

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**Politecnico  
di Torino**

Tesi di Laurea Magistrale

Sintesi e funzionalizzazione di nanoparticelle d'argento per la  
determinazione delle proteine totali tramite saggi basati su  
rilevazione ottica

Relatore

Prof.re Alessandro Chiadò

Correlatore

Prof.ssa Chiara Novara

Prof.re Fabrizio Giorgis

Candidato

Gabriella Caputo

Anno Accademico 2025-202

# Abstract

I nanomateriali, ed in particolare le nanoparticelle d'argento (AgNP), hanno ricevuto notevole attenzione negli ultimi decenni, per le proprietà catalitiche, ottiche, elettroniche e magnetiche sfruttabili in diversi ambiti applicativi, tra cui le applicazioni nanotecnologiche in ambito biomedico. Tra le caratteristiche più interessanti delle AgNP si hanno un elevato rapporto superficie/volume e le peculiari proprietà ottiche derivanti dalla capacità di supportare delle Risonanze Plasmoniche di Superficie Localizzate. Le NP di Ag, inoltre, si possono sintetizzare e funzionalizzare con metodi chimici semplici ed economici. Morfologia, dimensione e stabilità chimica dei colloidi ottenuti dipendono fortemente dalle condizioni di sintesi. Questa può avvenire sfruttando vari metodi, ma la riduzione mediante l'utilizzo di acido ascorbico e sodio citrato rappresenta una valida alternativa ai classici metodi fisici. Questo metodo chimico porta alla formazione di AgNP quasi sferiche con morfologia e diametri variabili fortemente dipendenti da pH, temperatura, tempo di reazione e concentrazione dei reagenti.

Il lavoro di questa tesi è focalizzato sulla sintesi delle AgNP e sulla loro applicazione nello sviluppo di un saggio colorimetrico per la determinazione delle proteine totali. Inizialmente è stata valutata l'influenza dei principali parametri di sintesi, quali temperatura, pH e tempo di reazione, individuando come condizioni ottimali un pH di 11,5, una temperatura di 30 °C e un tempo di reazione di 5 minuti. In tali condizioni, le caratterizzazioni mediante spettroscopia UV-Vis e microscopia elettronica rivelano la formazione di nanoparticelle prevalentemente sferiche da 30 nm, con una distribuzione dimensionale relativamente uniforme e da una buona stabilità colloidale. I diametri sono stati stimati direttamente dalle immagini acquisite e tramite un algoritmo Matlab sviluppato nel corso della tesi. I valori ottenuti sono stati confrontati anche con la misura tramite DLS.

In seguito, le nanoparticelle sono state impiegate per lo sviluppo di un saggio colorimetrico finalizzato alla determinazione delle proteine totali. Tale saggio sfrutta la variazione di colore del colloide determinata dall'aggregazione delle AgNP in presenza di NaCl, dipendente dalla concentrazione proteica. Le AgNP sono infatti incubate con concentrazioni crescenti di BSA (albumina siero bovina), proteina modello in molti studi, la quale induce la formazione di una corona proteica attorno alle stesse, che le protegge dall'aggregazione. Al fine di individuare le condizioni sperimentali ottimali, il saggio è stato condotto su AgNP di varia morfologia valutando come il tempo di incubazione e la forza ionica influenzassero la formazione della corona proteica, l'aggregazione e il colore misurato. Da tale studio emerge come l'uso di nanoparticelle con diametro pari a 30 nm preparate a pH alcalino permetta la determinazione delle proteine nel range 0 – 83 µg/mL.

Successivamente, per cercare di migliorare la sensibilità del saggio, la caratterizzazione è avvenuta mediante spettroscopia Raman in regime amplificato (SERS). La funzionalizzazione delle NP con acido 4-mercaptobenzoico (MBA) permette di introdurre nel sistema collodiale una molecola sonda, il cui segnale SERS noto viene amplificato in modo inversamente proporzionale alla concentrazione di proteine. Grazie alla combinazione del saggio con l'analisi SERS, è stato possibile rilevare la BSA in un range di concentrazione inferiore rispetto alla rivelazione colorimetrica.



# INDICE

|                                                                                                                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Elenco delle tabelle .....                                                                                                                                                   | VI        |
| Elenco delle figure .....                                                                                                                                                    | VII       |
| Acronimi .....                                                                                                                                                               | XI        |
| <b>1 Introduzione</b> .....                                                                                                                                                  | <b>1</b>  |
| 1.1 Nanoparticelle metalliche .....                                                                                                                                          | 1         |
| 1.2 Nanoparticelle di argento (AgNP) .....                                                                                                                                   | 6         |
| 1.2.1 Proprietà fisico-chimiche .....                                                                                                                                        | 7         |
| 1.2.2 Metodi di sintesi .....                                                                                                                                                | 11        |
| 1.3 Stabilità colloidale e fenomeni di aggregazione nelle nanoparticelle metalliche .....                                                                                    | 13        |
| 1.3.1 Influenza dei parametri termodinamici e cinetici sulla morfologia delle nanoparticelle .....                                                                           | 14        |
| 1.4 Funzionalizzazione superficiale e proprietà delle nanoparticelle d'argento .....                                                                                         | 17        |
| 1.4.1 Influenza del cloruro di sodio sulla corona proteica .....                                                                                                             | 21        |
| 1.5 Scopo del lavoro .....                                                                                                                                                   | 23        |
| <b>2 Materiali e Metodi</b> .....                                                                                                                                            | <b>26</b> |
| 2.1 Sintesi di nanoparticelle d'argento .....                                                                                                                                | 26        |
| 2.1.2 Separazione delle nanoparticelle tramite centrifugazione .....                                                                                                         | 26        |
| 2.2 Caratterizzazione .....                                                                                                                                                  | 27        |
| 2.2.1 Caratterizzazione UV-Vis .....                                                                                                                                         | 27        |
| 2.2.2 Caratterizzazione FESEM e DLS .....                                                                                                                                    | 28        |
| 2.2.3 Analisi d'immagine mediante script Matlab .....                                                                                                                        | 29        |
| 2.2.4 Calcolo delle concentrazioni e del numero di nanoparticelle .....                                                                                                      | 31        |
| 2.3 Saggio per la determinazione delle proteine .....                                                                                                                        | 32        |
| 2.3.1 Saggio colorimetrico con BSA .....                                                                                                                                     | 32        |
| 2.3.2 Analisi della concentrazione teorica e reale di BSA adsorbita sulle nanoparticelle .....                                                                               | 34        |
| 2.4 Analisi Raman .....                                                                                                                                                      | 35        |
| 2.4.1 Saggio con MBA e BSA per applicazioni Raman .....                                                                                                                      | 36        |
| 2.5 Determinazione del LOD e del LOQ .....                                                                                                                                   | 37        |
| <b>3 Risultati e discussione</b> .....                                                                                                                                       | <b>40</b> |
| 3.1 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle .....                                                                                                                   | 40        |
| 3.1.1 Analisi Matlab della morfologia delle nanoparticelle .....                                                                                                             | 42        |
| 3.1.2 Effetto della variazione della temperatura sulla sintesi delle AgNP .....                                                                                              | 44        |
| 3.1.3 Effetto della variazione del pH sulla sintesi delle AgNP .....                                                                                                         | 46        |
| 3.1.4 Effetto della variazione del tempo di reazione sulla sintesi delle AgNP .....                                                                                          | 50        |
| 3.1.5 Effetto della centrifugazione .....                                                                                                                                    | 52        |
| 3.1.6 Analisi comparativa dei diametri .....                                                                                                                                 | 54        |
| 3.2 Saggio colorimetrico per la determinazione delle proteine totali .....                                                                                                   | 57        |
| 3.2.1 Adattamento del saggio colorimetrico per la misura con lettore di piastre ed effetto del volume della sospensione colloidale sull'interazione nanoparticelle–BSA ..... | 59        |
| 3.2.2 Effetto del pH sulla stabilità e interazione nanoparticelle–BSA .....                                                                                                  | 61        |
| 3.2.3 Effetto dei tempi di incubazione della BSA sulle nanoparticelle .....                                                                                                  | 65        |
| 3.2.4 Effetto del tempo di incubazione e dell'estensione del range di concentrazione di BSA sul sistema di nanoparticelle .....                                              | 67        |
| 3.2.5 Effetto della separazione delle nanoparticelle tramite centrifuga sul saggio .....                                                                                     | 69        |
| 3.2.6 Effetto di concentrazioni crescenti di NaCl sul saggio .....                                                                                                           | 70        |
| 3.2.7 Valutazione del LOD e del LOQ .....                                                                                                                                    | 73        |

