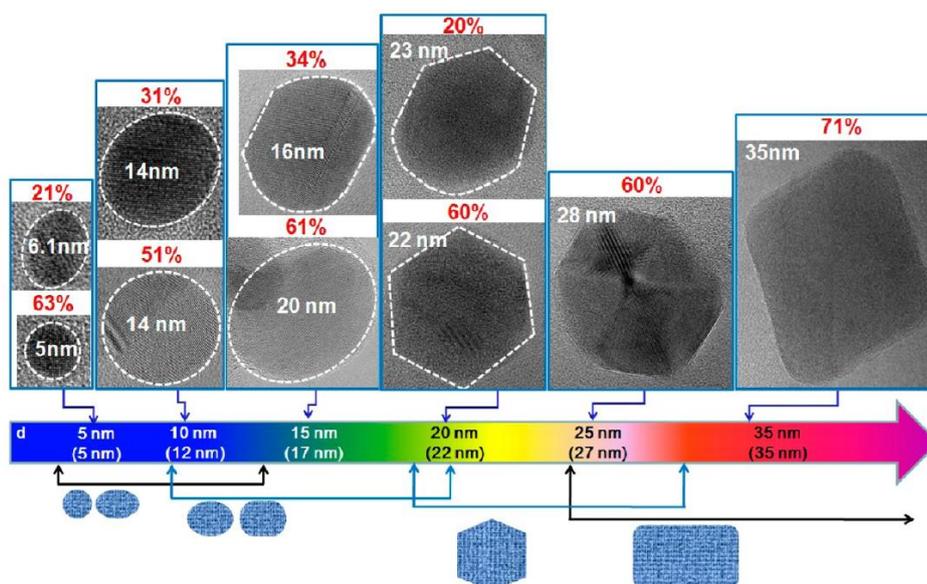


Figura 5: dipendenza dell'emissione dalle dimensioni e dalle forme delle nanoparticelle. I CDs investigati da Kim et Al. [14] al microscopio a trasmissione elettronica hanno dimensioni comprese tra i 5 nm e i 35 nm e sono di diverse forme. Quelli di più piccole dimensioni e di forma sferica emettono nel blu, mentre i CDs di più grandi dimensioni e dalla forma poligonale emettono nel rosso.

Come l'azoto, anche l'ossigeno presente in superficie è determinante per il comportamento emissivo dei CDs. Ding et Al. hanno dimostrato che all'aumentare del grado di ossidazione superficiale dei CDs si riduce gradualmente il band gap, per cui si verifica lo spostamento dei picchi di emissione verso il rosso (red-shift) [15].

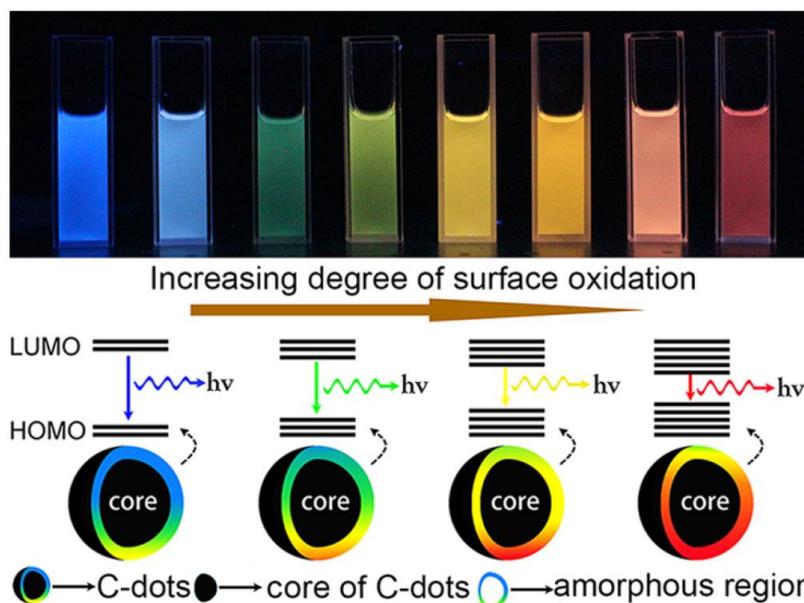


Figura 6: grafico che mostra la modulazione della fluorescenza dei CDs al variare del grado di ossidazione superficiale [15]. Si può osservare come l'aumento dell'ossidazione superficiale comporti una diminuzione del band gap e quindi uno spostamento dell'emissione verso il rosso.

I CDs che emettono nel rosso possono essere impiegati nell'imaging in vivo delle cavie da laboratorio, in quanto la loro fluorescenza è in grado di penetrare in profondità nei tessuti [15]. Per massimizzare la penetrazione in profondità nei tessuti nell'imaging in vivo, sarebbe ideale utilizzare dei CDs che emettono nel vicino infrarosso (NIR). Questo tipo di CDs è caratterizzato da un'autofluorescenza minima e da un'emissione luminosa in grado di minimizzare il danno arrecato ai tessuti biologici [16]. Li et Al. hanno condotto un esperimento in cui hanno prodotto dei CDs in grado di emettere nel NIR mediante modifiche superficiali con molecole ricche di gruppi C=O e S=O (figura 7) [17]. In generale, spostare l'emissione dei CDs verso il vicino infrarosso (NIR) risulta una sfida complessa e richiede ulteriori studi [18].

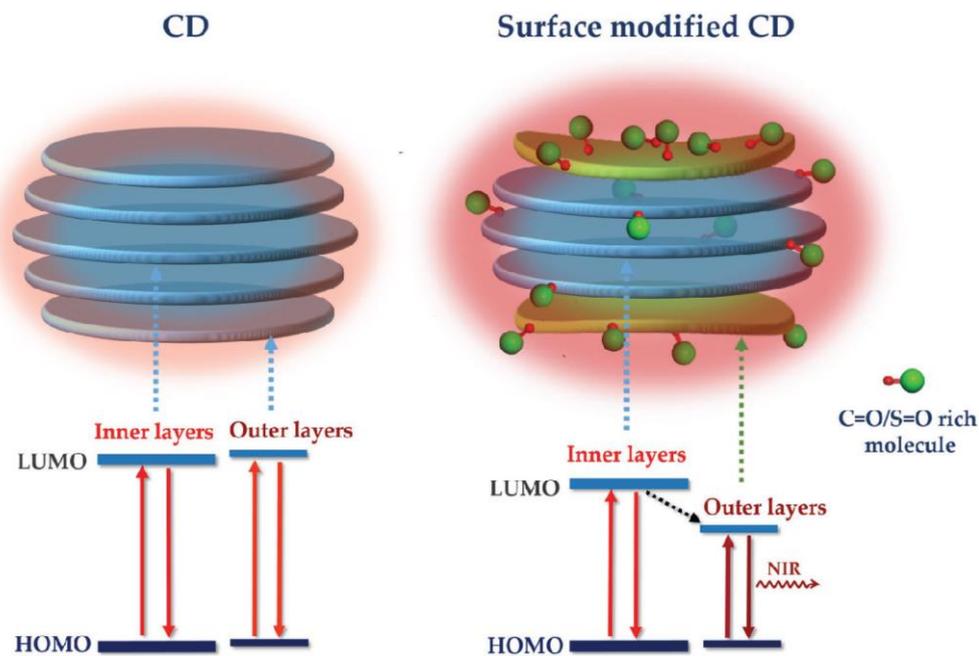


Figura 7: schema della struttura e dei livelli energetici dei CDs modificati da Li et Al. per ottenere l'emissione nel NIR utile in applicazioni di bioimaging [17]. Da questa immagine si può osservare come in seguito alla modifica superficiale con molecole ricche di gruppi C=O e S=O diminuisca il band gap degli strati superficiali, determinando uno spostamento dell'emissione nel vicino infrarosso

1.1.3 Metodi di sintesi

Per la sintesi dei CDs sono stati sviluppati vari metodi, impiegando una vasta gamma di materiali di partenza. A seconda della fonte di carbonio scelta, i CDs possono essere sintetizzati mediante due approcci, chiamati top-down e bottom-up: il primo prevede la rottura di precursori di carbonio con struttura più grande (come nanotubi di carbonio, grafite, ossidi di grafene, ecc.) in CDs; mentre il secondo consiste nella combinazione diretta di molecole organiche di piccole dimensioni per ottenere i CDs, come avviene nella sintesi tradizionale. I CDs prodotti con un approccio top-down (ad esempio i GQDs) presentano delle strutture simili al grafene ossidato e risultano più piccoli e molto meno fluorescenti rispetto a quelli amorfi ottenuti con un approccio bottom-up [19, 20]. Questa distinzione operativa può essere utile per orientare l'attività lavorativa, ma non riesce a descrivere appieno le caratteristiche complesse dei CDs; perciò, non costituisce una classificazione definitiva dei CDs [1].

I metodi di tipo top-down includono scarica ad arco, ablazione laser, carbonizzazione elettrochimica e ossidazione chimica. Invece quelli di tipo bottom-up comprendono combustione, pirolisi, trattamento idrotermale, trattamento solvotermico, irradiazione a microonde e a ultrasuoni [19, 20, 21, 22]. Rispetto ai metodi top-down, quelli bottom-up risultano più economici, semplici e adatti alla produzione su larga scala [23].

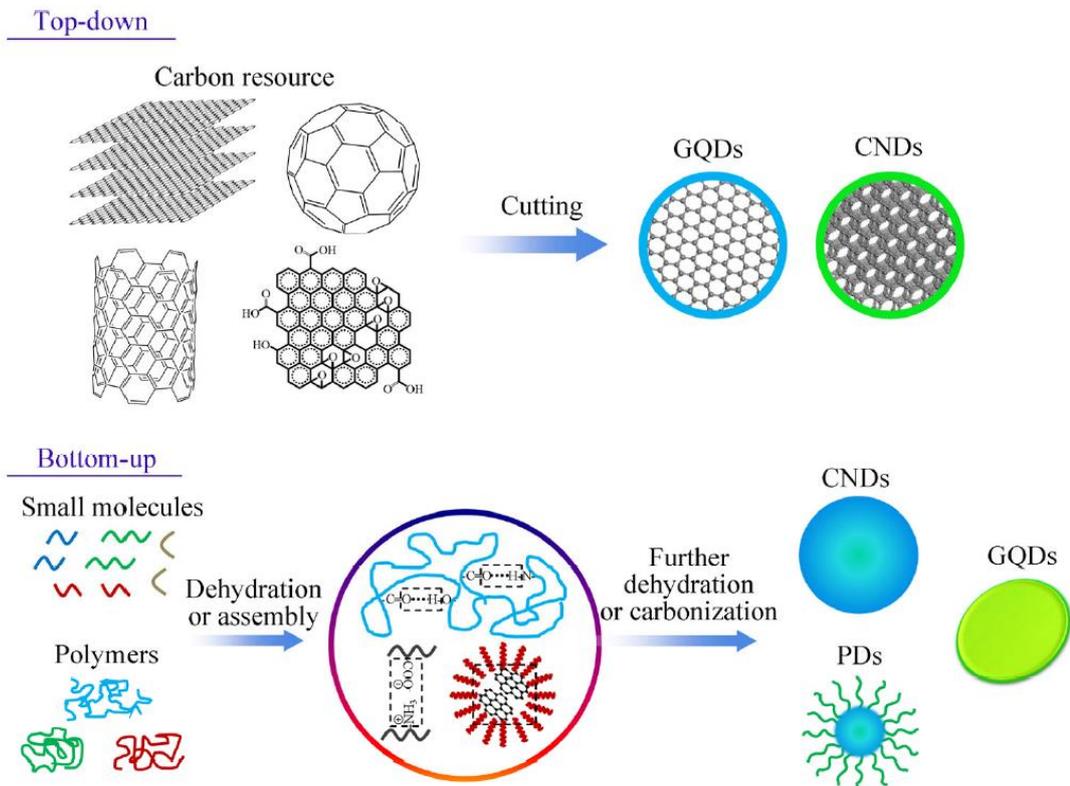


Figura 8: schema illustrativo dei due approcci top-down e bottom-up, in cui GQDs sta per graphene quantum dots, CNDs sta per carbon nano dots e PDs sta per polymeric dots, che sono sottocategorie di carbon dots [22]

Tra i vari materiali di partenza ci sono le biomasse. Una biomassa è un qualunque materiale biologico prodotto da organismi viventi, è composta da cellulosa, emicellulosa, lignina, cenere, proteine, cellulosa, acqua e altri ingredienti [24]. Le biomasse sono una buona fonte di carbonio per la preparazione di CDs; infatti, si può parlare anche di biomass carbon dots (BCDs) [25]. Le biomasse presentano numerosi vantaggi rispetto ad altri tipi di precursore, in quanto sono molto disponibili e facili da ottenere, costano poco e possono autoassemblarsi in temperatura grazie alla presenza di gruppi OH. Non va sottovalutato il fatto che la produzione di BCDs può convertire i rifiuti di biomasse con basso valore in materiali utili e di valore. Tra

le biomasse utilizzate ci sono aglio, buccia di noce, succo di papaya parte esterna del chicco di riso, anguria, semi di litchi, piume d'oca, crisalidi di baco da seta, polline d'api, latte, *Phyllanthus acidus* e agnello arrosto [25].



Figura 9: sintesi di CDs fluorescenti e solubili in acqua a partire da un materiale organico di scarto (buccia di anguria) mediante metodo di pirolisi [26]

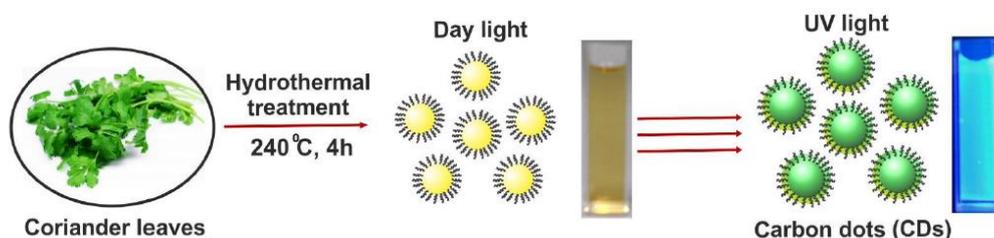


Figura 10: sintesi idrotermale di CDs fluorescenti e solubili in acqua dalle foglie di coriandolo [27]

Nel presente lavoro di tesi si è scelto l'aglio come hanno fatto Zhao et Al. (figura 11) [28]. L'aglio è una biomassa linocellulosica composta da lignina, polimeri di cellulosa (polimero lineare composto da unità di glucosio) e amidi (catene ramificate composte da unità di glucosio). I CDs sono stati ottenuti per sintesi idrotermale andando ad aumentare la temperatura e il tempo di reazione per ottenere una maggiore condensazione del composto e delle migliori proprietà chimico-fisiche.

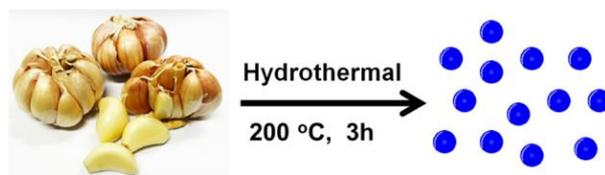


Figura 11: illustrazione del processo di sintesi idrotermale di CDs fluorescenti dall'aglio per imaging cellulare e scavenging di radicali liberi eseguita da Zhao et Al. [28]

1.1.4 Applicazioni biologiche

I CDs trovano impiego in vari ambiti come quelli dei catalizzatori, dei sensori e dei riempitivi per la produzione di compositi, ma in questo elaborato l'attenzione viene rivolta sulle applicazioni biomediche avanzate. I CDs sono stati testati per una vasta gamma di applicazioni biologiche, come le bioimmagini, la biosensoristica, il drug delivery, la teranostica e gli agenti anticancro, antiossidanti e antibatterici [1,6].