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3 Analisi Raman.....                                                                          | 74        |
| 3.3.1 Analisi comparativa tra incubazione con BSA e incubazione con MBA e BSA .....             | 75        |
| 3.3.2 Ottimizzazione del saggio su range proteico inferiore e determinazione di LOD e LOQ ..... | 82        |
| <b>4 Conclusioni e sviluppi futuri .....</b>                                                    | <b>88</b> |
| Bibliografia.....                                                                               | 91        |
| Appendice.....                                                                                  | 99        |

# Elenco delle tabelle

2.1: Illustrazione dei passaggi eseguiti per la centrifugazione.

2.2: Parametri sperimentali per il calcolo della concentrazione delle nanoparticelle

2.3: Volumi dei componenti impiegati nelle procedure di saggio colorimetrico.

2.4: Determinazione della massa, delle moli e del numero di molecole di BSA per ciascuna concentrazione del saggio.

3.1: Analisi comparativa dei campioni colloidali: confronto tra le concentrazioni calcolate mediante misurate ricavate al FESEM e mediante misure ricavate dallo script Matlab.

3.2: Analisi comparativa dei campioni colloidali: confronto tra diametro medio stimato dalle immagini FESEM, diametro ottenuto da script Matlab e DLS.

3.3: Stima teorica della quantità di BSA necessaria per la saturazione superficiale delle nanoparticelle d'argento, utilizzando un diametro medio calcolato mediante immagini acquisite al FESEM.

3.4: Stima teorica della quantità di BSA necessaria per la saturazione superficiale delle nanoparticelle d'argento per il colloide a pH 7.0, utilizzando rispettivamente per DLS1 il diametro medio e per DLS2 il diametro del picco a maggior intensità.

3.5 Stima teorica della quantità di BSA necessaria per la saturazione superficiale delle nanoparticelle d'argento per il colloide a pH 11.5, utilizzando rispettivamente per DLS1 il diametro medio e per DLS2 il diametro del picco a maggior intensità.

# Elenco delle figure

- 1.1 Illustrazione dell'effetto di confinamento quantistico.
- 1.2 Schema illustrativo del principio alla base delle tecniche bottom-up e top-down.
- 1.3: Rappresentazione dell'aggregazione di nanoparticelle d'oro (AuNPs) in un aptasensore.
- 1.4 Schema illustrativo di possibili metodologie di funzionalizzazione delle nanoparticelle.
- 1.5 Spettri di nanoparticelle sferiche di argento (a) e oro (b), con dimensione compresa tra 20 e 100 nm. Relazione tra la sezione d'urto di estinzione (assorbimento + scattering) e lunghezza d'onda.
- 1.6 Esempi di spettri UV-Vis di AgNP sferiche commerciali con dimensioni differenti.
- 1.7 Esempi di spettri UV-Vis caratteristici di nanoparticelle con forma diversa.
- 1.8: Esempi di nanoparticelle con morfologie differenti.
- 1.9: Sospensioni di nanoprismi in acqua che mostrano una gamma di colorazioni delle particelle.
- 1.10: Spettri UV/Vis di una soluzione di acido ascorbico acquistati nel tempo dopo in ambiente alcalino (NaOH, pH 11), acquisiti nell'arco di 48 ore.
- 1.11: Schema illustrativo dell'energia di interazione DLVO rispetto alla distanza.
- 1.12 Spettri UV-Vis e rispettive colorazioni della soluzione colloidale di AgNP utilizzando varie concentrazioni di acido ascorbico, rispettivamente: A = 0 mM, B = 10 mM, C = 20 mM, D = 30 mM, E = 40 mM, F = 50 mM.
- 1.13 Spettri UV-Vis di soluzioni colloidale di AgNP ottenute utilizzando varie concentrazioni di nitrato d'argento, rispettivamente: A = 1,25 mM, B = 2,5 mM, C = 5 mM.
- 1.14 Sistemi biomolecola–nanoparticella: (a) adsorbimento elettrostatico; (b) chemisorzione con gruppi tiolici; (c) legame covalente attraverso linker.
- 1.15 Principio di funzionamento del saggio colorimetrico con AgNP e DNA per la rilevazione di una molecola organica (coralyne).
- 1.16 Principio di funzionamento del saggio colorimetrico pSC4–AgNP per la rilevazione del pesticida Optunal mediante aggregazione delle nanoparticelle.
- 1.17 Formazione della corona proteica: (A) Formazione soft corona, (B) Formazione hard corona (C) Fattori che influenzano il pattern della corona proteica.
- 1.18 Evoluzione temporale degli spettri di estinzione UV-Vis di una sospensione di nanoparticelle d'argento a seguito dell'aggiunta al colloide di carbonato di sodio.
- 1.19 Schema rappresentativo del sistema NP–BSA–NaCl e formazione della corona proteica.  
[Immagine generata con IA]
- 2.1: schema illustrativo funzionamento spettrofotometro.
- 2.2: schema illustrativo funzionamento del lettore di piastra.
- 2.3: schema funzionamento FESEM.
- 2.4: distribuzione dimensionale delle nanoparticelle a pH=11,5 ottenuta mediante script Matlab.
- 2.5: illustrazione schematica dell'interazione tra campione (NP) e sorgente Raman.
- 2.6: Schema rappresentativo dell'interazione tra nanoparticelle e molecole.  
[Immagine generata con IA]

- 3.1: Confronto tra gli spettri di assorbimento UV-Vis del sistema colloidale di riferimento: analisi effettuata alla sintesi ( $t = 0$ , linea nera) e dopo 24 ore ( $t = 24$  h, linea rossa). Caratterizzazione morfologica delle nanoparticelle d'argento in soluzione tramite microscopia elettronica a scansione a emissione di campo (FESEM).
- 3.2: Curve di distribuzione dimensionale ottenute tramite DLS per tre repliche del colloide a  $\text{pH}=11.5$ .
- 3.3: Immagine FESEM e relativa mappa a contrasto di colore ottenuta tramite segmentazione Watershed su nanoparticelle aggregate.
- 3.4: Immagine FESEM e relativa mappa a contrasto di colore ottenuta tramite segmentazione Watershed su nanoparticelle non aggregate.
- 3.5: Spettri di assorbimento UV-Vis in funzione della temperatura ( $20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ) e del tempo ( $t=0$  e  $t=1$  mese).
- 3.6: Caratterizzazione morfologica tramite FESEM delle nanoparticelle d'argento ottenute rispettivamente a  $20^{\circ}\text{C}$  (a),  $30^{\circ}\text{C}$  (b) e  $40^{\circ}\text{C}$  (c).
- 3.7: Nanoparticelle ottenute da sintesi a  $\text{pH}$  crescente, rispettivamente pari a 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0.
- 3.8: Spettri di assorbimento UV-Vis dei sistemi colloidali ottenuti con sintesi a diversi valori di  $\text{pH}$ .
- 3.9: Caratterizzazione morfologica tramite FESEM delle nanoparticelle d'argento ottenute rispettivamente a  $\text{pH}$  pari a 7.0 (a), 8.0 (b), 9.0 (c), 10.0 (d), 10.5 (e), 11.0 (f), 11.5 (g), 12.0 (h).
- 3.10: Spettri di assorbimento UV-Vis dei sistemi colloidali a diversi valori di tempo di reazione.
- 3.11: Caratterizzazione morfologica tramite FESEM delle nanoparticelle d'argento rispettivamente a  $t=5$  minuti (a),  $t=15$  minuti (b),  $t=30$  minuti (c).
- 3.12: Spettri di assorbimento UV-Vis dei sistemi colloidali confronto tra: tal quale, surnatante e pellet.
- 3.13: Caratterizzazione morfologica tramite FESEM delle nanoparticelle d'argento, confronto tra: tal quale (a), surnatante (b), pellet (c).
- 3.14: Confronto tra tecniche di misurazione dimensionale (FESEM, Matlab, DLS) delle nanoparticelle d'argento al variare del  $\text{pH}$ .
- 3.15: Spettri di assorbimento UV-Vis del colloide a  $\text{pH}=11.5$  in funzione del tempo: colloide istantaneamente prodotto  $t=0$  (spettro nero) e colloide misurato a  $t=6$  mesi (spettro rosso).
- 3.16: Spettri del saggio colorimetrico con BSA ottenuti mediante UV-vis. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta di NaCl a differenti concentrazioni di BSA ( $0\text{--}83\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) (a), e l'andamento del comportamento del colloide in funzione della BSA (b).
- 3.17: Confronto tra gli spettri di assorbanza ottenuti dalle miscele NP-proteina alle diverse concentrazioni di BSA dopo diluizione del campione misurati tramite spettrofotometro UV-Vis (a) o tramite lettore di piastre (b).
- 3.18: Profilo di assorbanza ottenuti in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento confronto tra: campione diluito e non. (misure effettuate allo spettrometro).
- 3.19: Profili di assorbanza in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento sintetizzate a differenti valori di  $\text{pH}$ .
- 3.20: Profili di assorbanza in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento sottoposte a diversi tempi di incubazione; confronto tra:  $\text{pH}=11.0$  (a)  $\text{pH}=11.5$  (b).
- 3.21: Effetto di diversi tempi di incubazione della BSA sul saggio colorimetrico nel range  $0\text{--}166\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

- 3.22: Profili di assorbanza in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento confronto tra: surnatante e pellet.
- 3.23: Valori di assorbanza  $\lambda_{\max}$  in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento confronto tra: pH=7.0 (a) e pH=8.0 (b).
- 3.24: Profili di assorbanza  $\lambda_{\max}$  in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento a pH=11.0.
- 3.25: Profili di assorbanza  $\lambda_{\max}$  in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento del colloide tal quale o dopo risospensione del pellet ottenuto da centrifugazione in presenza di NaCl (5 M).
- 3.26: Curva di calibrazione del saggio colorimetrico ottenuta nelle condizioni sperimentali ottimali, nel range di concentrazione della BSA compreso tra 0 e 83  $\mu\text{g/ml}$  (a) e tra 0 e 50  $\mu\text{g/ml}$  (b). La linea rossa rappresenta il fit lineare utilizzato per la determinazione del limite di rilevabilità (LOD).
- 3.27: Confronto tra gli spettri del saggio colorimetrico ottenuto con nanoparticelle d'argento incubate con sola BSA (a) o con MBA e BSA (b). Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl (5 M) a differenti concentrazioni di BSA (0–83  $\mu\text{g/ml}$ ). Lo spettro denominato CRT-NP-MBA comprende NP incubate con MBA e acqua.
- 3.28: Spettri del saggio colorimetrico con BSA e MBA  $10^{-5}$  M ottenuti con lettore di piastra. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl (5 M) a differenti concentrazioni di BSA (0–83  $\mu\text{g/ml}$ ). Lo spettro denominato controllo comprende NP incubate con MBA, BSA e acqua.
- 3.29: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\max}$  (408nm) in funzione della concentrazione di BSA del colloide a pH=11.5 e NaCl 5 M, in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.
- 3.30: Spettri SERS del colloide incubato con concentrazioni crescenti di BSA e NaCl 5 M in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl 5 M a differenti concentrazioni di BSA (0–83  $\mu\text{g/ml}$ ).
- 3.31: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\max}$  (408 nm) in funzione della concentrazione di BSA del colloide sintetizzato a pH=11.5, in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) e NaCl 1 M (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.
- 3.32: Spettri SERS del colloide incubato con concentrazioni crescenti di BSA e NaCl 1 M in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl (5 M) a differenti concentrazioni di BSA (0–83  $\mu\text{g/ml}$ ). Lo spettro denominato controllo comprende NP incubate con MBA.
- 3.33: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\max}$  (408 nm) in funzione della concentrazione di BSA, del colloide sintetizzato a pH=11.5, in presenza di MBA ( $10^{-4}$  M) e NaCl 1 M, (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.
- 3.34: Spettri SERS del colloide incubato con concentrazioni crescenti di BSA e NaCl 5 M in presenza di MBA ( $10^{-4}$  M) registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl (5 M) a differenti concentrazioni di BSA (0–83  $\mu\text{g/ml}$ ). Lo spettro denominato controllo comprende NP incubate con MBA.

3.35: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\max}$  (408 nm) in funzione della concentrazione di BSA in un range compreso tra 0 e 20.88  $\mu\text{g/ml}$ , del colloide sintetizzato a  $\text{pH}=11.5$ , in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) e NaCl 1 M, (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.

3.36: Spettri SERS del colloide incubato con MBA  $10^{-5}$  M, a concentrazioni crescenti di BSA in un range compreso tra 0 e 20.88  $\mu\text{g/ml}$  e NaCl 1 M, registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl.

3.37: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\max}$  (405 nm) in funzione della concentrazione di BSA in un range compreso tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$ , del colloide sintetizzato a  $\text{pH}=11.5$ , in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) e NaCl 1 M, (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.

3.38: Spettri SERS del colloide incubato con MBA  $10^{-5}$  M, a concentrazioni crescenti di BSA in un range compreso tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$  e NaCl 1 M, registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl.

3.39: Curve di calibrazione e fit non lineare dell'area sottesa al picco a  $1078\text{ cm}^{-1}$  per le serie con range compreso tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$  (a) e 0 e 20.88  $\mu\text{g/ml}$  (b).

# Acronimi

**AgNP**

*Nanoparticelle d'argento*

**AgNO<sub>3</sub>**

*Nitrato d'argento*

**Ag<sup>0</sup>**

*Argento elementare*

**Ag<sup>+</sup>**

*Ione argento*

**NaCl**

*Cloruro di sodio*

**NaOH**

*Idrossido di sodio*

**MBA**

*Acido 4-mercaptobenzoico*

**EtOH**

*Etanolo*

**AA**

*Acido ascorbico*

**BSA**

*Albumina sierica bovina*

**LSPR**

*Localized Surface Plasmon Resonance*

**SERS**

*Surface Enhanced Raman Scattering*

**FESEM**

*Field Emission Scanning Electron Microscopy*

**DLS**

*Dynamic Light Scattering*

**DLVO**

*Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek theory*

**FWHM**

*Full Width at Half Maximum*



# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Nanoparticelle metalliche

Con il termine nanotecnologia si fa riferimento ad un ramo della scienza e dell'ingegneria dedicato ai materiali con dimensioni nanometriche. Sebbene il termine sia associato ad una disciplina moderna, essa nacque nel 1959 con Richard P. Feynman, il quale scoprì come fosse possibile manipolare gli oggetti su scala atomica, affermando in una sua lezione *"There is plenty of room at the bottom"* ("C'è molto spazio laggiù in fondo") suggerendo come in futuro l'attenzione su oggetti nanometrici avrebbe aperto nuove prospettive alla tecnologia moderna, ponendo le basi teoriche per lo sviluppo della nanotecnologia odierna [1].