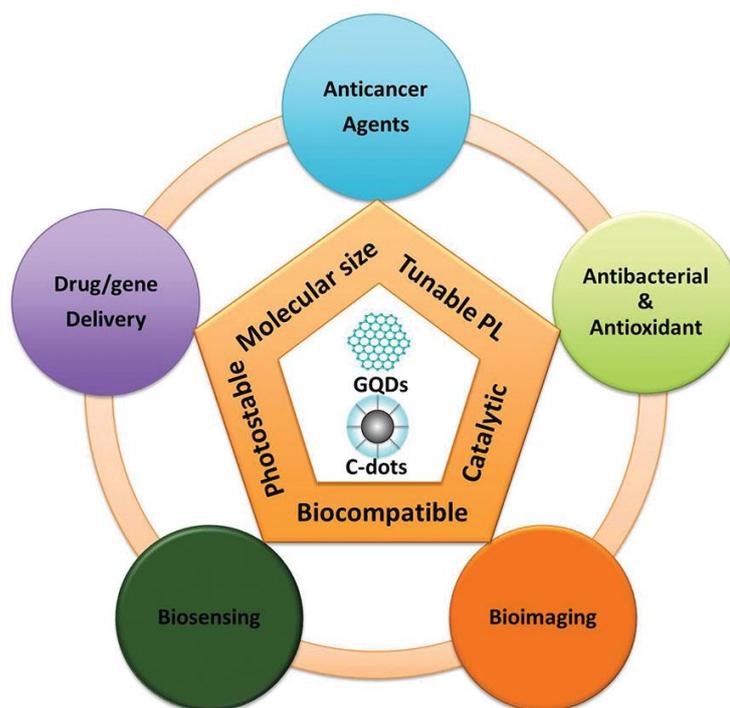


Figura 12: schema delle proprietà dei GQDs e dei CDs e delle loro applicazioni in ambito biomedico [6]

Poiché possono essere ottenuti direttamente da cibi e bevande, i CDs risultano altamente biocompatibili e affidabili nel trattamento delle malattie umane. Infatti, rispetto ai quantum dots, i CDs sono caratterizzati da minor tossicità a causa della mancanza di metalli. Il loro elevato rapporto tra area superficiale e volume ne aumenta la capacità di caricare il farmaco. Inoltre, la loro eccellente fotoluminescenza (PL) può essere regolata ed impiegata per tracciarne la farmacocinetica negli organismi, con o senza principi attivi terapeutici [29].

In particolare, allo scopo di migliorare l'efficacia del drug delivery senza intaccare la barriera emato-encefalica (BBB) è stato necessario ricorrere alla mediazione di nanoparticelle come i CDs. La BBB protegge il sistema nervoso centrale da patogeni e molecole indesiderate, fungendo da ostacolo anche per il trasporto di farmaco mirato alle malattie neurodegenerative come l'Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD). I CDs sono caratterizzati in modo tale da riuscire a penetrarla, fungendo da nanocarrier promettenti nell'ambito del drug delivery mediato da nanoparticelle. I CDs di più piccola dimensione, bassa carica superficiale e anfifilicità sono in grado di attraversare la BBB per diffusione passiva. D'altra parte, i CDs di più grande dimensione, alta carica superficiale e idrofilicità possono comunque superare la BBB se sottoposti a modifiche superficiali e sfruttando vie di trasporto attivo, tra cui endocitosi mediata da recettore o da adsorbimento e trasporto mediato da carrier [30].

Gli elevati livelli di specie reattive all'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) nel cervello dei pazienti affetti da AD sono considerati un contributo alla sua patogenesi. Pertanto, considerando lo stress ossidativo causato da un eccesso di ROS nei cervelli dei pazienti con AD, sarebbe importante sviluppare dei CDs che inibiscano o addirittura consumino le ROS nel trattamento di tale patologia. Attraverso un esperimento di degradazione di coloranti fotocatalitici, Zhou et Al. hanno osservato dei carbon nitride dots (CNDs) impegnati nel disattivare le ROS e nel consumare quelle già presenti nell'ambiente, al fine di contribuire alla riduzione dello stress ossidativo nei cervelli dei pazienti colpiti da AD [29].

Pochi altri studi hanno menzionato l'effetto di inibizione delle ROS da parte dei CDs; ad esempio, Chen et al. hanno affermato che i CDs incapsulati in un idrogel auto-rigenerante erano in grado di eliminare gli eccessi di ROS [31]. Per contro, molti studi hanno menzionato la capacità dei CDs di indurre la produzione di ROS.

1.2 Proprietà dell'aglio

L'aglio (*Allium sativum L.*) è una pianta erbacea aromatica consumata in tutto il mondo come alimento e rimedio tradizionale per varie malattie. L'aglio è ricco di diversi fitoconstituenti contenenti zolfo, come l'alliina, l'allicina, gli ajoeni, i vinylditiini e flavonoidi come la quercetina. Estratti e composti isolati dall'aglio sono stati studiati a fondo per le sue proprietà benefiche che includono la capacità di stimolare il sistema immunitario e di agire come agente antibatterico, antifungino, antivirale e antiossidante [32].

L'aglio viene associato innanzitutto all'inibizione dell'attività cancerogena, grazie a suoi composti come il disolfuro di diallile chiamato 'DAD' (diallyl disulfide). Per esempio, nello studio di Tsubura et Al. [33] si valuta l'efficacia dei DADs nel combattere il cancro al seno.

L'aglio è noto anche per le sue proprietà benefiche sulla salute cardiovascolare, dovute a diversi effetti positivi sul sistema circolatorio. In particolare, l'aglio può aiutare a ridurre i livelli di lipidi nel sangue, a prevenire la formazione di coaguli, a migliorare la capacità antiossidante dell'organismo e a favorire la salute dei vasi sanguigni. Inoltre, l'aglio sembra essere in grado di modulare la risposta infiammatoria dell'organismo, un fattore chiave nelle malattie cardiovascolari. Per questi motivi, l'aglio è considerato un agente efficace nella prevenzione e nel trattamento delle malattie cardiovascolari, come l'ipertensione [34].

Alcuni studi recenti hanno suggerito un potenziale effetto positivo dell'aglio nel trattamento di malattie neurodegenerative come la demenza e l'AD: grazie alle sue proprietà antiossidanti, protegge le cellule neuronali dai meccanismi di tossicità e apoptosi indotti dai beta-amiloidei [35].

Nel presente lavoro di tesi è stato scelto l'aglio come precursore dei CDs per andare ad investigare le proprietà antiossidanti di soppressione delle specie reattive all'ossigeno che stanno alla base di molte malattie umane.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

Il precursore scelto per produrre i CDs oggetto di questo lavoro di tesi è l'aglio. Quest'ultimo è stato acquistato in forma granulare presso un supermercato Carrefour. Gli strumenti utilizzati durante la fase di sintesi delle nanoparticelle sono: un'autoclave, una piastra riscaldata REC Digital Heating Ceramic Plate di VELP Scientifica, una cappa a filtrazione molecolare versione standard modello GS1200 di Savatec, una bilancia di Radwag per pesare l'aglio granulare, una bilancia di Iteco Engineering per misurare il prodotto finale, dei filter papers di Whatman, delle membrane per dialisi con cut-off nel range 8000-14000 Da, uno stirrer magnetico di VELP Scientifica per mantenere in agitazione magnetica le soluzioni, un forno di Kenosistec per l'essiccazione. Gli strumenti utilizzati durante la fase di caratterizzazione dei CDs ottenuti sono: lo spettrometro Nicolet 5700 FT-IR di ThermoFisher Scientific per l'analisi IR, lo spettrometro per la fluorescenza LS 55 si Perkin Elmer, il Microscopio Raman confocale inVia™ di Renishaw e lo spettrometro per le analisi UV-Vis Lambda 35 di Perkin Elmer.

2.1 Sintesi dei carbon dots

Il processo di produzione dei CDs è semplice e consiste nella sintesi idrotermale in autoclave di una biomassa, cioè l'aglio. Allo scopo di modulare le caratteristiche dei CDs, si variano due parametri di processo: la temperatura (160°C, 180°C e 200°C) e il tempo di reazione (3h, 6h e 16h).

Per ogni campione si pesano 2.00 g di aglio granulare sulla bilancia Radwag, si inseriscono nel contenitore in teflon dell'autoclave aggiungendo 15 mL di acqua. Quest'ultimo viene inserito a sua volta nel contenitore metallico più esterno (figura 13). Una volta chiuso, l'autoclave viene rivestito di carta stagnola per garantire uniformità di temperatura sui lati e appoggiato sulla piastra riscaldata REC Digital Heating Ceramic Plate di VELP Scientifica posizionata sotto cappa ad una certa temperatura per un certo tempo (figura 14).



Figura 13: da sinistra il contenitore in teflon, il corpo metallico con le due basi e parte superiore



Figura 14: autoclave su piastra riscaldante REC Digital Heating Ceramic Plate di VELP Scientifica sotto cappa a filtrazione molecolare versione standard modello GS1200 di Savatec

La tenuta nell'autoclave è dovuta al bilanciamento di due spinte: una spinta dal basso verso l'alto generata durante il riscaldamento e una dall'alto verso il basso esercitata dalla parte metallica superiore avvitata sul corpo principale.

La pressione nell'autoclave è fondamentale per mantenere il confinamento dei vapori generati durante la fase di riscaldamento sulla piastra e quindi per la formazione del condensato che va a costituire i CDs.

Una volta trascorso il tempo di reazione stabilito, si spegne la piastra riscaldante, si rimuove l'autoclave e si lascia raffreddare in un secchio di acqua per una ventina di minuti. Successivamente si apre l'autoclave sotto cappa e si lascia decantare la soluzione per qualche minuto aggiungendo 5 mL di acqua. Poi si procede eseguendo il filtraggio della soluzione decantata: si piega un filtro di Whatman dal diametro di 90 mm in forma conica, si appoggia sopra un becher da 50 mL e si versa la soluzione lentamente, facendo attenzione a scartare i residui di aglio granulare (figura 15).



Figura 15: filtraggio della soluzione decantata tramite filtro di Whatman dal diametro di 90 mm piegato a forma di cono e appoggiato su un piccolo becher

Nel frattempo, si prepara l'occorrente per la dialisi. Si ricavano circa 5 cm di filtro per dialisi da 14000 Da, si blocca una sua estremità con una molletta di plastica e si immerge in acqua in un becher da 250 mL. Dopo una decina di minuti, si prende il filtro per dialisi lasciato in ammollo e si cerca di aprirlo delicatamente sull'estremità libera per far sì che diventi una sorta di rete cilindrica. Si versa la soluzione campione e si blocca anche la seconda estremità con un'altra molletta di plastica. Si immerge il tutto nel becher pieno di acqua facendo in modo che una delle due mollette sia in appoggio sul bordo superiore del becher. Si immerge anche un piccolo magnete e si porta il becher sullo stirrer magnetico di VELP Scientifica impostando una velocità relativamente bassa in modo tale che l'ancoretta magnetica ruoti in modo regolare e che non si generino dei vortici sul pelo dell'acqua (figura 16).



Figura 16: fase di dialisi sullo stirrer magnetico di VELP Scientifica

L'acqua del becher durante la dialisi viene cambiata ogni 24 ore per almeno 4 giorni, alla fine dei quali si passa alla fase di essiccazione del prodotto nel forno di Kenosistec: si toglie il sistema dallo stirrer, si trasferisce il contenuto del filtro per dialisi in un becher di vetro da 50 mL e si inserisce in forno a 60 °C. I campioni si lasciano a questa temperatura contenuta per più giorni per far evaporare l'acqua senza che si rovini la parte di zolfo. Alla fine del tempo di essiccazione, si rimuove il becher dal forno e si cerca di grattare il prodotto finale essiccato sulle pareti del becher. Se necessario si pesta il prodotto grattato con un pestello di metallo in modo da ottenere una polvere. A questo punto si misura la massa del prodotto ottenuto con la bilancia di Iteco Engineering e si calcola la resa percentuale riferita al processo complessivo di sintesi e purificazione riportata in tabella 1. Quest'ultima risulta sempre molto bassa perché partendo da 2 grammi di aglio si ottengono pochi milligrammi di CDs per ogni campione.

Tabella 1: tabella riassuntiva dei parametri di processo della sintesi idrotermale (temperatura e tempo di reazione), dei giorni di dialisi sullo stirrer magnetico e di essiccazione in forno e della resa percentuale complessiva

Temperatura	Tempo di reazione	Giorni di dialisi	Giorni di essiccazione	Resa percentuale
160°C	3h 43min	4	3	1.5%
180°C	3h 30min	8	4	1.4%
200°C	3h 30min	8	5	0.9%
160°C	6h 44min	8	3	0.6%
180°C	6h 30min	8	4	1.4%
200°C	6h 21min	4	3	1.5%
200°C	16h	6	4	0.3%

2.2 Spettroscopia IR

Per ottenere gli spettri IR con lo spettrometro Nicolet 5700 FT-IR di ThermoFisher Scientific (figura 17), si avvia il relativo programma sul pc e si esegue l'acquisizione dell'ambiente circostante allo strumento, in quanto la caratterizzazione viene eseguita "all'aperto", cioè senza mettere il campione di CDs in soluzione oppure in una pastiglia con un sale. Una volta acquisito il background, si mette un po' di campione sullo specchio di diamante a forma circolare e si posiziona il cannone sopra di esso. A questo punto si fa l'acquisizione del campione, sulla quale si va poi a posizionare una baseline, eseguendo un'interpolazione di segnale e baseline allo scopo di togliere il segnale associato al background acquisito inizialmente.

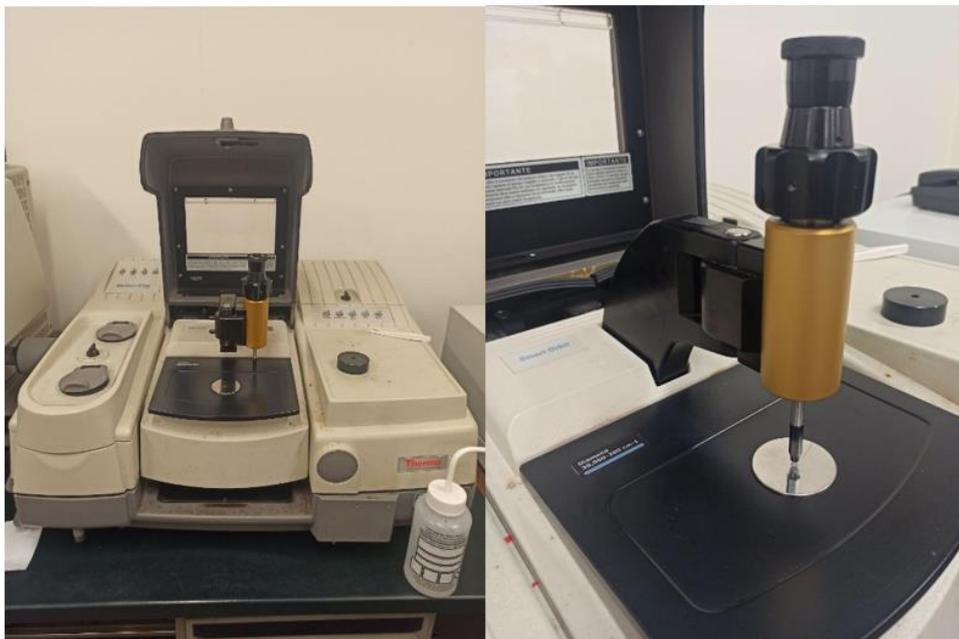


Figura 17: spettrometro Nicolet 5700 FT-IR di ThermoFisher Scientific con dettaglio del cannone

2.3 Spettroscopia Raman

Per l'analisi mediante Microscopio Raman confocale inVia™ (figura 18) è stato preso qualche milligrammo di campione. Trattandosi di CDs polimerici sono bastate poche prove prima di concludere che l'analisi Raman non mostra le sue bande tipiche a causa dell'elevata fotoluminescenza di questo tipo di campione.



Figura 18: Microscopio Raman confocale inVia™

2.4 Fluorimetro

Per la caratterizzazione mediante lo spettrometro per la fluorescenza LS 55 si Perkin Elmer a sinistra in figura 19, si preparano sette soluzioni campione unendo acqua distillata e CDs in concentrazione 0.1 mg/mL.

Ogni soluzione campione viene versata in un'apposita cuvetta al quarzo riportata a destra in figura 19.



Figura 19: spettrometro per la fluorescenza LS 55 si Perkin Elmer e cuvetta al quarzo per le analisi al fluorimetro

La lunghezza d'onda di eccitazione viene fatta variare da 280 nm a 340 nm con incrementi a passi di 10 nm tra una misurazione e l'altra. La velocità di scansione è stata impostata a 50 nm/min.

2.5 Spettroscopia UV-Vis

La prima fase di questo processo di caratterizzazione prevede la composizione dei vari campioni da analizzare con lo spettrometro UV-Vis Lambda 35 di Perkin Elmer riportato in figura 20.

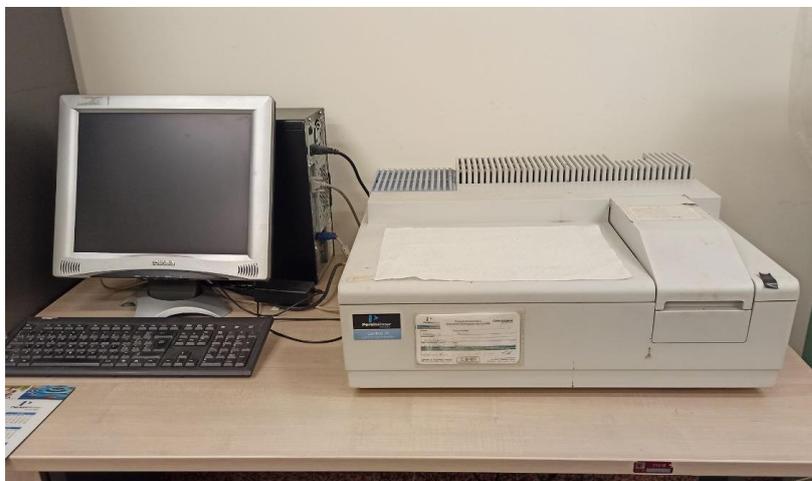


Figura 20: spettrometro UV-Vis Lambda 35 di Perkin Elmer

Innanzitutto, si preparano e si analizzano delle soluzioni di acqua distillata e CDs aggiungendo per ogni campione 20 mL di acqua distillata a 3 mg di CDs pesati con la bilancia di Iteco Engineering.

Successivamente si procede con la preparazione di soluzioni di colorante in condizioni di pre-irraggiamento e post-irraggiamento, con o senza nanoparticelle, allo scopo di valutare la funzione antiossidante di queste ultime. Si comincia componendo una soluzione madre di acqua e colorante rosso (estratto di cocciniglia naturale) seguendo i seguenti step: si pesano 10 mg di colorante e si aggiungono 10 mL di acqua distillata (SOL1); si prelevano 3 mL della soluzione precedente (SOL1) a cui si aggiungono 27 mL di acqua distillata (SOL2); si prelevano 2 mL della soluzione precedente (SOL2) a cui si aggiungono 18 mL di acqua distillata (SOL3) ottenendo la concentrazione 10 mg/L. Si ripete l'ultimo passaggio per tre volte, fino ad ottenere tre soluzioni di concentrazione 10 mg/L e di volume 20 mL. Per ogni prelievo si è utilizzata una pipetta graduata da 10 mL con pompetta di gomma a tre valvole in figura 21.



Figura 21: in alto a sinistra una foto della pipetta graduata da 10 mL con pompetta di gomma a tre valvole; in alto a destra e in basso due foto degli step di prelievo e diluizione per arrivare alla concentrazione finale di 10 mg/L della soluzione di acqua distillata e colorante rosso estratto di cocciniglia

Per sottoporre i campioni ad irraggiamento UV, si costruisce una camera rudimentale che funge da supporto per la Lampada VIQUA S463RL: si prende una scatola di cartone, si rivestono le pareti interne di carta stagnola, poi si creano due aperture sui lati corti per inserire la lampada (figura 22). Durante la fase di irraggiamento, questa scatola viene posta sopra i campioni in agitazione magnetica sullo stirrer.



Figura 22: set-up sperimentale con Lampada VIQUA S463RL: in foto si vede l'interno della scatola rivestita di carta stagnola con la lampada inserita in verticale attraverso due fori. Durante la fase di irraggiamento UV con la lampada accesa, questa scatola viene posta sopra i campioni posizionati sullo stirrer magnetico di VELP Scientifica.

Allo scopo di valutare la capacità di preservazione del colorante in presenza dei CDs, si deve prima stabilire il tempo di irraggiamento che causa una maggiore degradazione del colorante tramite il confronto di una retta di calibrazione del colorante non irradiato e tre soluzioni di colorante irradiato per tempi differenti.

Per la costruzione della retta di calibrazione del colorante non irradiato servono quattro soluzioni di acqua e colorante con concentrazioni via via più diluite. Perciò si prende la soluzione di colorante e acqua distillata a concentrazione 0.01 mg/mL e mediante una pipetta graduata da 10 mL con pompette di gomma a tre valvole si eseguono 3 diluizioni: 1:2, 1:4 e 1:8 (come riassunto in tabella 2).

Tabella 2: diluizioni successive della soluzione di acqua e colorante per costruire la retta di calibrazione del colorante non irradiato dalla lampada UV

Soluzione	Diluizione	Concentrazione [mg/mL]
<i>C1</i>	Start	0.01000
<i>C2</i>	1:2	0.00500
<i>C3</i>	1:4	0.00250
<i>C4</i>	1:8	0.00125

Poi si sottopongono le tre soluzioni ottenute precedentemente a radiazione UV per tempi crescenti: 10 minuti (S1), 20 minuti (S2) e 30 minuti (S3) (come mostrato in tabella 3).

Tabella 3: irraggiamento della soluzione di colorante di concentrazione 0.01 mg/mL per tempi diversi. Questo passaggio serve per scegliere il tempo di irraggiamento che stabilisce le condizioni più distruttive per il colorante ideali per l'analisi tramite spettroscopia UV-Vis della sua preservazione mediante CDs.

Soluzione	Concentrazione [mg/mL]	Tempo di irraggiamento [min]
S1	0.01	10
S2	0.01	20
S3	0.01	30

Infine, si compongono 7 campioni di CDs in soluzione di colorante e acqua distillata alla concentrazione di 10 mg/L. Per ogni campione si uniscono 3 mg di CDs a 20 mL di soluzione e si lasciano sullo stirrer a velocità bassa per 24 ore prima di procedere con le analisi allo spettrometro UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento (figura 23).



Figura 23: campioni di soluzione di colorante rosso con CDs posizionati sulla piastra magnetica di VELP Scientifica per 24 ore prima di effettuare le analisi mediante spettrometro UV-Vis

In ogni analisi il campione è stato inserito in una cuvetta al quarzo larga 1 cm.

Capitolo 3

ANALISI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI

3.1 Spettroscopia IR

L'analisi IR eseguita con lo spettrometro Nicolet 5700 FT-IR di ThermoFisher Scientific serve per valutare la presenza dei vari tipi di gruppi funzionali nei CDs mediante il rilevamento delle loro vibrazioni come bending e stretching.

Il campione in analisi viene posizionato direttamente sullo specchio di diamante, per cui durante l'acquisizione si genera un segnale dovuto all'ambiente circostante allo strumento che non risulta utile ai fini della valutazione delle vibrazioni corrispondenti ai gruppi funzionali d'interesse nei campioni in analisi. Pertanto, è necessario eliminare tale segnale di background. Poiché lo strumento va a stimolare i dipoli delle molecole, occorre distinguere due situazioni: quella in cui si genera una differenza tra dipoli insieme ad un segnale del background e quella in cui non si genera alcuna differenza tra i dipoli e nessun segnale del background. Per molecole come l'acqua e l'anidride carbonica normalmente presenti nell'ambiente intorno allo strumento, l'irradiazione con il laser dello strumento causa uno stretching orizzontale, cioè una variazione della lunghezza di legame che genera una differenza tra dipoli e di conseguenza un segnale associato al background. Per altre molecole come quella di azoto, invece, l'irradiazione non comporta alcun segnale associato al background, in quanto non viene a crearsi una differenza tra dipoli. Quindi andando ad eliminare il segnale di background acquisito inizialmente senza campione, si va a togliere il contributo delle molecole di acqua e di anidride carbonica presenti nell'ambiente circostante allo strumento.

In primo luogo, si esegue un'analisi IR all'aglio granulare non processato al fine di ottenere uno spettro a cui fare riferimento per valutare i cambiamenti negli spettri IR dei CDs.

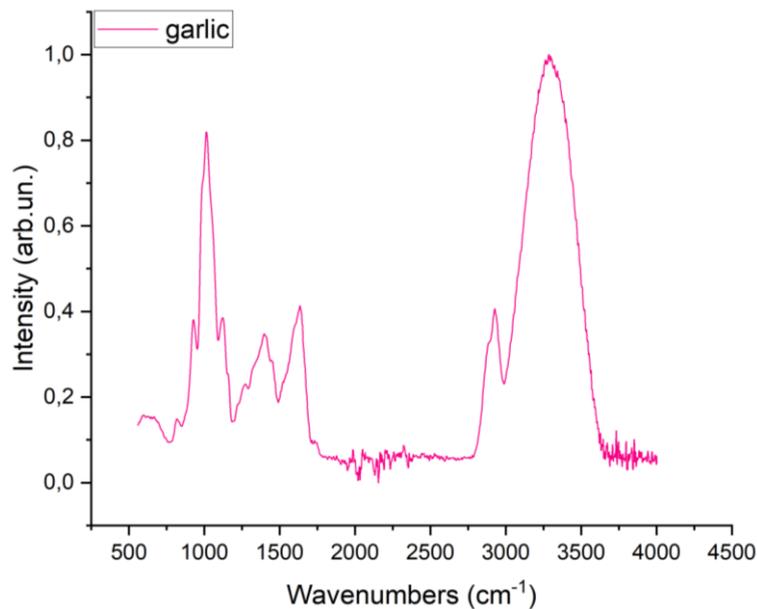


Figura 24: prima acquisizione dell'aglio granulare di partenza non processato

Nel grafico si distinguono varie regioni in cui si hanno diverse vibrazioni associate ai gruppi funzionali che possono essere presenti nei campioni. Nella regione compresa tra 3000 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} si vede una presenza massiccia degli stretching OH. Per numeri d'onda più bassi, da 2800 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} si trovano le vibrazioni associate ai legami saturi CH e caratterizzati da un picco inferiore rispetto a quello associato agli OH. Procedendo verso numeri d'onda inferiori, da 1700 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} , si nota l'assenza quasi totale di stretching del doppio legame C=O, quindi di carbossili, carbonili e ammidi. Intorno a 1660 cm^{-1} si trova il picco associato alla presenza di C=C e quindi di domini aromatici che sono di particolare interesse per questa tesi perché dimostrano l'avvenuta aromatizzazione delle macromolecole costituenti la biomassa utilizzata, permettendo di monitorare l'effetto della temperatura sulla struttura glicidica. Infine, il picco intorno a 1100 cm^{-1} indica la presenza di stretching C-O associati alle funzioni eteree.

A seguire vengono riportati gli spettri IR dei sette campioni di CDs.

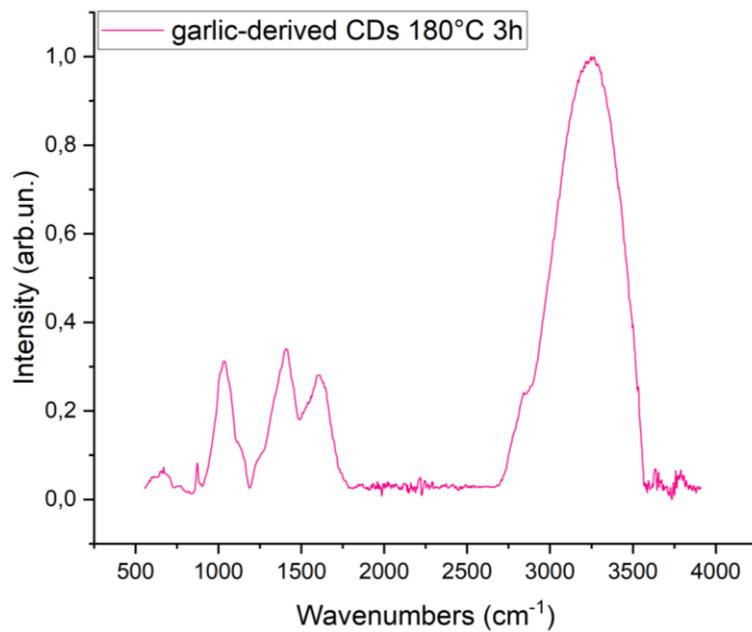


Figura 25: spettro IR del campione sintetizzato a 180°C per 3 ore

Rispetto allo spettro relativo al solo precursore in figura 24, nello spettro del campione riportato sopra in figura 25 si può osservare un calo dei picchi associati alla presenza di domini aromatici intorno a 1600 cm^{-1} . Il picco a sinistra associato agli stretching C-O è diminuito in misura ancora maggiore. Resta invariata la presenza massiccia degli stretching OH tra 3000 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} , mentre cala leggermente il picco associato ai CH tra 2800 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} .

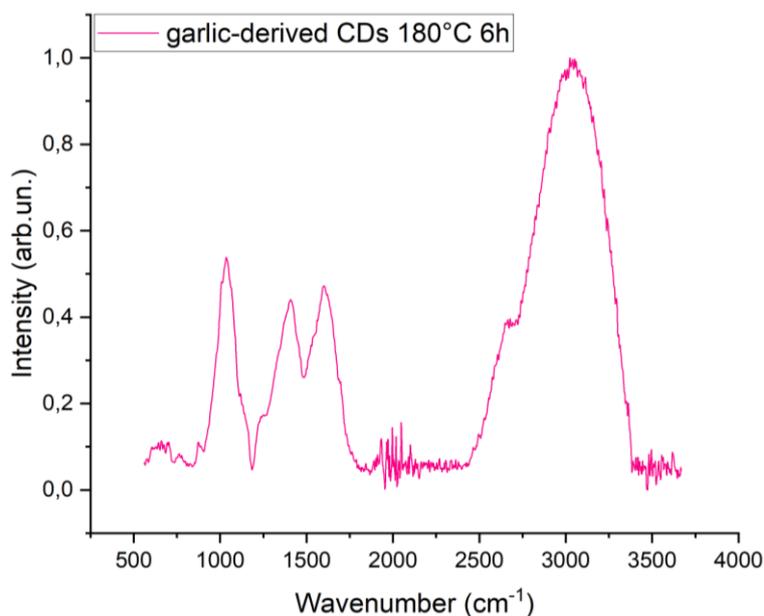


Figura 26: spettro IR del campione sintetizzato a 180°C per 6 ore

Facendo un confronto tra i grafici in figura 25 e 26, in particolare guardando i picchi intorno a 1660 cm^{-1} , si può notare una maggiore aromatizzazione quando il tempo di reazione è più lungo a parità di temperatura. Infatti, dalla tabella 4 sotto riportata si può notare come il rapporto tra legami C=C e legami CH sia maggiore nel caso di temperatura maggiore. Il picco intorno a 1100 cm^{-1} degli stretching C-O sale rispetto al campione sintetizzato alla stessa temperatura con tempo di reazione inferiore ma resta basso se confrontato con quello presente nello spettro dell'aglio in figura 24. Il picco a destra degli stretching OH è circa uguale a quello del precursore. Infine, tra 1700 cm^{-1} e 2000 cm^{-1} si può osservare una leggera presenza di stretching C=O.

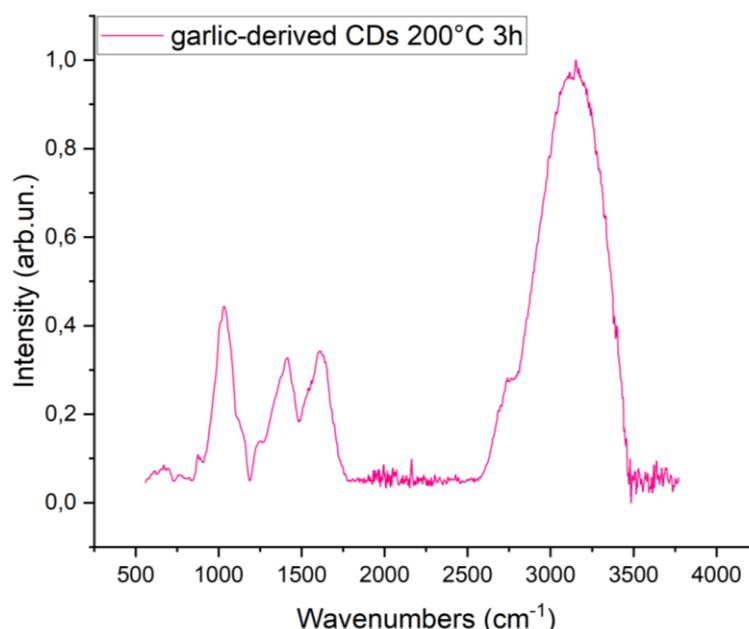


Figura 27: spettro IR del campione sintetizzato a 200°C per 3 ore

Rispetto al campione sintetizzato a 180°C per tre ore (figura 25), il campione prodotto a 200°C per tre ore riportato in figura 27 mostra un leggero aumento del picco degli stretching C-O intorno a 1100 cm^{-1} , nonché del picco intorno a 1660 cm^{-1} associato agli stretching C=C e quindi alla presenza di domini aromatici, come riscontrabile dalla tabella 4 dei rapporti dei legami C=C sui legami CH.