Elementi fondamentali in nanotecnologia sono le nanoparticelle, materiali con dimensioni comprese da 1 e 100 nm, con proprietà uniche e diverse dai materiali massivi. A livello nanometrico, infatti, il rapporto superficie/volume risulta essere circa da 35 a 45 volte superiore rispetto a particelle più grandi. L'elevata area superficiale che posseggono ha un'influenza diretta su diverse proprietà, come ad esempio la reattività che risulta significativamente aumentata [2,3]. In particolare, la peculiarità di tali nanoparticelle è rappresentata dall'effetto di confinamento quantistico, fenomeno che si verifica quando la dimensione della particella diventa inferiore al raggio di *Bohr*, per cui quando un materiale viene strutturato su scala nano o atomica, gli elettroni posti attorno al nucleo, che ne limita il movimento, sono confinati nella banda di conduzione, diversamente da un materiale in bulk in cui gli elettroni, condivisi da più atomi, si muovono all'interno del reticolo cristallino [4]. La riduzione delle dimensioni su scala nanometrica fa sì che l'estensione della "band gap" (banda di separazione tra elettroni di valenza e banda di conduzione) diventi dipendente dalla dimensione della nanoparticella e provochi uno spostamento dello spettro di emissione e di assorbimento verso frequenze più alte (blue-shift) al diminuire della taglia. (Fig.1.1) [5]

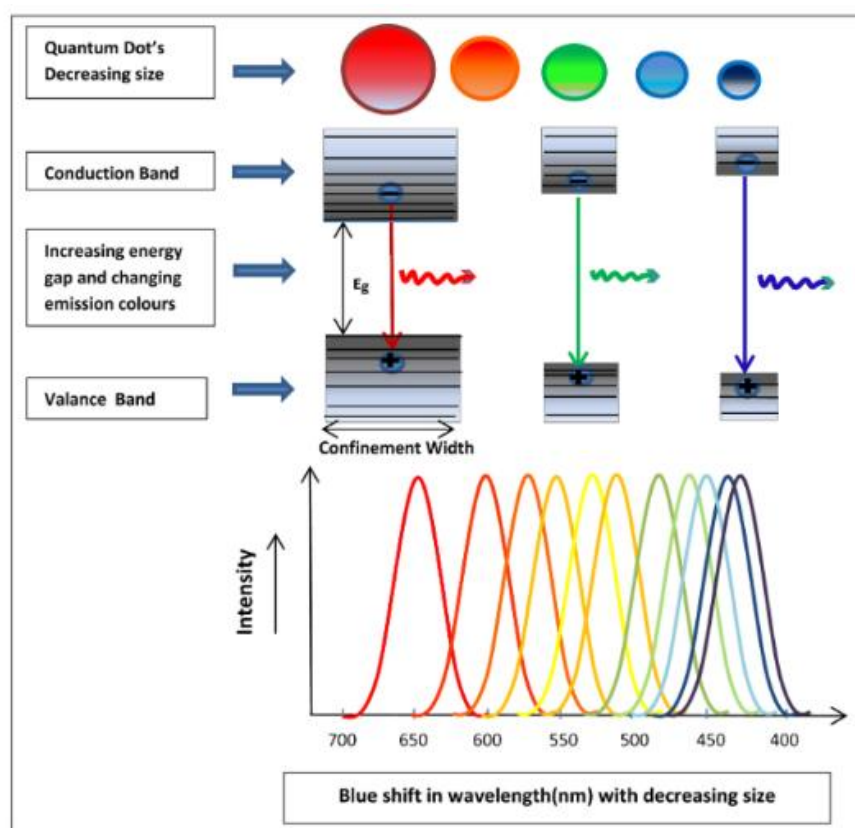


Figura 1.1: Illustrazione dell'effetto di confinamento quantistico. [6]

Metalli nobili, quali oro, argento e platino, rappresentano gli elementi chiave di questa nuova classe di materiali: le nanoparticelle. Le peculiarità che contraddistinguono tali metalli sono molteplici, tra cui stabilità chimica, biocompatibilità e buona conducibilità termica ed elettrica. Tra le proprietà uniche che i metalli strutturati alla nanoscala possiedono ritroviamo le proprietà ottiche, fisiche, elettroniche e catalitiche. [7] Tali caratteristiche si differenziano dal materiale strutturato su scala macroscopica per l'effetto di confinamento quantistico e per l'aumento del rapporto superficie/volume, che modificano il modo in cui il materiale si comporta. [5] Tali metalli, strutturati in scala nanometrica, presentano, inoltre, un punto di fusione più basso. Tra le altre proprietà delle nanoparticelle, emergono quelle catalitiche, strettamente legate all'area superficiale specifica e alla presenza di siti attivi. Tali caratteristiche, insieme alla struttura nanometrica, facilitano il trasferimento elettronico, ovvero la capacità delle NP di scambiare elettroni con i reagenti presenti nel mezzo, agendo sulla cinetica di reazione. Le nanoparticelle, inoltre, quando vengono sintetizzate, risultano molto sensibili a variazioni dell'ambiente in cui vengono poste, come pH o temperatura. [8-10] In particolare, il pH agisce sullo stato di ionizzazione della superficie modificando la carica che esse posseggono, alterando conseguentemente le repulsioni elettrostatiche tra particelle e influenzandone l'interazione con altre molecole. [11] La temperatura invece, agisce sull'energia cinetica del sistema. Incrementi repentini inducono la formazione di aggregati e, conseguentemente, riducono l'area superficiale, rendendo quindi le NP meno efficaci. [12] Variazioni di tali parametri, se non opportunamente controllate, compromettono la stabilità del sistema, agendo sulle forze che lo governano. Un ulteriore fenomeno caratteristico delle NP metalliche è rappresentato dalle risonanze plasmoniche superficiali localizzate (LSPR),

fenomeno fisico che si verifica quando in presenza di campi elettromagnetici o luce incidente, l'interazione con gli elettroni di valenza del metallo induce una polarizzazione delle cariche che provoca una loro oscillazione collettiva, definita "plasmon". [13,14] L'oscillazione genera una concentrazione del campo elettromagnetico sulla superficie della nanoparticella ed è associata a un incremento di fenomeni di diffusione e assorbimento della radiazione. Quando la frequenza della luce incidente coincide con la frequenza di eccitazione degli elettroni, vengono quindi eccitate le cosiddette LSPRs, rivelabili in genere tramite spettroscopia UV-Visibile grazie alla presenza di picchi di assorbimento alla frequenza di risonanza. [13] Su tale fenomeno si basano diverse tecniche, tra cui la MEF (Metal-Enhanced Fluorescence), la SEF (Surface-Enhanced Fluorescence) oltreché la spettroscopia Raman amplificata da superfici (Surface Enhanced Raman Scattering – SERS). In particolare, nella spettroscopia Raman una radiazione incidente interagisce con il campione e viene diffusa in tutte le direzioni sia in modo elastico che, in minima parte, anelastico. Quest'ultima componente di luce diffusa a una frequenza diversa da quella incidente deriva dal fatto che la radiazione interagisce con i modi vibrazionali del campione. Poiché ogni legame chimico possiede una propria frequenza vibrazionale, si otterrà un segnale che fornirà informazioni strutturali e composizionali sul materiale indagato [14]. Per superare i limiti di sensibilità intrinseci alla tecnica ed amplificare così il segnale di scattering Raman si utilizza la versione amplificata (SERS), tecnica in cui l'eccitazione delle LSPRs genera un forte aumento del campo elettromagnetico locale nelle vicinanze delle nanoparticelle. Tale campo risulta quindi responsabile dell'amplificazione dell'efficienza di scattering Raman di molecole che si trovino in prossimità della superficie delle nanostrutture. [14, 15]

Le risonanze plasmoniche di superficie sono influenzate da diversi fattori, come le costanti dielettriche del metallo, del mezzo circostante, da forma e dimensione delle nanoparticelle e, in presenza di più particelle, dalla distanza interparticellare e dalla loro disposizione. [14] Per questo motivo avere un controllo su questi fattori durante la sintesi delle NP risulta un aspetto fondamentale per le successive applicazioni. Inoltre, la possibilità di essere funzionalizzate le rende elementi fondamentali nel biosensing e nella terapia medica. [10]