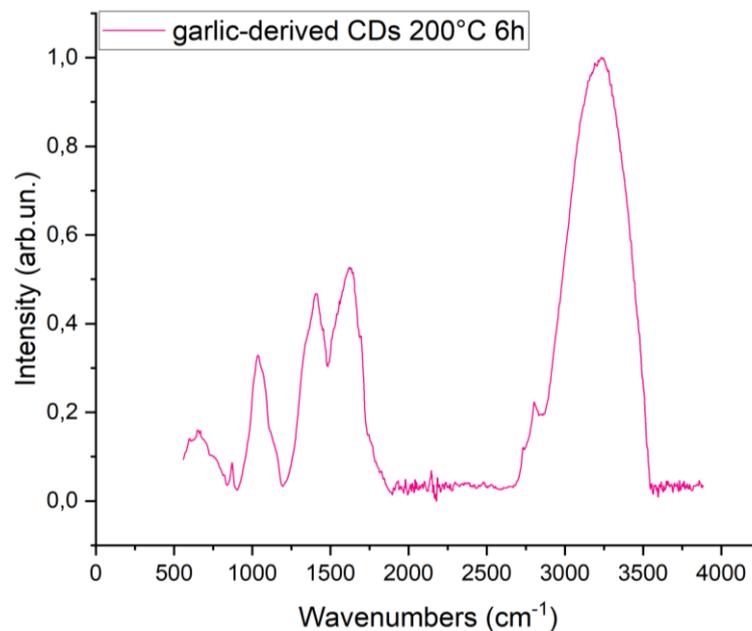


Figura 28: spettro IR del campione sintetizzato a 200°C per 6 ore

Ancora una volta, confrontando i grafici in figura 27 e 28 a livello dei picchi intorno a 1660 cm^{-1} , si può osservare una maggiore aromatizzazione a parità di temperatura per il campione lasciato reagire più tempo, come risulta evidente in tabella 4. Si può notare un aumento degli stretching C=C anche nel confronto tra questo spettro e quello del campione sintetizzato ad una temperatura inferiore (180°C) per lo stesso tempo di reazione (sei ore) rappresentato in figura 26. Il picco vicino a 2800 cm^{-1} associato ai CH è più basso rispetto ai casi precedenti, mentre la presenza di stretching OH associata al picco più grande a destra non varia e resta elevata.

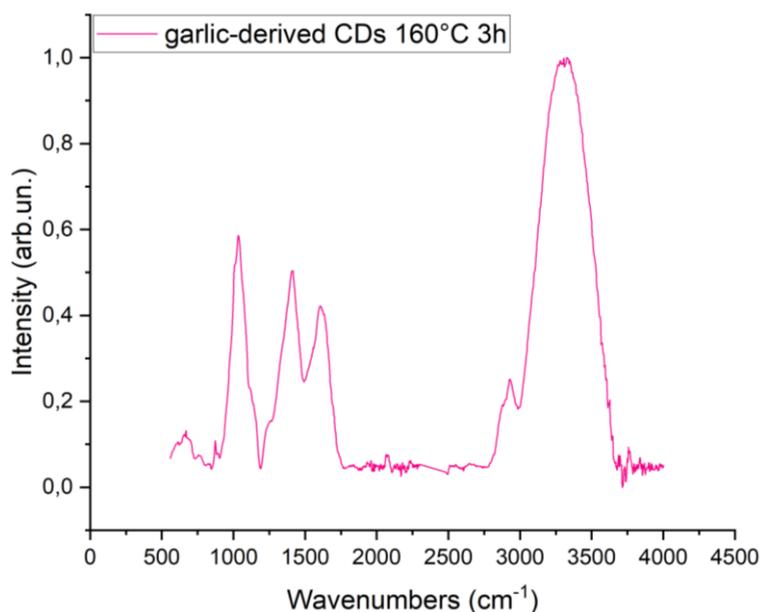


Figura 29: spettro IR del campione sintetizzato a 160°C per 3 ore

Dallo spettro in figura 29 associato al campione sintetizzato a 160°C per tre ore, si può concludere che la presenza di stretching C-O visibile dal picco intorno 1100 cm⁻¹ risulta più alta rispetto ai campioni precedenti ed in particolare più simile a quella del precursore (figura 24). In questo caso la presenza di domini aromatici osservabile dal picco intorno a 1660 cm⁻¹ è sorprendentemente alta. Infatti, come si può riscontrare nella tabella 4, il grado di aromatizzazione risulta più elevato rispetto a quello dei campioni precedenti ad esclusione di quello associato al campione sintetizzato a 200°C per circa sei ore (figura 28). Il picco vicino a 2700 cm⁻¹ associato ai CH è simile a quello del campione precedente (figura 28), così come il picco più alto degli stretching OH.

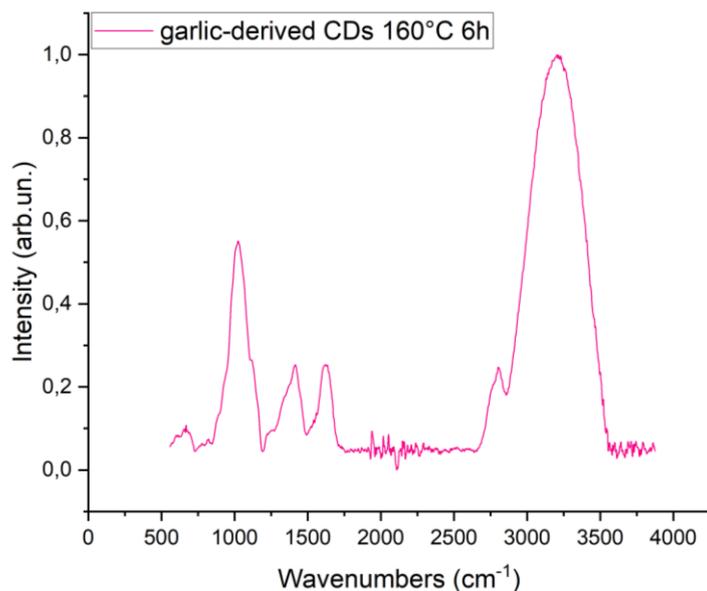


Figura 30: spettro IR del campione sintetizzato a 160°C per 6 ore

Andando a confrontare i picchi intorno a 1660 cm^{-1} dei grafici in figura 29 e 30, si nota l'effetto opposto ai due casi precedenti alle temperature di 180°C e di 200°C , ovvero si verifica una diminuzione di stretching C=C e quindi di domini aromatici nel campione sintetizzato per un tempo più lungo a parità di temperatura (160°C). Dalla tabella 4, si vede che il grado di aromatizzazione è più alto per il campione sintetizzato a 160°C per tre ore (figura 29). Questo risultato è dovuto probabilmente ad un errore durante la fase di produzione, in particolare nella chiusura dell'autoclave prima di lasciarlo sulla piastra riscaldata per sei ore. Il picco intorno a 1100 cm^{-1} degli stretching C-O è piuttosto alto rispetto ai primi campioni analizzati, come nel caso del campione precedente (figura 29). Il picco associato ai CH e il picco più alto degli stretching OH non cambiano.

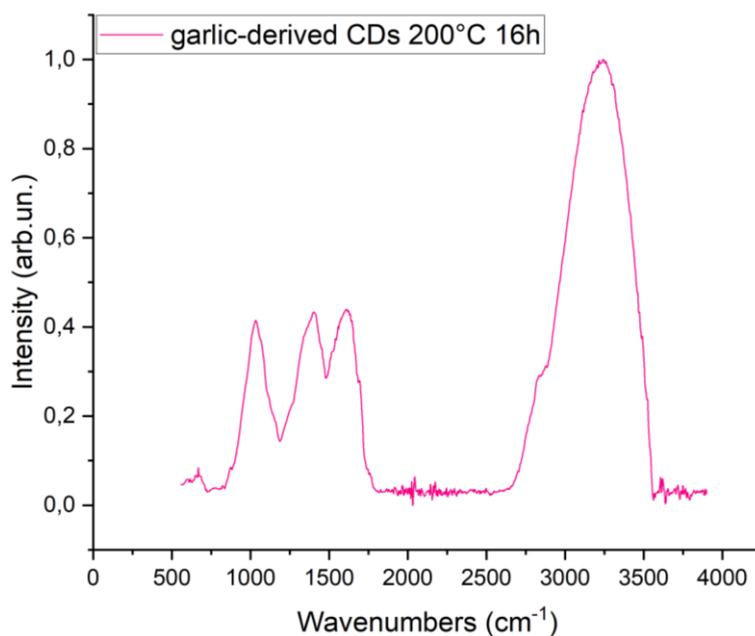


Figura 31: spettro IR del campione sintetizzato a 200°C per 16 ore

Lo spettro associato all'ultimo campione sintetizzato con i parametri di processo più alti presenta il picco tra 3000 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} degli stretching OH del tutto simile ai campioni precedenti. Valutando il rapporto del picco vicino a 1660 cm^{-1} dei C=C e del picco intorno a 2800 cm^{-1} dei CH, si può affermare che il grado di aromatizzazione del campione è maggiore rispetto a tutti gli altri tranne quello sintetizzato a 160°C per circa tre ore (figura 29) e a quello prodotto a 200°C per circa sei ore (figura 28). Il picco intorno a 1100 cm^{-1} associato agli stretching C-O è più basso rispetto a quello dei campioni prodotti a 160°C (figure 29 e 30) e del campione sintetizzato a 180°C per sei ore (figura 26).

Tabella 4: rapporto dei legami C=C e dei legami CH come parametro per valutare il grado di aromatizzazione del campione

Temperatura	Tempo di reazione	Rapporto legami C=C e legami CH
160°C	3h 43min	1.7
180°C	3h 30min	1.2
200°C	3h 30min	1.2
160°C	6h 44min	1.0
180°C	6h 30min	1.2
200°C	6h 21min	2.4
200°C	16h	1.5

Riassumendo, in tutti gli spettri IR sono presenti in misura abbondante gli stretching OH tra 3000 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} , suggerendo una ritenzione della struttura originale a base cellulosa. A parte il caso del campione sintetizzato a 180°C per sei ore (figura 26), non si apprezzano gli stretching C=O tra 1700 cm^{-1} e 2000 cm^{-1} .

In tutti gli spettri IR sono presenti bande molto intense relative allo stretching C=C suggerendo la massiccia formazione di domini aromatici.

Complessivamente, dagli spettri IR riportati sopra si può concludere che i CDs da aglio non possiedono strutture grafiche estese ma semplicemente strutture condensate. Si tratta di CDs di tipo polimerico che possiedono dei domini aromatici, cioè delle parti che sono simili a degli anelli benzenici, che si sono formati mediante la reazione di condensazione durante la sintesi idrotermale descritta nel capitolo di materiali e metodi.

3.2 Spettroscopia Raman

Tutti i campioni analizzati mediante spettroscopia Raman hanno riportato andamenti simili a quello in figura 32. Negli spettri è presente una grande fotoluminescenza che non consente di individuare le bande che solitamente si vedono al Raman, ovvero le bande D e G, il cui rapporto consente di stabilire quanto il campione si avvicina ad una grafite. Pur possedendo un certo grado di grafittizzazione, i CDs ottenuti durante questo lavoro di tesi sono caratterizzati da una presenza massiccia di eteroatomi come l'ossigeno, l'azoto e lo zolfo, nonché da molti legami CH, che sono responsabili dell'elevata fotoluminescenza che nasconde le bande D e G. Considerando il grafico in figura 32 unitamente agli spettri ottenuti con la spettroscopia IR, si può affermare che i CDs in questione sono di tipo polimerico.

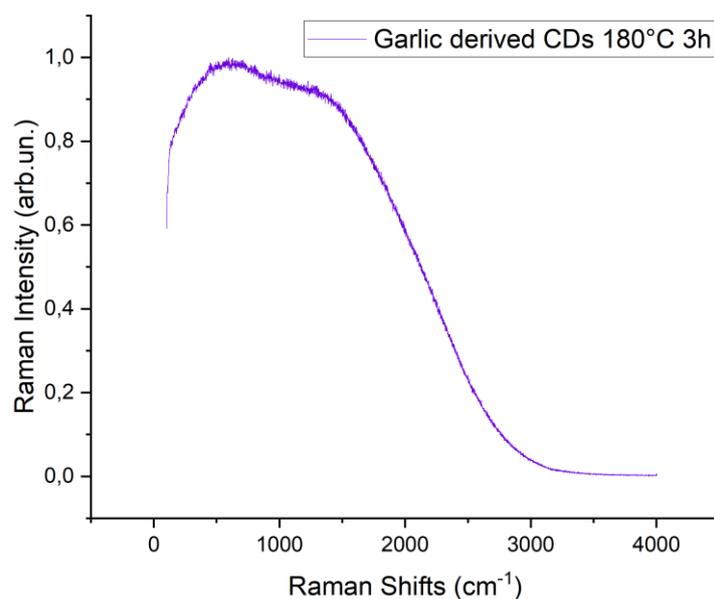


Figura 32: spettro Raman di uno dei campioni preso a titolo di esempio per mettere in evidenza l'elevata fotoluminescenza dovuta alla presenza di eteroatomi e alla bassa grafittizzazione del sistema in quanto CDs di tipo polimerico

3.3 Fluorimetro

La fluorescenza è stata esaminata mediante spettrometro LS 55 si Perkin Elmer ed è rappresentata nelle figure sottostanti (figure da 33 a 39). Nelle legende in alto a destra sono elencate le varie lunghezze d'onda di eccitazione (da 280 nm a 340 nm a passi di 10 nm) e i picchi segnati con le x non sono da considerare perché sono dovuti alla radiazione passante in quanto il filtro passa alto non è sufficiente ad eliminarli.

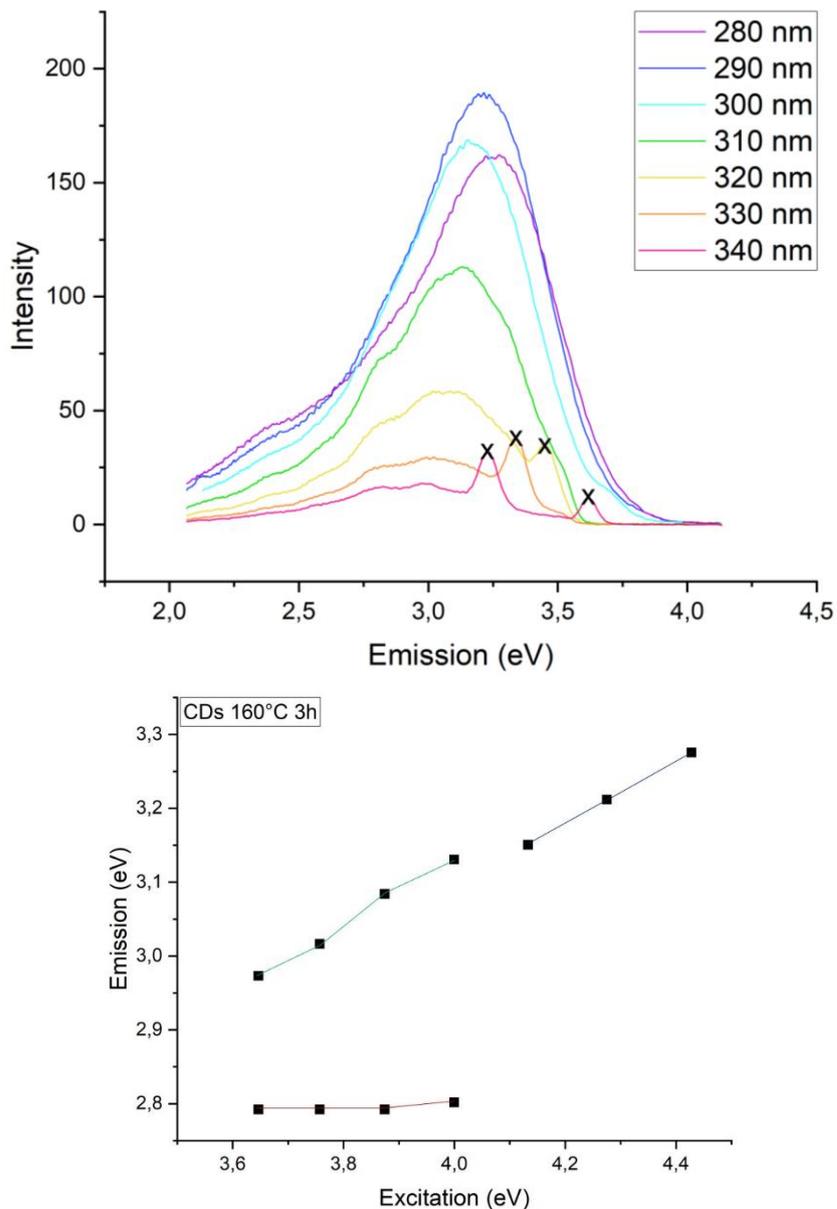


Figura 33: fluorescenza del campione sintetizzato a 160°C per 3 ore

I grafici riportati in figura 33 descrivono la fluorescenza del campione prodotto a 160°C per 3 ore. Il grafico in alto in figura 33 riporta l'energia di emissione sull'asse x e la rispettiva intensità sull'asse y e da esso si può notare che all'aumentare della lunghezza d'onda di eccitazione diminuisce l'intensità di emissione. Si può anche affermare che la lunghezza d'onda di eccitazione massima che consente di ottenere un'emissione in fluorescenza apprezzabile è pari a 320 nm, in quanto le curve relative a 330 nm e a 340 nm non sono degne di nota. I valori massimi dell'emissione si hanno in corrispondenza delle lunghezze d'onda di eccitazione minori (280 nm, 290 nm e 300 nm). Come si può verificare dal grafico in basso in figura 33, Il campione presenta tre bande energetiche: una banda associata ad energie di emissione più basse indipendente dall'eccitazione e due bande associate ad energie di emissione più alte dipendenti dall'eccitazione.

Dal grafico riportato sotto in figura 34 inerente allo stesso campione, si può notare che il picco è intorno ai 400 nm, quindi corrisponde ad un'emissione blu.

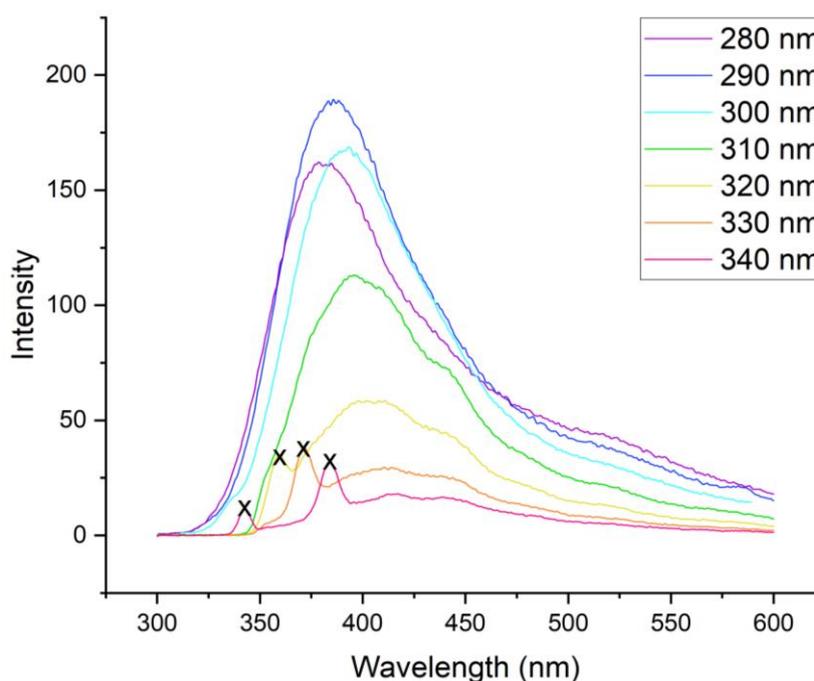


Figura 34: fluorescenza del campione sintetizzato a 160°C per 3 ore rappresentata con le lunghezze d'onda

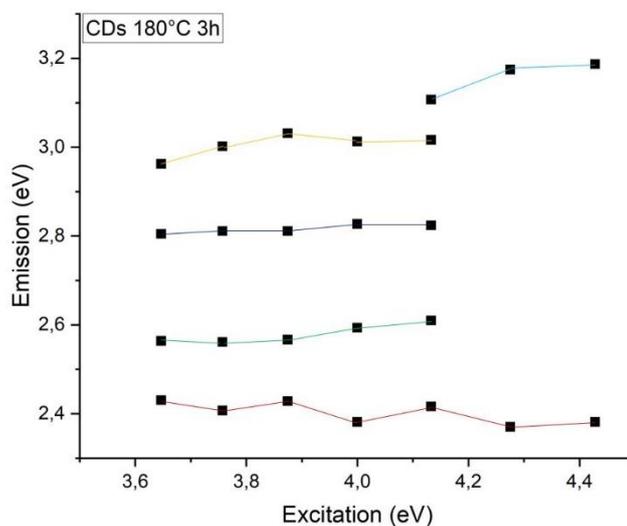
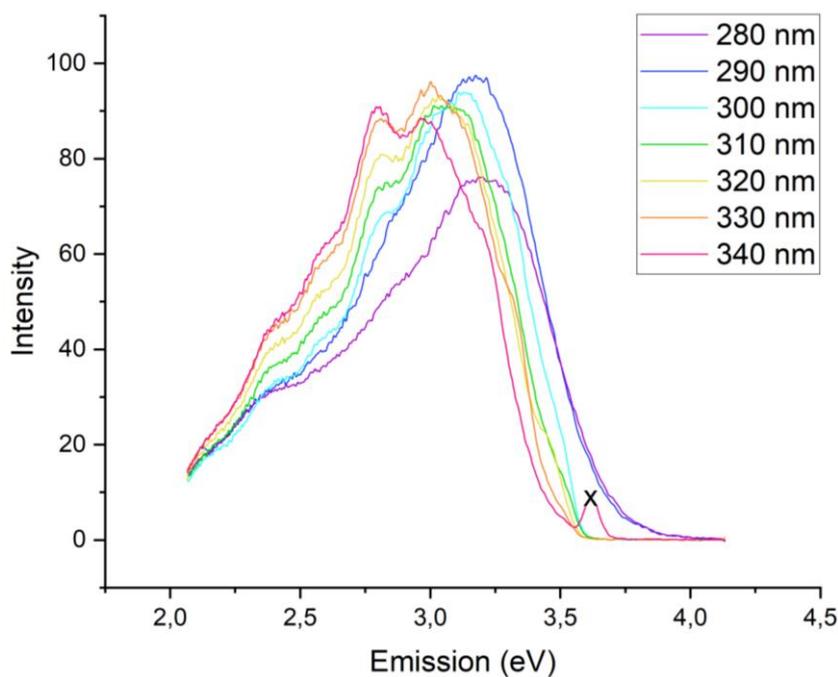


Figura 35: fluorescenza del campione sintetizzato a 180°C per 3 ore

Come si può notare dal grafico in basso in figura 35, il campione sintetizzato a 180°C per 3 ore presenta cinque bande di energia indipendenti dalla lunghezza d'onda di eccitazione. La banda più ampia è associata ad energie di emissioni più basse intorno a 2.4 eV.

Dal grafico in alto in figura 35 si può osservare che i picchi di emissione non diminuiscono in intensità in modo significativo all'aumentare della lunghezza d'onda di eccitazione. Rispetto al campione precedente prodotto a 160°C per 3 ore (figure 33 e 34), l'emissione risulta di minore intensità. Anche in questo caso l'emissione è blu.

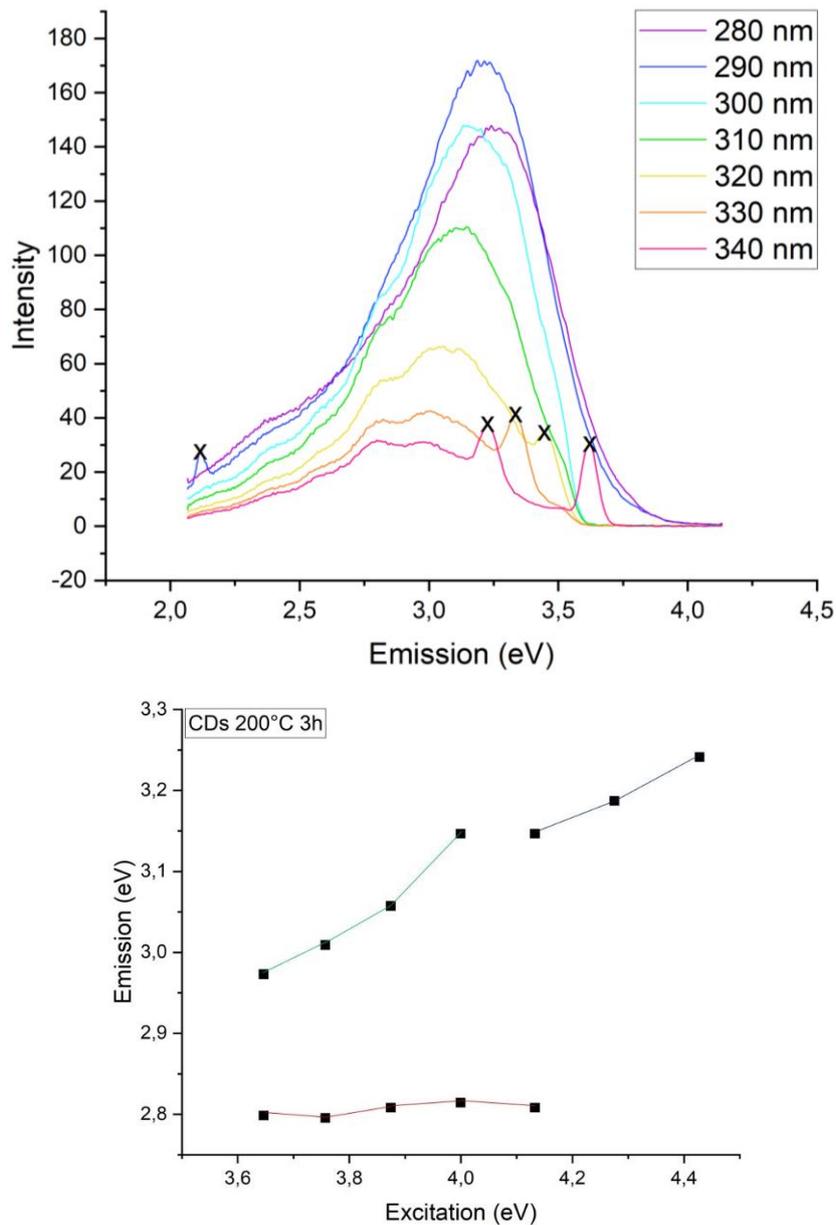


Figura 36: fluorescenza del campione sintetizzato a 200°C per 3 ore

Il campione sintetizzato a 200°C per 3 ore presenta uno spettro simile al primo campione analizzato (figure 33 e 34), con tre bande di energia e emissione nel blu. Dal grafico in basso in figura 36, si nota che la banda ad energie di emissione inferiori è indipendente dall'eccitazione, mentre le due bande associate ad energie di emissione maggiori risultano dipendenti dall'eccitazione. Rispetto al primo campione, l'intensità di emissione risulta leggermente diminuita, ma non tanto quanto nel secondo campione. Anche qui l'intensità di emissione è maggiore per lunghezze d'onda di eccitazione minori e la massima lunghezza

d'onda di eccitazione che consente di ottenere un'emissione apprezzabile è sempre pari a 320 nm.

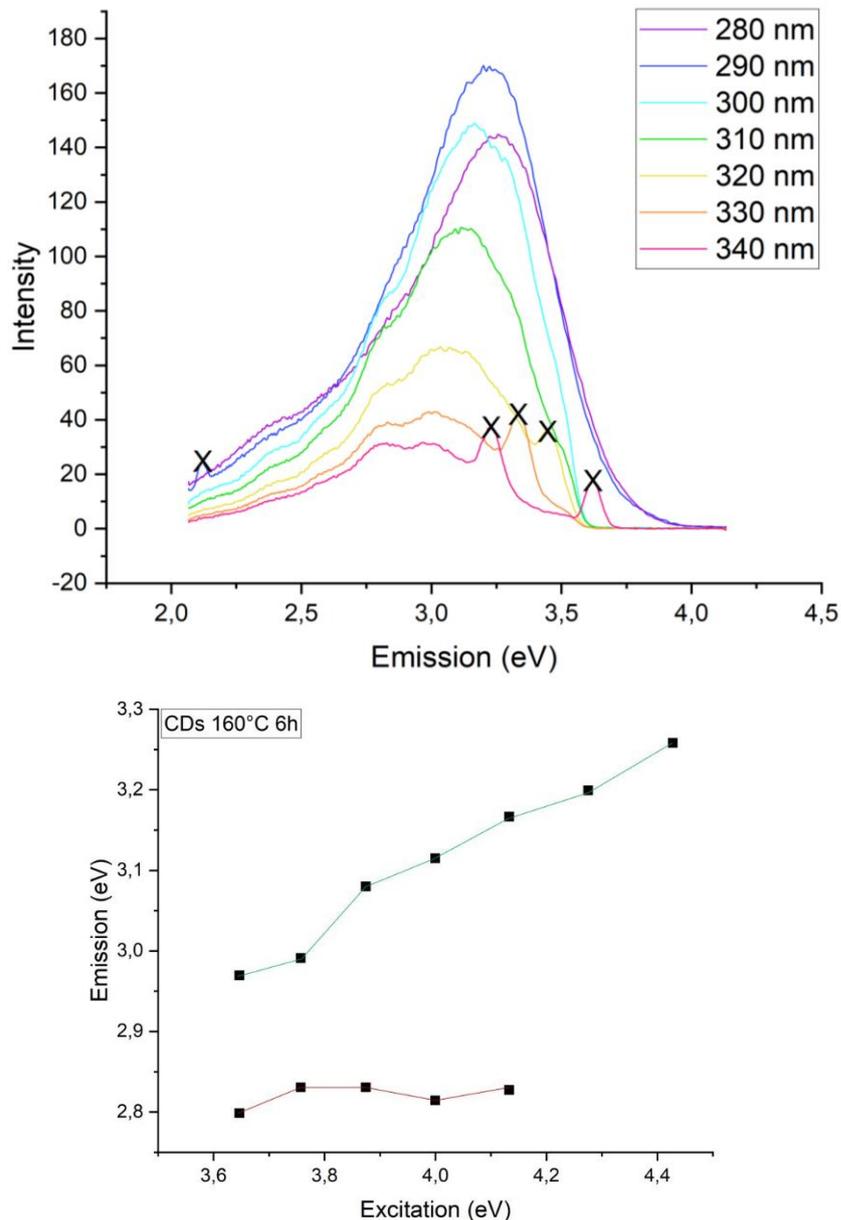


Figura 37: fluorescenza del campione sintetizzato a 160°C per 6 ore

Come si può osservare dal grafico in basso in figura 37, il campione sintetizzato a 160°C per 6 ore presenta due bande energetiche, di cui una a energie di emissione inferiori che è indipendente dall'eccitazione e una ad energie di emissioni maggiori, dipendente dall'eccitazione e di ampiezza maggiore. L'intensità di emissione è leggermente inferiore a quella del primo campione ed è maggiore per lunghezze d'onda di eccitazione minori. Incrementando l'eccitazione oltre i 340 nm non si ha più emissione.

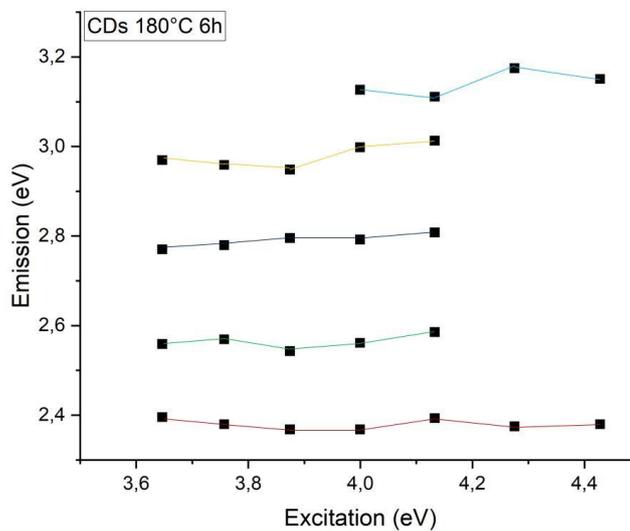
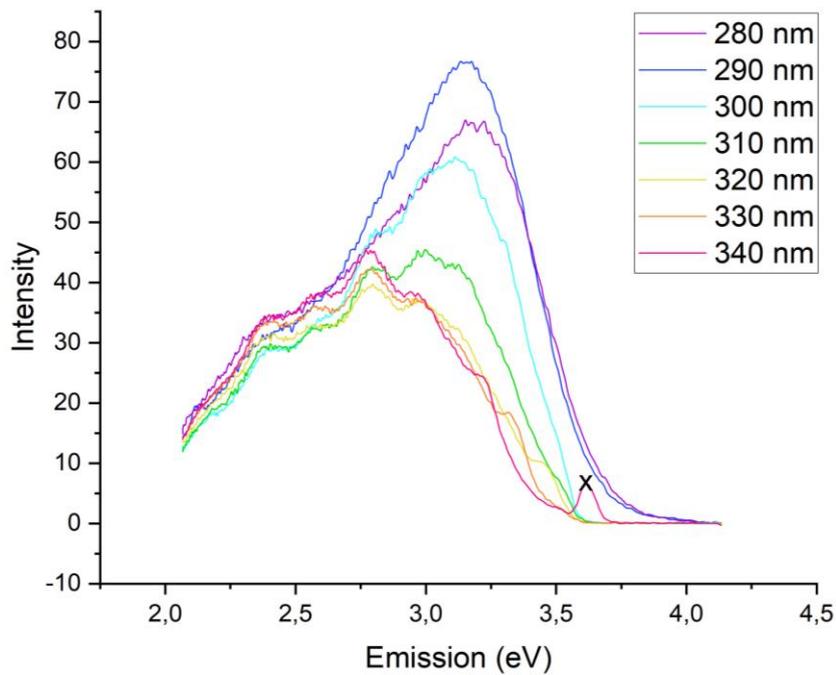


Figura 38: fluorescenza del campione sintetizzato a 180°C per 6 ore

Osservando il grafico in basso in figura 38, si può affermare che il campione sintetizzato a 180°C per 6 ore è caratterizzato da cinque bande di energia indipendenti dalla lunghezza d'onda di eccitazione, come il campione sintetizzato alla stessa temperatura per tre ore (figura 35). La banda più ampia si trova in corrispondenza di energie di emissione minori intorno ai 2.4 eV. Anche l'andamento delle curve nel grafico in alto in figura 38 appare simile a quello del secondo campione rappresentato in figura 35, ma in questo caso si ha un'importante

diminuzione dei picchi di emissione all'aumentare della lunghezza d'onda di eccitazione. Rispetto al secondo campione, l'intensità di emissione massima ha subito un leggero calo.