Le tecniche per la formazione di tali nanoparticelle si dividono in tecniche top-down e bottom-up (Fig. 1.2) [16]; nel primo caso si lavora per sottrazione di materiale partendo da un materiale bulk. Tra questi metodi distinguiamo l'evaporazione-condensazione e la pirolisi, oltreché le tecniche nanolitografiche utili alla fabbricazione di nanostrutture. Nel secondo caso, rientrano le tecniche di sintesi chimica, tra cui distinguiamo la riduzione chimica, fotochimica ed elettrochimica. In tali tecniche si lavora per addizione di materiale, per cui, partendo da singoli atomi o ioni si ottengono nanoparticelle. [17] La scelta del metodo influisce sulle proprietà finali delle nanoparticelle: sebbene con i metodi top-down si ottenga con maggior precisione un controllo morfologico, i processi bottom-up offrono ulteriori vantaggi in termini di resa e scalabilità. [16,17] Grazie alle proprietà che posseggono su scala nanometrica, le nanoparticelle metalliche trovano oggi, largo impiego in diversi campi tra cui quello ingegneristico, fisico, chimico e soprattutto quello delle scienze biomediche dove rappresentano elementi innovativi per diagnosi, terapie avanzate e drug delivery. [18]

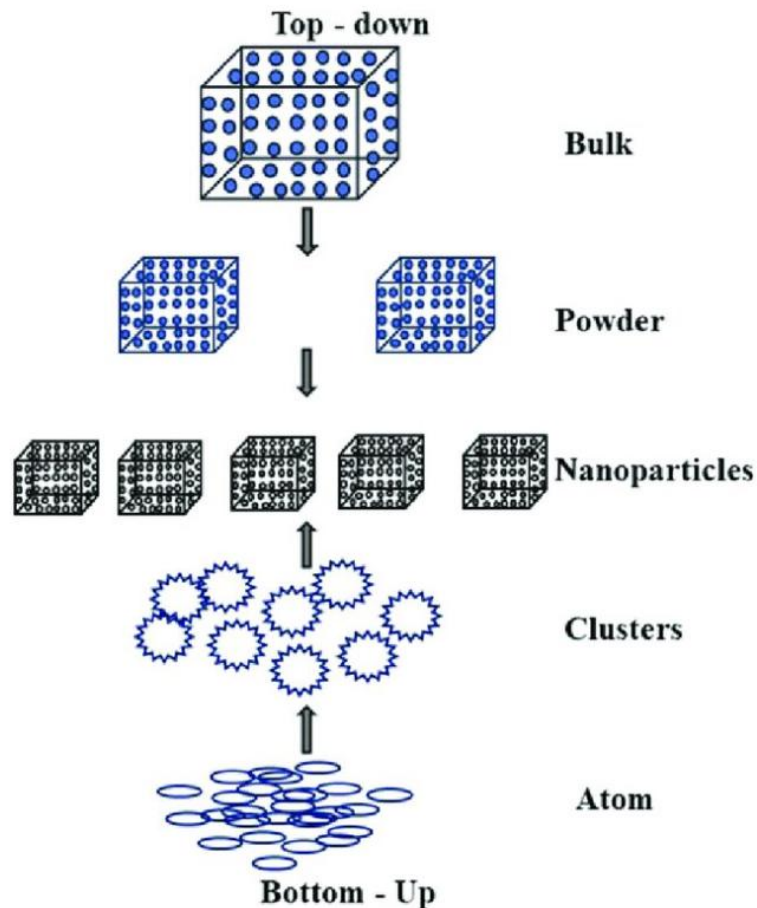


Figura 1.2: Schema illustrativo del principio alla base delle tecniche bottom-up e top-down. [16]

In ambito bionanotecnologico, lo sviluppo di nanoparticelle funzionalizzate con determinate biomolecole permette di utilizzarle in saggi colorimetrici per la rilevazione di sostanze di interesse [19], rendendole quindi ottimi candidati per la progettazione di biosensori. In particolare, i saggi colorimetrici sfruttano il principio per cui le nanoparticelle, se non opportunamente funzionalizzate, risultano instabili in soluzione, se funzionalizzate invece, la repulsione sterica o elettrostatica conferita dalle molecole poste in superficie ne garantisce la stabilità in soluzione. Come mostrato in Figura 1.3 le nanoparticelle d'oro (AuNP) vengono utilizzate in un saggio per rilevare un analita. Inizialmente esse sono ben disperse in soluzione poiché la funzionalizzazione mediante aptameri (sequenze di DNA a singolo filamento) le protegge dall'aggregazione indotta da sale. Successivamente, in presenza di un analita gli aptameri interagiscono con esso allontanandosi dalla superficie delle AuNP e conseguentemente le nanoparticelle, non più protette, tenderanno ad aggregare, il colore della soluzione passerà da rosso a blu.[20]

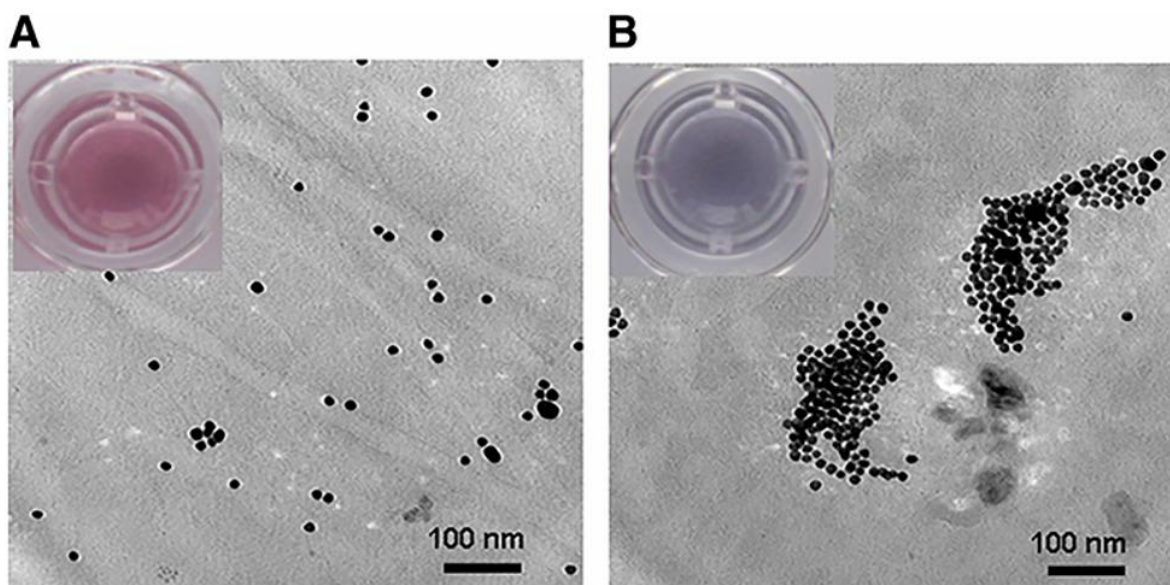


Figura 1.3: Rappresentazione dell'aggregazione di nanoparticelle d'oro (AuNPs) in un aptasensore. [20]

Il principio del saggio risiede quindi nella variazione dell'equilibrio tra NP: in alcuni saggi in presenza di molecole cariche (come, ad esempio, il cloruro di sodio), se le NP non sono opportunamente funzionalizzate, l'equilibrio viene alterato portando alla perdita della stabilità colloidale e alla conseguente aggregazione delle nanoparticelle. Questo fenomeno si traduce in un cambiamento di colore visibile ad occhio nudo, la cui colorazione e intensità del picco plasmonico misurato risultano fortemente dipendenti dal grado di aggregazione delle NP. In particolare, se le NP risultano completamente aggregate la colorazione tenderà al grigio, al contrario se le NP non aggregano in presenza di NaCl, manterranno la classica colorazione che il colloide possiede. Ad esempio, per sistemi colloidali a base oro in caso di aggregazione si ha uno spostamento del picco plasmonico da lunghezze d'onda più basse a valori maggiori [21] Per le AgNP picco plasmonico tende semplicemente a diminuire d'intensità fino a scomparire alla completa aggregazione. [22] Questo meccanismo può essere sfruttato per lo sviluppo di saggi analitici, come verrà dettagliato più avanti nella tesi. (Fig. 1.16)