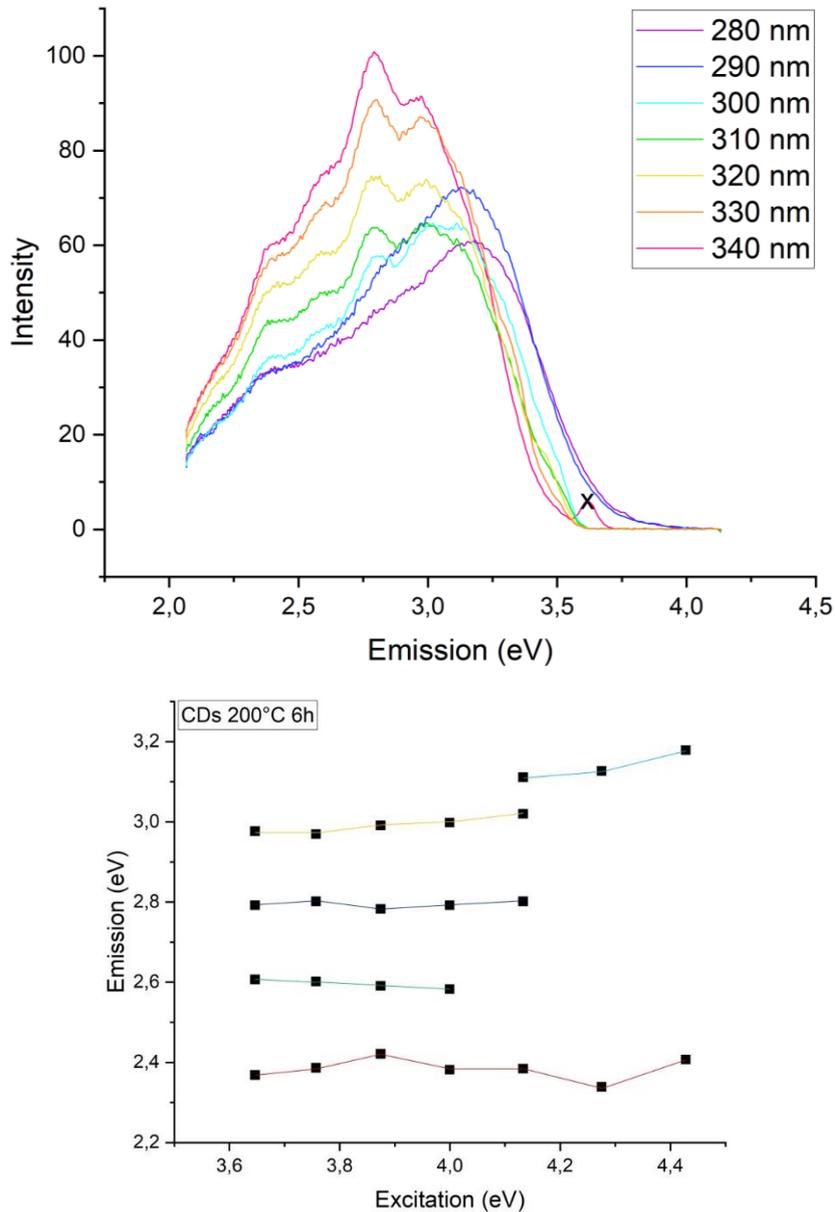


Figura 39: fluorescenza del campione sintetizzato a 200°C per 6 ore

Per quanto riguarda il campione prodotto a 200°C per 6 ore si può fare un discorso simile a quello già fatto in merito al campione precedente in figura 38. Come si può vedere dal grafico in basso in figura 39, ci sono più bande di energia indipendenti dalla lunghezza d'onda di eccitazione. C'è una banda più ampia per energie di emissione inferiori e altre quattro bande meno ampie a energie di emissioni maggiori. La banda più stretta si trova alle energie di

emissione più alte intorno a 3.1 eV. Dal grafico in alto in figura 38 si nota che, a differenza del caso precedente in figura 38 in questo caso si verifica un aumento dell'intensità di emissione all'aumentare delle lunghezze d'onda di eccitazione.

Riassumendo, si può dire che si distingue un campione (160°C 6h) con due bande energetiche, di cui una a energie di emissioni inferiori indipendente dall'eccitazione e una a energie di emissione maggiori che dipende dall'eccitazione e che presenta un'ampiezza maggiore rispetto alla prima banda. Poi, si individuano due campioni (160°C 3h, 200°C 3h) con tre bande energetiche, di cui una indipendente dall'eccitazione associata ad energie di emissione inferiori e due dipendenti dall'eccitazione in corrispondenza di energie di emissione maggiori. Infine, gli altri tre campioni (180°C 3h, 180°C 6h, 200°C 6h) possiedono cinque bande indipendenti dalla lunghezza d'onda di eccitazione, di cui la banda più ampia si trova sempre in corrispondenza delle energie di emissione minori, mentre la banda più stretta è associata alle energie di emissioni maggiori.

L'ultimo campione sintetizzato massimizzando i parametri di processo (temperatura e tempo di reazione pari a 200°C e 16 ore, rispettivamente) non è risultato fluorescente, per cui non ne viene riportato il grafico.

3.4 Spettroscopia UV-Vis

L'ultima caratterizzazione svolta è l'analisi UV-Vis mediante lo spettrometro UV-Vis Lambda 35 di Perkin Elmer.

Questo tipo di spettroscopia si basa sulle transizioni elettroniche nel campione e serve per valutare l'assorbimento nel range di lunghezze d'onda del visibile (380-800 nm).

Andando ad analizzare i CDs in soluzione con acqua distillata si ottengono gli spettri in figura 40.

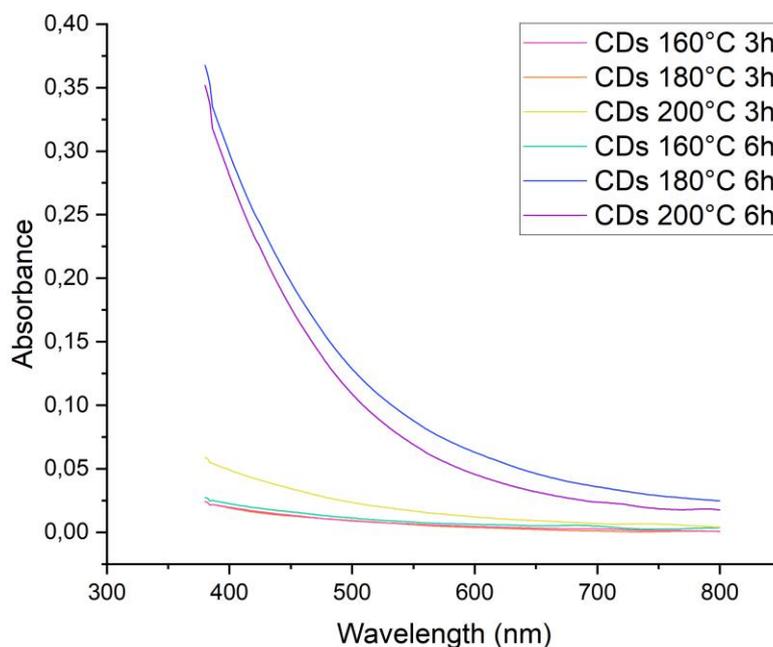


Figura 40: spettri UV-Vis dei campioni ottenuti ad esclusione del settimo lasciato reagire a 200°C per 16 ore

Dal grafico riportato sopra si può evincere che all'aumentare dei parametri del processo di sintesi (temperatura e tempo di reazione) aumenta anche l'assorbimento dei campioni.

Lo scopo finale di questo lavoro di tesi è dimostrare la funzione antiossidante delle nanoparticelle ottenute. Pertanto, si eseguono delle analisi mediante lo spettrometro UV-Vis in cui si valuta la degradazione di un colorante fragile (colorante rosso estratto di cocciniglia naturale) sotto irraggiamento UV, in assenza e in presenza dei CDs.

Il colorante rosso utilizzato deve essere fragile perché si vuole operare in una condizione in cui la degradazione dello stesso avviene con facilità, al fine di valutare l'efficacia dei CDs

nel favorirne la preservazione e quindi di verificare la loro funzione antiossidante. La fragilità del colorante rosso si può osservare dalla sua struttura, che risulta simile a quella dell'acido carminico (E120) in figura 41, ottenuto dall'estratto di cocciniglia trattato con un sale: sono presenti molte parti che si ossidano facilmente (C=O), favorendo la degradazione del colorante.

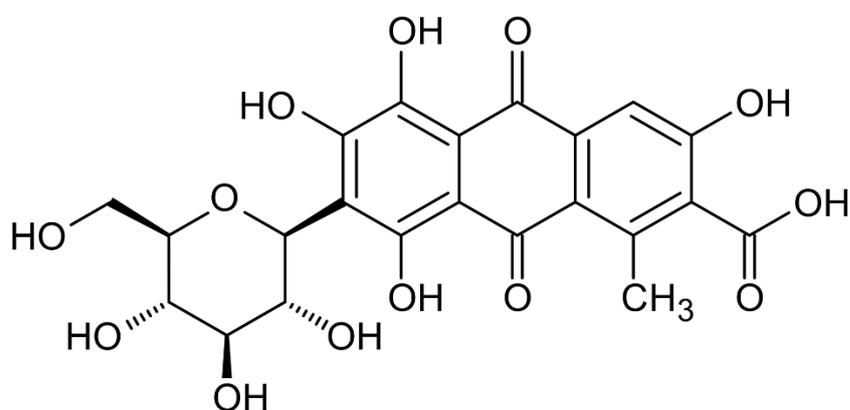


Figura 41: struttura dell'acido carminico (E120) [fonte: Google]

Detto ciò, è necessario procedere con la costruzione della retta di calibrazione del colorante prima di sottoporlo ai raggi UV e per farlo occorre fare una premessa sullo strumento.

Con lo spettrometro UV-Vis si raccolgono degli spettri in assorbanza, i quali sono gli spettri della radiazione che non passa oltre il campione e che quindi viene assorbita da esso. L'intensità di radiazione assorbita è chiamata assorbanza ed è regolata dalla legge di Lambert Beer per soluzioni poco concentrate. La legge di Lambert Beer si scrive come segue:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

dove A è l'assorbanza che assume valori compresi tra 0 e 1; c è la concentrazione della soluzione campione in mg/mL; l è il cammino ottico misurato in centimetri (in questo caso lo spessore della cuvetta è pari a 1 cm) e ε è il coefficiente di estinzione molare [36].

Per valutare la concentrazione dell'assorbanza, si costruisce un grafico assorbanza-concentrazione e si ricava una retta il cui coefficiente angolare m è il coefficiente di estinzione molare ε per il cammino ottico l. Poiché il cammino ottico l è pari 1 cm, il coefficiente angolare m è uguale al solo coefficiente di estinzione molare ε .

Per costruire la retta di calibrazione del colorante non irraggiato si acquisiscono gli spettri di quattro soluzioni di acqua e colorante con quattro concentrazioni via via più diluite

(denominate C1, C2, C3 e C4 nel capitolo 2). Si analizzano allo spettrometro UV/vis e si considera il picco di assorbimento per ognuna di esse. La retta di calibrazione si costruisce mettendo sull'asse orizzontale le concentrazioni in mg/mL e sull'asse verticale i picchi di assorbimento trovati.

Tabella 5: picchi di assorbimento relativi alle soluzioni di acqua e colorante via via più diluite utili alla costruzione della retta di calibrazione del colorante non irradiato

Soluzione	Concentrazione [mg/mL]	Picco di assorbimento
C1	0.01000	0.08799
C2	0.00500	0.04489
C3	0.00250	0.02316
C4	0.00125	0.0151

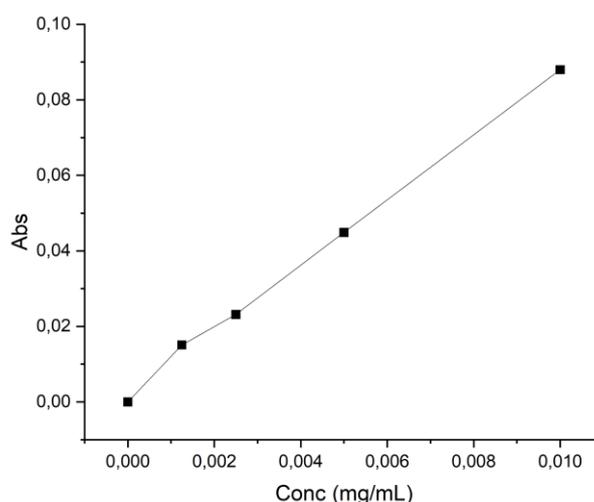


Figura 42: retta di calibrazione del colorante rosso non irradiato

La retta di calibrazione in figura 42 serve per capire quanto è stato degradato il colorante dopo l'irraggiamento UV per tempi differenti. Pertanto, si procede analizzando le soluzioni precedentemente irraggiate con lampada UV per 10, 20 e 30 minuti (chiamate S1, S2 e S3 nel capitolo 2). Si confrontano gli spettri ottenuti con la retta di calibrazione del colorante non irraggiato e si osserva quanto è diminuito il massimo di assorbimento per stabilire quanto l'irraggiamento UV li ha degradati. Dall'analisi dei tre campioni S1, S2 e S3 (tutti alla concentrazione di 0.01 mg/mL) si ottengono rispettivamente i tre picchi di assorbimento: 0.07988, 0.07382 e 0.06465 (tabella 6).

Tabella 6: valori dei picchi di assorbimento relativi alle soluzioni di acqua e colorante sottoposte a irraggiamento UV per tempi differenti utili alla scelta del tempo di irraggiamento che causa una maggiore degradazione del colorante rosso

Soluzione	Tempo di irraggiamento UV [min]	Picco di assorbimento
S1	10	0.07988
S2	20	0.07382
S3	30	0.06465

Essendo il picco di S3 più basso, si sceglie di irradiare i campioni di colorante con CDs per il tempo corrispondente, ovvero 30 minuti. Si fa questa scelta perché i valori dei picchi indicano che irradiando per un tempo più lungo l'assorbimento diminuisce maggiormente, quindi il colorante si degrada di più. In questo esperimento si cerca di creare le condizioni peggiori per il colorante, perché si vuole valutare la capacità dei CDs di preservarlo, ovvero la loro funzione antiossidante. In figura 43, si può notare un calo del picco di assorbimento della soluzione di colorante da 0.08799 a 0.06465 post-irraggiamento.