## 1.2 Nanoparticelle di argento (AgNP)

Tra le diverse nanoparticelle menzionate, quelle realizzate in argento svolgono un ruolo cruciale. Esse rappresentano una delle classi più studiate tra i nanomateriali metallici grazie alle loro proprietà. L'argento è un metallo di transizione appartenente alla classe dei metalli nobili. [2] In natura lo contraddistingue un colore lucente, mentre su scala nanometrica può essere sintetizzato in diverse forme, tra cui dispersioni colloidali di argento metallico, ottenute mediante vari metodi di sintesi. Inoltre presenta un grande potenziale in applicazioni biomediche e no. [21]

Tra le proprietà che contraddistinguono l'argento, si trovano le proprietà antimicrobiche, grazie alla loro capacità di inibire la crescita di batteri [8], le proprietà ottiche, incentrate sulle LSPR, che le rende utili per tecniche come SERS e per imaging, e infine un'elevata reattività superficiale dovuta all'elevato rapporto superficie/volume [9,22].

La reattività superficiale coniugata all'azione indotta dall'ossigeno atmosferico e dalla luce rende le nanoparticelle d'argento soggette al fenomeno dell'aging (invecchiamento), fenomeno per cui le NP vanno incontro ad una progressiva ossidazione superficiale che comporta il rilascio continuo di ioni argento in soluzione. Tale processo di degradazione risulta più rapido nei materiali strutturati alla nanoscala e influisce sulle dimensioni delle NP, modificando conseguentemente lo spettro LSPR, e può causare l'aggregazione del colloide, riducendone la stabilità. [23]

La stabilità delle nanoparticelle, dipende fortemente dai capping agent, ovvero molecole utilizzate durante la sintesi delle NP per controllarne la crescita, la forma e la stabilità. In particolare, è stato studiato come rivestimenti con citrato generano un aging più distruttivo caratterizzato da una forte aggregazione che causa l'insorgenza di forme irregolari. Ciò accade perché il legame tra citrato e argento è debole per cui la repulsione tra le NP tende a ridursi nel tempo, causando un loro avvicinamento e sedimentazione. Rivestimenti con PVP o altri polimeri limitano invece l'aggregazione nel tempo, preservando la forma sferica delle NP e lasciando le dimensioni inalterate, dimostrando come tali rivestimenti garantiscano maggior stabilità sterica. È stato dimostrato come tale fenomeno sia un processo inevitabile, indipendentemente dalla temperatura di conservazione, che influisce anche sulla tossicità che esse posseggono se poste in ambienti biologici. [24]

L'elevata reattività insieme alle dimensioni nanometriche e alla morfologia rappresentano i parametri chiave che influenzano le proprietà di tali nanomateriali e che li rende fondamentali in tutti quegli ambiti per cui l'utilizzo di materiali in bulk non garantisce prestazioni adeguate. [25] Il crescente interesse nei confronti di tali nanoparticelle è rappresentato dalla capacità di poter modulare le proprietà che le contraddistinguono attraverso un controllo su forma e dimensione, mediante opportuni metodi di sintesi. [2]

Attraverso modifiche ingegneristiche della superficie, è possibile sviluppare piattaforme per biosensing e diagnostica o per il rilascio controllato di molecole bioattive. Mediante la formazione di legami tra nanoparticelle e diverse biomolecole, tra cui proteine, come anticorpi ed enzimi, o acidi nucleici come filamenti di DNA o aptameri, che svolgono un ruolo chiave per il riconoscimento di determinati target, è possibile sviluppare dispositivi analitici ad alta sensibilità e specificità. [17,26]

Il legame tra nanoparticella e biomolecola può essere ottenuto in vari modi, tra cui l'adsorbimento elettrostatico, chemisorbimento tramite gruppi tiolici o l'utilizzo di linker. [27] Questi approcci permettono quindi di ottenere sistemi stabili e selettivi per applicazioni analitiche e biomediche. (Fig.1.4)

In ambito medico, ad esempio, le nanoparticelle d'argento sono ampiamente utilizzate per le spiccate proprietà antimicrobiche [9], lo sviluppo di materiali funzionalizzati per il trasporto di farmaci e per strategie di targeting selettivo, attraverso cui il farmaco può essere indirizzato verso il sito di interesse. [18] Questo approccio consente di aumentare l'efficacia del trattamento riducendo al contempo gli effetti indesiderati sui tessuti sani.

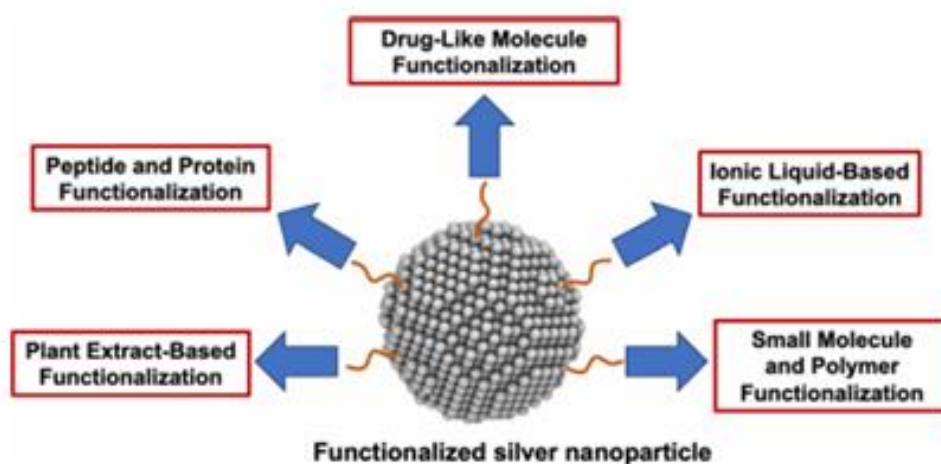


Figura 1.4: Schema illustrativo di possibili metodologie di funzionalizzazione delle nanoparticelle. [28]

Nonostante i diversi vantaggi elencati, gli aspetti problematici legati a tali nanoparticelle sono molteplici, tra cui distinguiamo la poca stabilità nel tempo con conseguenti problemi legati all'aggregazione, la riproducibilità delle sintesi e la possibile interazione non specifica con componenti biologici, motivo per cui questi materiali sono oggetto di grande interesse nella ricerca attuale, che richiede opportune valutazioni e conseguenti caratterizzazioni. [17, 29]

### 1.2.1 Proprietà fisico-chimiche

Le nanoparticelle d'argento possiedono proprietà tipiche dei metalli nobili strutturati alla nanoscala, in particolare presentano ottime capacità elettriche ed ottiche, differenti dai materiali massivi. [30]

Tra le proprietà elettriche, emerge la capacità di mostrare comportamenti quantistici, sebbene queste siano governate prevalentemente da fenomeni plasmonici. Anche l'elevata reattività chimica che le NP posseggono risulta influenzata da fenomeni plasmonici. Inoltre, la presenza sulla loro superficie di difetti come spigoli o vertici aumenta la reattività elettronica, che risulta quindi dipendente dall'energia superficiale e dall'area superficiale tipica di ogni particella. [17] Dal punto di vista termico, le AgNP presentano maggior capacità di dissipazione o trasferimento di calore, con una stabilità termica che risulta dipendente anche dalla presenza di rivestimenti superficiali. [9] Le proprietà che esse posseggono presentano una forte dipendenza da dimensione e distanza interparticellare. (Fig. 1.5) In particolare, la lunghezza d'

onda caratteristica del picco plasmonico è correlata alle dimensioni delle nanoparticelle: NP di piccole dimensioni presentano una maggiore area superficiale e conseguentemente maggiore reattività, con una posizione del picco differente rispetto ai sistemi con NP più grandi.