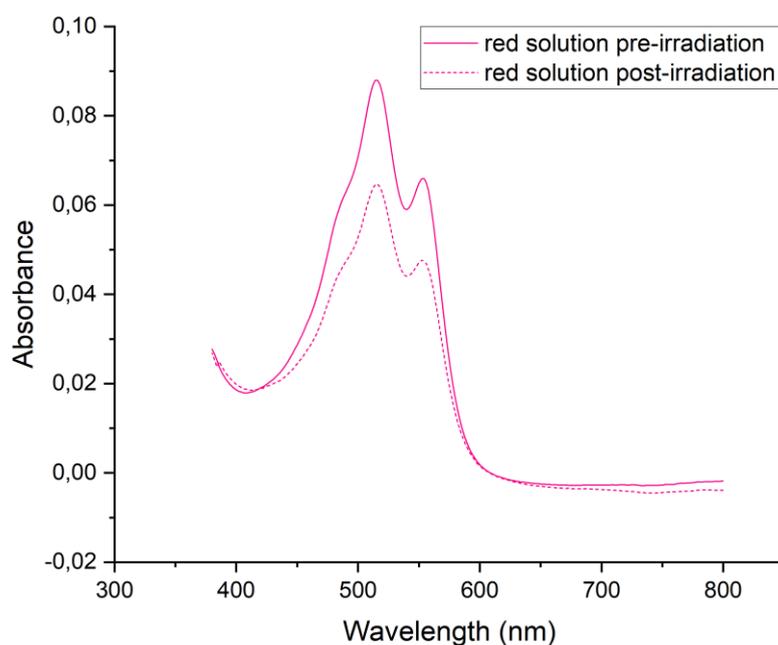


Figura 43: degradazione del colorante rosso estratto di cocciniglia dopo l'esposizione a raggi UV per trenta minuti. Questo colorante è più fragile rispetto ad altri tipi di coloranti e viene scelto in questo lavoro di tesi perché serve per svolgere uno studio sulla sua preservazione mediante CDs.

Pertanto, si procede analizzando i campioni costituiti da soluzione di acqua distillata e colorante con aggiunta di CDs pre-irraggiamento e post-irraggiamento. Poiché gli spettri delle soluzioni con CDs irradiate hanno picco simile (quasi invariato) rispetto agli spettri delle soluzioni con CDs non irradiate, significa che i CDs riescono a sopprimere le ROS: i gruppi zolfo dei CDs reagiscono con le specie reattive e il resto del composto mantiene le stesse proprietà di assorbimento. A seguire si riportano gli spettri UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento della soluzione di colorante rosso unita ad ogni campione di CDs (figure da 44 a 50).

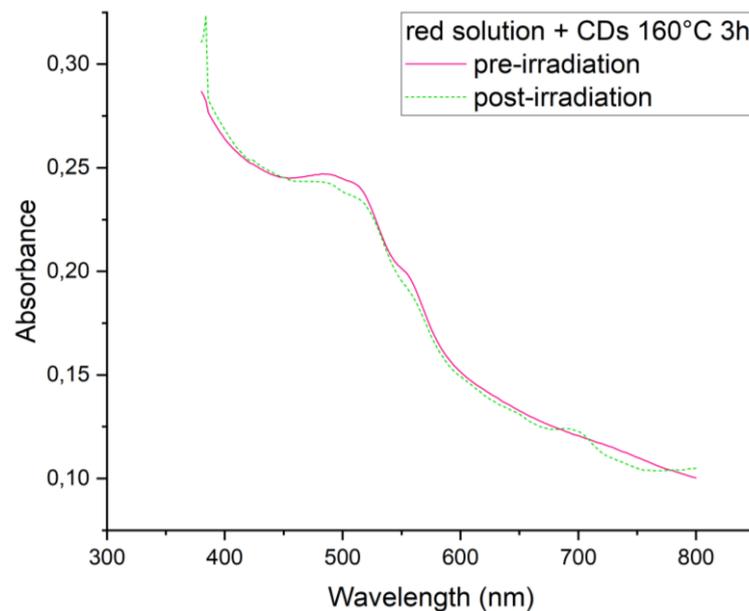


Figura 44: confronto spettri UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento della soluzione di colorante rosso unita ai CDs sintetizzati a 160°C per 3 ore

Nel grafico riportato in figura 44, si può osservare che il massimo dell'assorbanza in corrispondenza di 520 nm raggiunge quasi 0.24 circa sia per la soluzione campione non irraggiata sia per la soluzione campione irraggiata.

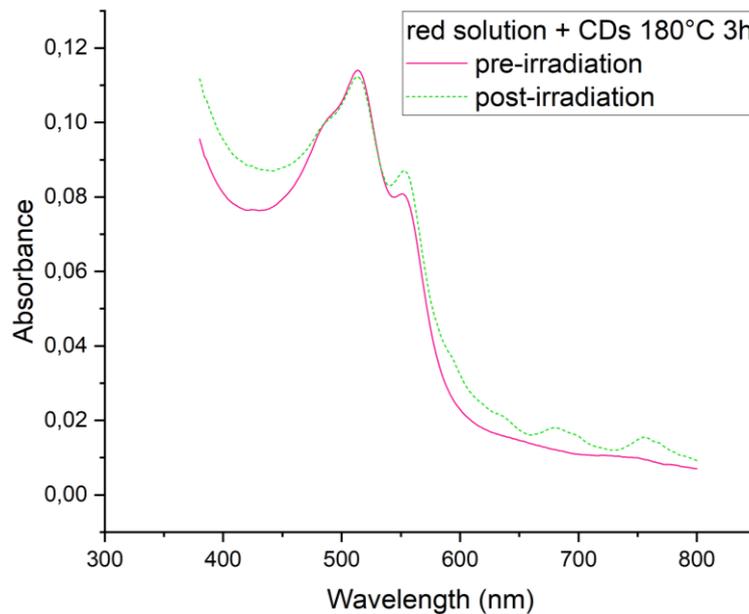


Figura 45: confronto spettri UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento della soluzione di colorante rosso unita ai CDs sintetizzati a 180°C per 3 ore.

In figura 45 il picco dell'assorbanza dimezza rispetto al caso precedente di figura 44 e resta verosimilmente invariato in entrambe le condizioni di soluzione campione non irraggiata e irraggiata.

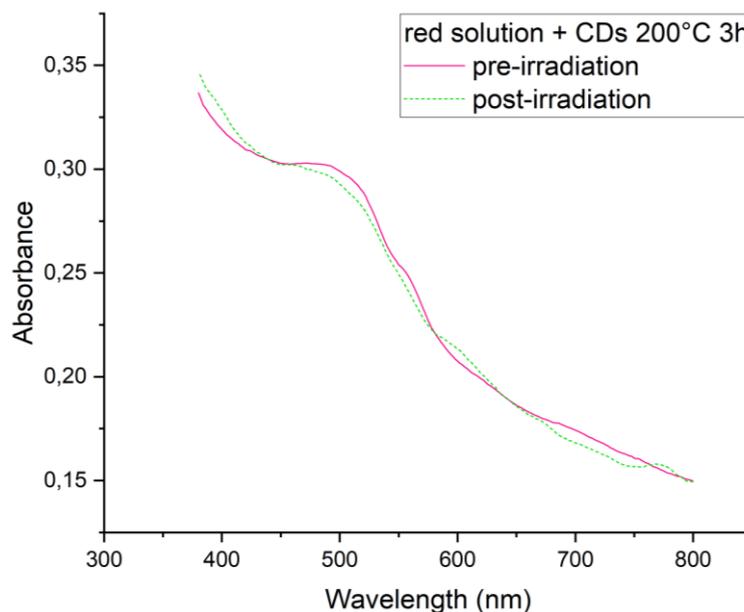


Figura 46: confronto spettri UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento della soluzione di colorante rosso unita ai CDs sintetizzati a 200°C per 3 ore.

Nel caso riportato in figura 46 il picco dell'assorbanza aumenta rispetto ai due casi precedenti fino a circa 0.3. Anche qui non si apprezza una differenza rilevante tra soluzione campione prima e dopo il trattamento ai raggi UV per trenta minuti.

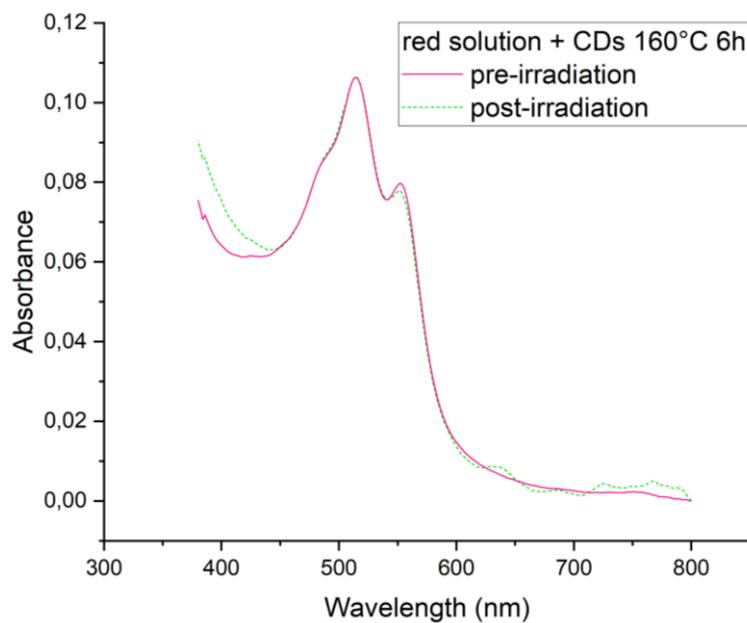


Figura 47: confronto spettri UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento della soluzione di colorante rosso unita ai CDs sintetizzati a 160°C per 6 ore.

Nella figura 47 riportata sopra si osserva che il picco resta basso ed è compreso tra 0.11 e 0.13.

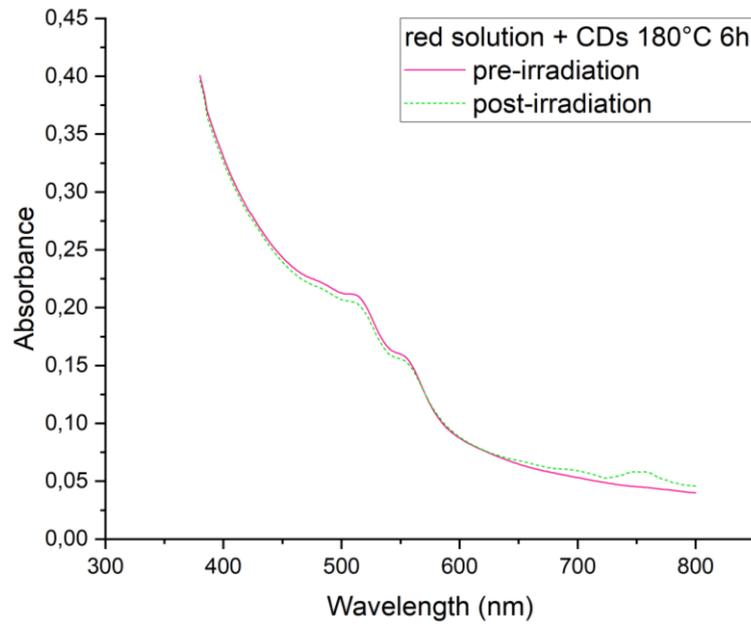


Figura 48: confronto spettri UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento della soluzione di colorante rosso unita ai CDs sintetizzati a 180°C per 6 ore

Nel grafico in figura 48 si può vedere che il picco dell'assorbanza torna a salire fino a circa 0.2. Anche qui non c'è differenza tra le condizioni di pre-irraggiamento e post-irraggiamento.

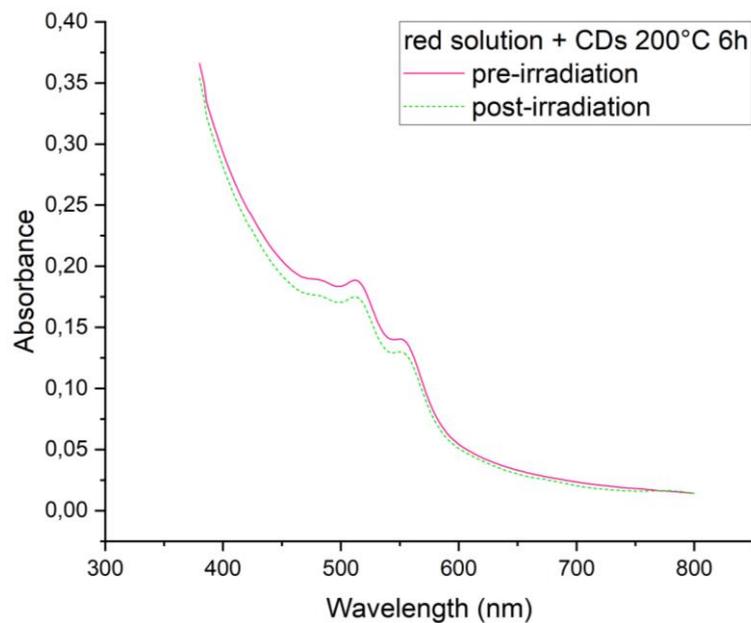


Figura 49: confronto spettri UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento della soluzione di colorante rosso unita ai CDs sintetizzati a 200°C per 6 ore

Per il grafico in figura 49 può essere fatto lo stesso discorso del campione precedente (figura 48). Infatti, il picco si assesta a 0.2 circa.

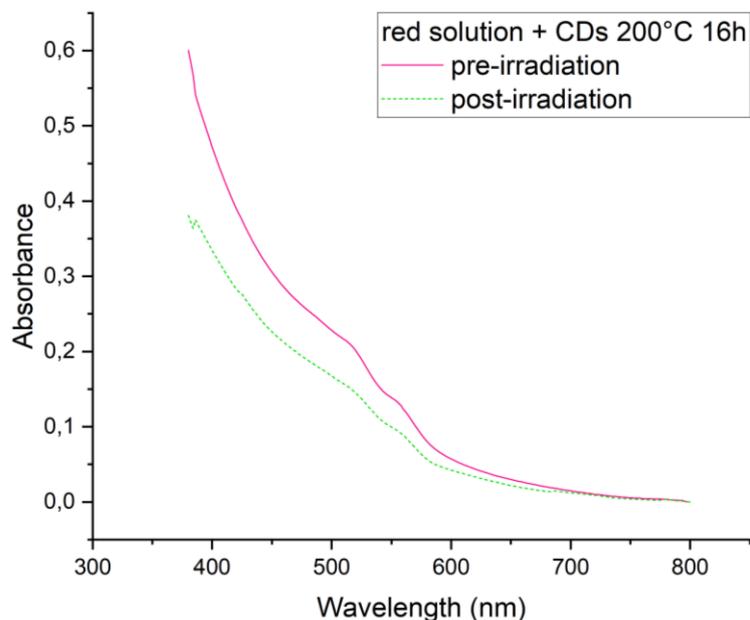


Figura 50: confronto spettri UV-Vis pre-irraggiamento e post-irraggiamento della soluzione di colorante rosso unita ai CDs sintetizzati a 200°C per 16 ore

In quest'ultimo caso (figura 50) il picco dell'assorbanza in condizioni di post-irraggiamento risulta leggermente inferiore a quello in condizioni di pre-irraggiamento.

Complessivamente, nei grafici sopra riportati si può osservare la somiglianza degli spettri nei due casi di analisi pre-irraggiamento e post-irraggiamento. Per ogni campione il picco di assorbimento risulta quasi invariato dopo l'irraggiamento UV grazie all'azione antiossidante dei CDs aggiunti alla soluzione di colorante.

CONCLUSIONI

In questa esperienza di laboratorio sono state prodotte e caratterizzate delle nanoparticelle fluorescenti di grande interesse in vari ambiti applicativi a partire da un precursore, l'aglio, noto per le sue proprietà antiossidanti.

In particolare, sono stati ricavati dei CDs di tipo polimerico mediante un approccio di sintesi top-down, che prevede la reazione di aglio e acqua in autoclave riscaldato a diverse temperature (160°C, 180°C e 200°C) per vari tempi di reazione (3 ore, 6 ore e 16 ore). Con la modulazione di questi due parametri di processo, si è ottenuta una libreria di composti differenti da analizzare mediante varie tecniche di caratterizzazione: spettroscopia IR, spettroscopia Raman, fluorimetria e spettroscopia UV-Vis.

Le analisi effettuate con lo spettrometro IR mostrano una presenza massiccia di stretching OH che rimandano alla struttura linocellulosica del precursore. Inoltre, viene valutato il grado di aromatizzazione dei campioni utilizzando come parametro il rapporto tra i legami C=C, che si riferiscono alla presenza di domini aromatici, e i legami CH, che sono invece saturi. Da questa analisi emerge che il campione in cui si sono formati più domini aromatici è quello sintetizzato a 200°C per circa sei ore. Le parti grafitiche di questi CDs non si presentano come strutture estese, bensì come strutture condensate, create con la condensazione di vapori sotto pressione nella sintesi idrotermale.

La caratterizzazione effettuata mediante microscopio Raman non è apprezzabile, in quanto i picchi D e G solitamente visibili al Raman risultano totalmente coperti dal rumore dovuto all'elevata fotoluminescenza dei campioni.

Alla luce dei risultati ottenuti tramite spettroscopia Raman e spettroscopia IR si può affermare che i CDs prodotti sono di tipo polimerico.

Dalle analisi svolte mediante fluorimetro emerge che i campioni analizzati in soluzione acquosa hanno emissione di fluorescenza nel blu. Un campione (160°C 6h) presenta due bande energetiche, di cui una più ampia e dipendente dall'eccitazione situata in corrispondenza delle energie di emissione maggiori e una più stretta e indipendente dall'eccitazione posta a energie di emissione inferiori. Poi ci sono due campioni (160°C 3h, 200°C 3h) caratterizzati da tre bande energetiche, due delle quali dipendenti dall'eccitazione e una indipendente

dall'eccitazione associata ad energie di emissione più basse. Infine, si distinguono tre campioni (180°C 3h, 180°C 6h, 200°C 6h) con cinque bande indipendenti dalla lunghezza d'onda di eccitazione, delle quali quella associata a energie di emissione inferiori è più ampia. Per ogni analisi, la lunghezza d'onda di eccitazione viene fatta variare da 280 nm a 340 nm con incrementi a passi di 10 nm. Oltre i 340 nm non si riscontra un'emissione significativa, perciò non si riportano i grafici relativi a lunghezze d'onda di eccitazione maggiori. Dell'ultimo campione prodotto a 200°C per 16 ore non si rileva alcuna emissione in fluorescenza.

L'ultima caratterizzazione svolta mediante spettrometro UV-Vis è quella più rilevante ai fini del lavoro di tesi perché mira a dimostrare il ruolo antiossidante dei CDs. In primo luogo, si ricavano gli spettri di assorbimento dei campioni in soluzione acquosa e si osserva come l'assorbimento aumenti all'aumentare dei parametri di processo (temperatura e tempo di reazione). Successivamente si costituiscono sette soluzioni con acqua distillata e colorante rosso estratto di cocciniglia e si effettua un confronto tra gli spettri di assorbimento delle soluzioni campione prima di sottoporle ad irraggiamento UV e dopo averle irradiate mediante un sistema rudimentale composto da una lampada UV, al fine di andare a valutare eventuali spostamenti tra i picchi di assorbimento nelle due condizioni studiate. Dai grafici ottenuti emerge che i picchi di assorbimento rimangono invariati a seguito dell'irraggiamento UV, questo significa che i CDs svolgono la loro funzione antiossidante, preservando il colorante, pur avendo lavorato nelle condizioni peggiori per la sua conservazione (irraggiamento dei campioni per 30 minuti).

Con quest'ultima prova viene dimostrata l'efficacia delle nanoparticelle prodotte nel combattere le specie reattive all'ossigeno che vengono a formarsi in seguito all'irraggiamento UV di una soluzione di un colorante piuttosto fragile. Potrebbe essere interessante andare a studiare più a fondo la funzione antiossidante di questi CDs mediante prove su altri tipi di materiale, allo scopo di trovare una possibile soluzione contro gli effetti negativi dello stress ossidativo che stanno alla base di molte patologie umane.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare profondamente tutte le persone che mi hanno sostenuta durante la stesura di questa tesi, senza il loro prezioso contributo e sostegno, la realizzazione di questo lavoro sarebbe stata molto più difficile.

In primo luogo, vorrei esprimere la mia gratitudine al mio relatore Alberto Tagliaferro e il mio correlatore Mattia Bartoli per la loro guida costante e il loro supporto durante questa esperienza molto stimolante. La loro competenza e la loro esperienza sono state fondamentali per la realizzazione di questo lavoro.

Inoltre, vorrei ringraziare la mia famiglia e i miei amici per avermi sempre incoraggiata e supportata. Il loro affetto e la loro presenza costante mi hanno dato la forza e la motivazione necessarie per portare a termine questo progetto. Grazie a voi, sono riuscita ad affrontare anche i momenti più difficili con determinazione.

Grazie di cuore a tutti voi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Giordano, Marco Giuseppe; Seganti, Giulia; Bartoli, Mattia; Tagliaferro, Alberto (2023). *An overview on carbon quantum dots optical and chemical features*. *Molecules*
- [2] Xu, Xiaoyou; Ray, Robert; Gu, Yunlong; Ploehn, Harry J.; Gearheart, Latha; Raker, Kyle; Scrivens, Walter A. (2004). *Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments*. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), 12736–12737. doi:10.1021/ja040082h
- [3] Sun, Ya-Ping; Zhou, Bing; Lin, Yi; Wang, Wei; Fernando, K. A. Shiral; Pathak, Pankaj; Mezirani, Mohammed Jaouad; Harruff, Barbara A.; Wang, Xin; Wang, Haifang (2006). *Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence*. , 128(24), 7756–7757. doi:10.1021/ja062677d
- [4] Liu, Junjun; Li, Rui; Yang, Bai (2020). *Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications*. *ACS Central Science*, 6(12), 2179–2195. doi:10.1021/acscentsci.0c01306
- [5] Dengyu Pan; Jingchun Zhang; Zhen Li; Minghong Wu (2010). *Hydrothermal Route for Cutting Graphene Sheets into Blue-Luminescent Graphene Quantum Dots*. , 22(6), 734–738. doi:10.1002/adma.200902825
- [6] Zheng, Xin Ting; Ananthanarayanan, Arundithi; Luo, Kathy Qian; Chen, Peng (2015). *Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications*. *Small*, 11(14), 1620–1636. doi:10.1002/smll.201402648
- [7] Liu, Yanhong; Huang, Hui, Cao, Weijing; Mao, Baodong; Liu, Yang; Kang, Zhenhui (2020). *Advances in carbon dots: from the perspective of traditional quantum dots*. DOI: 10.1039/D0QM00090F (Review Article) *Mater. Chem. Front.*, 2020, 4, 1586-1613
- [8] Ahirwar, Ranjana Choudhary; Mehra, Swati; Reddy, Sanjeev Machindra; Alshamsi, Hassan Abbas; Kadhem, Aseel A.; Karmankar, Smita Badur; Sharma, Alka; Poushali (2023). *Progression of Quantum Dots Confined Polymeric Systems for Sensorics*. 15(2), 405; <https://doi.org/10.3390/polym15020405>
- [9] Dr. Sheila N. Baker; Dr. Gary A. Baker (2010). *Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights*. , 49(38), 6726–6744. doi:10.1002/anie.200906623

[10] Shen, Jianhua; Zhu, Yihua; Yang, Xiaoling; Li, Chunzhong (2012). *Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices*. *Chemical Communications*, 48(31), 3686–. doi:10.1039/C2CC00110A

[11] Deng, Jianhui; Lu, Qiuju; Mi, Naxiu; Li, Haitao; Liu, Meiling; Xu, Mancai; Tan, Liang; Xie, Qingji; Zhang, Youyu; Yao, Shouzhuo (2014). *Electrochemical Synthesis of Carbon Nanodots Directly from Alcohols*. *Chemistry - A European Journal*, 20(17), 4993–4999. doi:10.1002/chem.201304869

[12] Xu, Minghan; He, Guili; Li, Zhaohui; He, Fengjiao; Gao, Feng; Su, Yanjie; Zhang, Liying; Yang, Zhi; Zhang, Yafei (2014). *A green heterogeneous synthesis of N-doped carbon dots and their photoluminescence applications in solid and aqueous states*. *Nanoscale*, 6(17), 10307–. doi:10.1039/C4NR02792B

[13] Jiang, Kai; Sun, Shan; Zhang, Ling; Lu, Yue; Wu, Aiguo; Cai, Congzhong; Lin, Hengwei (2015). *Red, Green, and Blue Luminescence by Carbon Dots: Full-Color Emission Tuning and Multicolor Cellular Imaging*. *Angewandte Chemie*, 127(18), 5450–5453. doi:10.1002/ange.201501193

[14] Kim, Sung; Hwang, Sung Won; Kim, Min-Kook; Shin, Dong Yeol; Shin, Dong Hee; Kim, Chang Oh; Yang, Seung Bum; Park, Jae Hee; Hwang, Euyheon; Choi, Suk-Ho; Ko, Geunwoo; Sim, Sunghyun; Sone, Cheolsoo; Choi, Hyoung Joon; Bae, Sukang; Hong, Byung Hee (2012). *Anomalous Behaviors of Visible Luminescence from Graphene Quantum Dots: Interplay between Size and Shape*. *ACS Nano*, 6(9), 8203–8208. doi:10.1021/nn302878r

[15] Ding, Hui; Yu, Shang-Bo; Wei, Ji-Shi; Xiong, Huan-Ming (2015). *Full-Color Light-Emitting Carbon Dots with a Surface-State-Controlled Luminescence Mechanism*. *ACS Nano*, (), acsnano.5b05406–. doi:10.1021/acsnano.5b05406

[16] Li, Li-ping; Ren, Xiao-feng; Bai, Pei-rong; Liu, Yan; Xu, Wei-yue; Xie, Jun; Zhang, Rui-ping (2021). *Near-infrared emission carbon dots for bio-imaging applications*. *New Carbon Materials*, 2021, 36(3): 632-638

[17] Li, Di; Jing, Pengtao; Sun, Lihuan; An, Yang; Shan, Xinyan; Lu, Xinghua; Zhou, Ding; Han, Dong; Shen, Dezhen; Zhai, Yuechen; Qu, Songnan; Zbořil, Radek; Rogach, Andrey L. (2018). *Near-Infrared Excitation/Emission and Multiphoton-Induced Fluorescence of Carbon Dots*. *Advanced Materials*, (), 1705913–. doi:10.1002/adma.201705913

[18] Huo, Feng; Karmaker, Pran Gopal; Liu, Yuhang; Zhao, Bin; Yang, Xiupei (2020). *Preparation and Biomedical Applications of Multicolor Carbon Dots: Recent Advances and Future Challenges*. *Particle & Particle Systems Characterization*, (), 1900489–. doi:10.1002/ppsc.201900489

- [19] Chen, Jiancang; Xiao, Guangchun; Duan, Gaigai; Wu, Yongzhong; Zhao, Xiujian; Gong, Xiao (2020). *Structural design of carbon dots/porous materials composites and their applications*. *Chemical Engineering Journal*, (), 127743–. doi:10.1016/j.cej.2020.127743
- [20] Zuo, Pengli; Lu, Xiuhua; Sun, Zhigang; Guo, Yuhan; He, Hua (2016). *A review on syntheses, properties, characterization and bioanalytical applications of fluorescent carbon dots*. *Microchimica Acta*, 183(2), 519–542. doi:10.1007/s00604-015-1705-3
- [21] wu, zhu lian; Llu, Ze Xi; Yuan, Yun Huan (2017). *Carbon dots : materials, synthesis, properties and approaches to long-wavelength and multicolor emission*. *J. Mater. Chem. B*, (), 10.1039.C7TB00363C–. doi:10.1039/C7TB00363C
- [22] Zhu, Shoujun; Song, Yubin; Zhao, Xiaohuan; Shao, Jieren; Zhang, Junhu; Yang, Bai (2015). *The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective*. *Nano Research*, 8(2), 355–381. doi:10.1007/s12274-014-0644-3
- [23] Xia, Chunlei; Zhu, Shoujun; Feng, Tanglue; Yang, Mingxi; Yang, Bai (2019). *Evolution and Synthesis of Carbon Dots: From Carbon Dots to Carbonized Polymer Dots*. *Advanced Science*, (), 1901316–. doi:10.1002/advs.201901316
- [24] Kang, Chao; Huang, Ying; Yang, Hui; Yan, Xiu Fang; Chen, Zeng Ping (2020). *A Review of Carbon Dots Produced from Biomass Wastes*. *Nanomaterials*, 10(11), 2316–. doi:10.3390/nano10112316
- [25] Meng, Weixue; Bai, Xue; Wang, Boyang; Liu, Zhongyi; Lu, Siyu; Yang, Bai (2019). *Biomass-Derived Carbon Dots and Their Applications*. *ENERGY & ENVIRONMENTAL MATERIALS*, (), eem2.12038–. doi:10.1002/eem2.12038
- [26] Jiaojiao Zhou; Zonghai Sheng; Heyou Han; Mingqiang Zou; Chenxu Li (2012). *Facile synthesis of fluorescent carbon dots using watermelon peel as a carbon source*. , 66(1), 222–224. doi:10.1016/j.matlet.2011.08.081
- [27] Sachdev, Abhay; Gopinath, P. (2015). *Green synthesis of multifunctional carbon dots from coriander leaves and their potential application as antioxidants, sensors and bioimaging agents*. *The Analyst*, 140(12), 4260–4269. doi:10.1039/C5AN00454C
- [28] Zhao, Shaojing; Lan, Minhuan; Zhu, Xiaoyue; Xue, Hongtao; Ng, Tsz-Wai; Meng, Xiangmin; Lee, Chun-Sing; Wang, Pengfei; Zhang, Wenjun (2015). *Green Synthesis of Bifunctional Fluorescent Carbon Dots from Garlic for Cellular Imaging and Free Radical Scavenging*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (), 150730163040008–. doi:10.1021/acsami.5b03228

[29] Zhou, Yiqun; Kandel, Nabin; Bartoli, Mattia; Serafim, Leonardo F.; ElMetwally, Ahmed E.; Falkenberg, Sophia M.; Paredes, Xavier E.; Nelson, Christopher J.; Smith, Nathan; Padovano, Elisa; Zhang, Wei; Mintz, Keenan J.; Ferreira, Braulio C.L.B.; Cilingir, Emel Kirbas Cilingir; Chen, Jiuyan; Shah, Sujit K.; Prabhakar, Rajeev; Tagliaferro, Alberto; Wang, Chunyu; Leblanc, Roger M. (2022). *Structure-activity relationship of carbon nitride dots in inhibiting Tau aggregation*. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.03.021>

[30] Zhou, Yiqun; Liyanage, Piumi Y.; Devadoss, Dinesh; Rios Guevara, Linda Rebeca; Cheng, Ling; Graham, Regina M.; Chand, Hitendra S.; Al-Youbi, Abdulrahman O.; Bashammakh, Abdulaziz S.; El-Shahawi, Mohammad S.; Leblanc, Roger M. (2019). *Nontoxic amphiphilic carbon dots as promising drug nanocarriers across the blood–brain barrier and inhibitors of β -amyloid*. *Nanoscale*, 11(46), 22387–22397. doi:10.1039/c9nr08194a

[31] Chen, Jing; Li, Shuya; Zhang, Ye; Wang, Wei; Zhang, Xiang; Zhao, Yangyang; Wang, Yucai; Bi, Hong (2017). *A Reloadable Self-Healing Hydrogel Enabling Diffusive Transport of C-Dots Across Gel-Gel Interface for Scavenging Reactive Oxygen Species*. *Advanced Healthcare Materials*, (), 1700746–. doi:10.1002/adhm.201700746

[32] El-Saber Batiha, Gaber; Magdy Beshbishy, Amany; G. Wasef, Lamiaa; Elewa, Yaser H. A.; A. Al-Sagan, Ahmed; Abd El-Hack, Mohamed E.; Taha, Ayman E.; M. Abd-Elhakim, Yasmina; Prasad Devkota, Hari (2020). *Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review*. *Nutrients*, 12(3), 872–. doi:10.3390/nu12030872

[33] Tsubura, Airo; Lai, Yen-Chang; Kuwata, Maki; Uehara, Norihisa; Yoshizawa, Katsuhiko (2011). *Anticancer Effects of Garlic and Garlic-derived Compounds for Breast Cancer Control*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(3), 249–253. doi:10.2174/187152011795347441

[34] Wen, Su-Ying; Tsai, Cheng-Yen; Pai, Pei-Ying; Chen, Yi-Wei; Yang, Yao-Chih; Aneja, Ritu; Huang, Chih-Yang; Kuo, Wei-Wen (2017). *Diallyl trisulfide suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting MAPK/NF- κ B signaling through attenuation of ROS generation*. *Environmental Toxicology*, (), –. doi:10.1002/tox.22500

[35] Mathew, B.C.; Biju, R.S. (2008). *Neuroprotective Effects of Garlic A Review*. *Libyan Journal of Medicine*, 3(1), 23–33. doi:10.3402/ljm.v3i1.4747

[36] Măntele, Werner; Deniz, Erhan (2016). *UV-VIS Absorption Spectroscopy: Lambert-Beer reloaded*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (), S1386142516305558–. doi:10.1016/j.saa.2016.09.037