Particelle troppo piccole hanno una risposta plasmonica debole, al contrario particelle troppo grandi generano uno scattering eccessivo e conseguentemente una riduzione del segnale di assorbimento rilevabile. [8,32] Esiste infatti una dimensione ottimale, compresa nel range 30-100 nm, in cui è possibile utilizzare le nanoparticelle per avere le proprietà desiderate. Al di sotto di 20 nm la risposta ottica è prevalentemente governata da fenomeni di assorbimento e in misura minore da fenomeni di scattering, al contrario, sopra i 100 nm, il contributo legato allo scattering risulta più rilevante. [8] Per tali valori inoltre iniziano a comparire modi di ordine superiore, ovvero oscillazioni multipolari che rendono lo spettro più complesso e meno efficiente. [10]

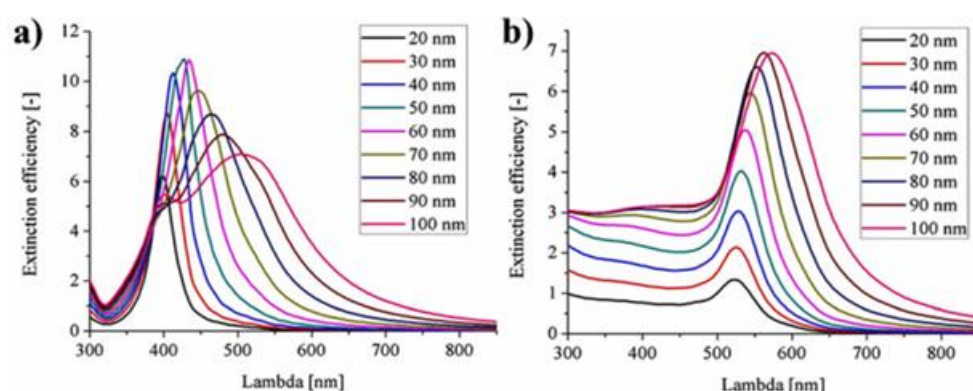


Figura 1.5: Spettri di nanoparticelle sferiche di argento (a) e oro (b), con dimensione compresa tra 20 e 100 nm. Relazione tra la sezione d'urto di estinzione (assorbimento + scattering) e lunghezza d'onda. [31]

I picchi di assorbimento delle nanoparticelle sono rilevabili mediante spettroscopia UV-Vis, tecnica in cui la luce incidente interagisce con il campione, generando un segnale d'estinzione, ovvero dato dalla somma della radiazione assorbita e di quella diffusa (*scattering*) dalle particelle stesse, ad una specifica lunghezza d'onda. [33] Per le AgNP sferiche il picco di assorbimento plasmonico, si osserva tra 390 e 420 nm. [10] In funzione della forma e della dimensione delle nanoparticelle, infatti, gli assorbimenti legati alle LSPRs si riscontrano a lunghezze d'onda differenti. (Fig.1.6)

A differenza degli altri metalli nobili l'argento, quando eccitato alla corretta lunghezza d'onda, presenta uno smorzamento (*damping*) molto più basso, che porta alla formazione di un picco plasmonico più stretto e più intenso. [10] Tale fenomeno rappresenta la dispersione dell'energia e l'effetto di sfasamento (*dephasing*) a cui è soggetta l'oscillazione del plasmone quando viene eccitata in risonanza. Per l'argento, un *damping* più basso, si traduce in un'oscillazione degli elettroni che si proroga nel tempo, causando la dispersione di poca energia, che si traduce negli spettri UV-Vis in una riduzione della larghezza a metà altezza (FWHM) della banda, generando un picco plasmonico più stretto e definito. Al contrario la presenza di un *damping* elevato, come nel caso dell'oro, genera un'oscillazione che si smorza precocemente con conseguente effetto sul picco plasmonico che apparirà più ampio. [35]

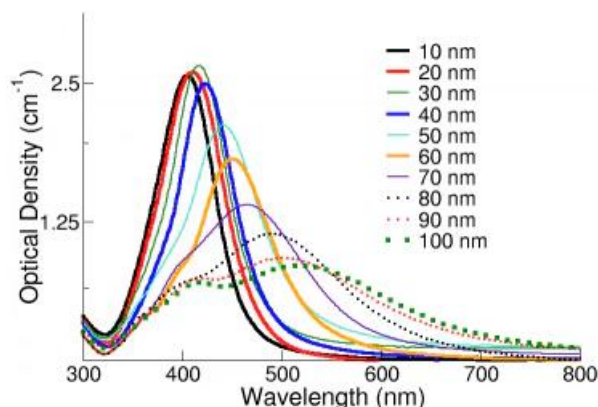


Figura 1.6: Esempi di spettri UV-Vis di AgNP sferiche commerciali con dimensioni differenti.[34]

La presenza di morfologie differenti ha quindi una diretta conseguenza sulle proprietà ottiche. Come sottolineato, nanoparticelle sferiche presentano un singolo picco di assorbimento centrato intorno ai 390-420 nm, al contrario forme diverse, come cubiche o triangolari inducono la comparsa di ulteriori picchi mostrando massimi nell'intorno di 700 nm per nanoparticelle più grandi con forma triangolare (Fig. 1.7, 1.8). [36, 37] La presenza di forme non del tutto sferiche, tra cui i *nanorods*, generano uno sdoppiamento (splitting) della risonanza plasmonica in due componenti; un'oscillazione degli elettroni lungo un'asse trasversale, caratterizzata da energie più alte e una componente longitudinale, caratterizzata da minor energia di eccitazione. Al variare quindi della forma, la posizione del picco plasmonico che si ottiene varia. Ad esempio, con morfologie triangolari di dimensioni pari a 100 nm evidenziano picchi a lunghezze d'onda maggiori (550 nm), al contrario morfologie triangolari con dimensioni ridotte (20 nm) presentano picchi a lunghezze d'onda più basse (400 nm) [34]. Per le nanoparticelle il cambiamento di colore visibile ad occhio nudo varia in funzione della morfologia, un esempio rappresentativo è riportato in Figura 1.9 per cui si verifica un cambiamento cromatico della soluzione di nanoprismi al variare della dimensione, in un range compreso tra 30 e 100 nm. Questo comportamento si traduce rispettivamente con la comparsa di un picco di assorbimento nel blu, per la componente trasversale, e a lunghezze d'onda maggiori (*red-shift*) per quella longitudinale [38, 39]

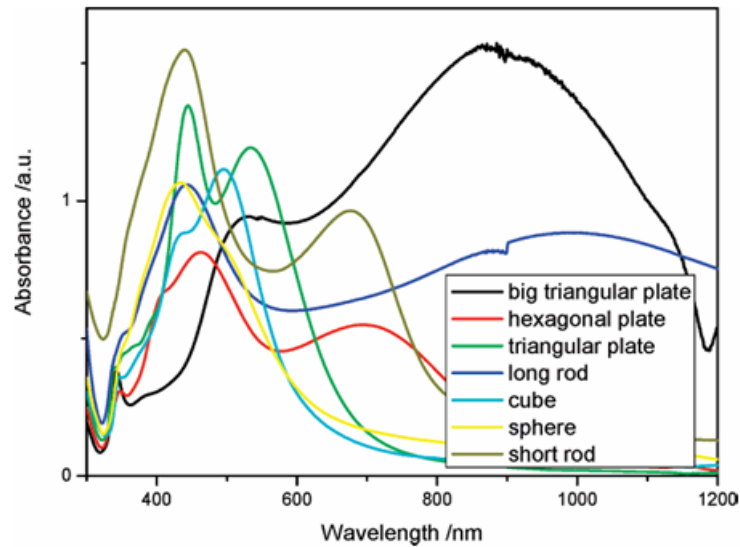


Figura 1.7: Esempi di spettri UV-Vis caratteristici di nanoparticelle con forma diversa. [40]

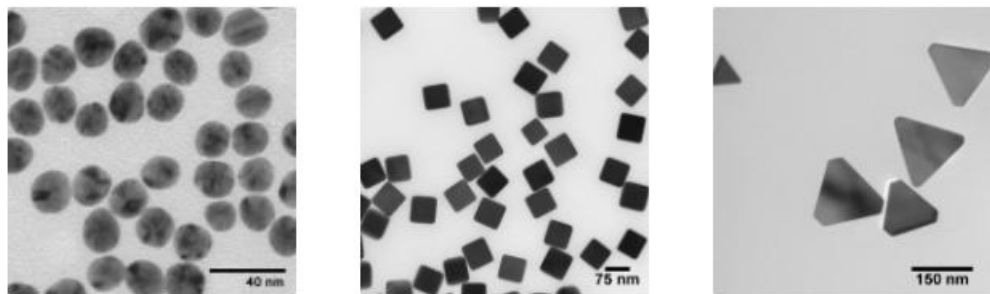


Figura 1.8: Esempi di nanoparticelle con morfologie differenti. [34]

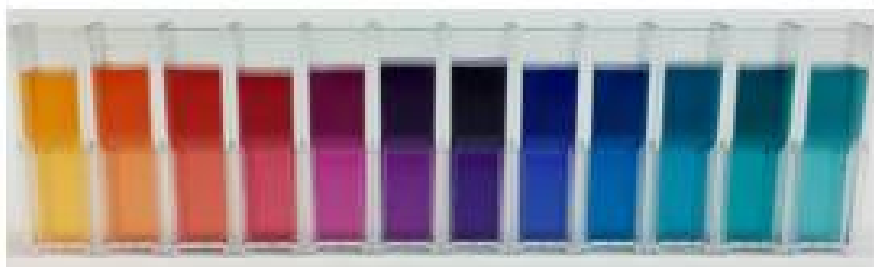


Figura 1.9: Soluzioni colloidali di nanoprismi in acqua che mostrano una variegata gamma di colorazioni. [41]

Infine, la distanza tra particelle influenza le proprietà ottiche ed elettroniche. Se le nanoparticelle sono vicine, la loro interazione genera un ulteriore incremento dell'intensità del campo elettromagnetico grazie all'accoppiamento delle loro risonanze plasmoniche. [42] La morfologia delle nanoparticelle ha quindi una diretta influenza sugli spettri, nei picchi di risonanza, e sul rapporto tra sezione d'urto di scattering e assorbimento, oltre che sulle altre proprietà, poiché sono proprio forma e dimensione ad influenzare la distribuzione delle cariche superficiali e conseguentemente la risposta complessiva del sistema.

### 1.2.2 Metodi di sintesi

I metodi per sintetizzare le nanoparticelle sono molteplici e, come accennato, si dividono in metodi top-down e bottom-up. [16] Tra i metodi top-down, i metodi fisici includono l'evaporazione-condensazione, la pirolisi e la CVD. Nel primo caso si riscalda un materiale massivo in gas inerte fino all'evaporazione, all'interno di un forno. Questa fase è seguita da una condensazione del vapore in ambiente controllato, con successiva formazione di nanoparticelle. Nel secondo caso invece, avviene la decomposizione di un precursore gassoso ad elevate temperature, che porta alla rottura dei legami chimici lasciando gli atomi d'argento ad aggregarsi in sfere. Infine, nella CVD, un precursore gassoso volatile costituito d'argento metallico viene riscaldato e trasportato su un substrato. Dalla decomposizione del vapore si otterranno atomi di argento che depositandosi sul substrato porteranno alla formazione di NP. [16, 29]

Nel secondo gruppo rientrano i metodi chimici, in cui, partendo da ioni metallici in soluzione, avviene la formazione di nuclei di nanoparticelle grazie all'utilizzo di agenti riducenti e stabilizzanti (*capping agents*). [40] In questa famiglia distinguiamo diverse tecniche di riduzione. La riduzione fotochimica sfrutta i fotoni per eccitare opportune molecole e renderle in grado di ridurre gli ioni argento. La riduzione radiolitica, invece, utilizza radiazioni ionizzanti ad elevata energia su soluzioni acquose mediante cui, attraverso la generazione di specie reattive, avviene la riduzione degli ioni argento, che attraverso un processo di nucleazione porterà alla formazione delle NP. La riduzione chimica prevede invece l'utilizzo di un agente riducente che induce la formazione di atomi metallici che nucleando diventano nanoparticelle, mentre la riduzione radiochimica sfrutta reazioni nucleari per generare specie riducenti. Infine, distinguiamo anche la decomposizione termica in solventi organici che sfrutta precursori organometallici posti in solventi ad elevate temperature, a cui segue una decomposizione con conseguente formazione di nanoparticelle monodisperse. Questa famiglia di tecniche include le sintesi green che, a differenza delle tecniche precedenti, utilizzano agenti riducenti e stabilizzanti di origine biologica, come ad esempio, estratti di piante utilizzati come riducenti, di ceppi batterici come *E. coli* che producono NP mediante processi di bio-riduzione o infine di funghi, i quali mediante il rilascio di molecole sono in grado di stabilizzare le nanoparticelle. [3, 29, 43]

Tra i vari metodi citati, i protocolli che prevedono la sintesi mediante riduzione chimica sono i metodi più utilizzati e vantaggiosi, essi infatti non richiedono vuoto spinto o sorgenti ad alta energia, ma sono applicabili in condizioni blande. Inoltre, modulando i reagenti e le concentrazioni in modo opportuno, si ottengono nanoparticelle d'argento omogenee e con diametri simili, ottenendo così segnali plasmonici riproducibili. [40, 44]

Tra i principali e storici metodi di sintesi che si basano sulla riduzione di precursori d'argento in soluzione acquosa distinguiamo il metodo Turkevich e il metodo di riduzione con boridruro di sodio (metodo Creighton). [45] Il primo metodo prevede di effettuare la riduzione del nitrato d'argento mediante l'aggiunta di citrato trisodico, sfruttando temperature prossime all'ebollizione. In queste condizioni il citrato agisce sia come riducente debole sia come agente stabilizzante. Tale metodo permette la produzione di nanoparticelle d'argento sferiche con diametri compresi tra i 30 e i 60 nm. [45,46]

Il secondo metodo impiega un agente riducente forte, il sodio boroidruro, posto in un bagno di ghiaccio, che rallenta, dopo la nucleazione, la crescita dei cristalli. La presenza di tale reagente porta alla trasformazione istantanea e simultanea degli ioni argento in una popolazione di nuclei stabili, caratterizzati da dimensioni più piccole rispetto al metodo di Turkevich, con diametri compresi tra i 5 e 20 nm e con nanoparticelle abbastanza monodisperse. [47, 48]

Esistono in ogni caso diverse varianti di queste sintesi consolidate. Tra queste spiccano quelle in cui il riducente è l'acido ascorbico (AA). Si può infatti affermare che oggi, la riduzione del nitrato d'argento ( $\text{AgNO}_3$ ) mediante AA in presenza di trisodio citrato rappresenta uno tra i metodi più utilizzati per la preparazione di nanoparticelle d'argento in soluzione acquosa. Tale sintesi permette di ottenere miscele di particelle d'argento con morfologia sferica e a bastoncino, avendo quindi diretta influenza sulla formazione delle NP. Il citrato, reagente sostenibile e biocompatibile utile per applicazioni biomedicali, è utilizzato come agente stabilizzante, mantiene le nanoparticelle disperse e ne previene l'aggregazione. [49, 50] Parallelamente, l'AA è utilizzato come agente riducente e riesce a controllare la velocità di riduzione del precursore d'argento poiché consente la conversione degli ioni argento in argento metallico. Esso svolge, quindi, un ruolo fondamentale nella sintesi chimica. La sua reattività dipende da diversi parametri. Uno dei principali è il pH in quanto influenza la cinetica di riduzione dei precursori metallici e le proprietà finali delle nanoparticelle ne sono fortemente dipendenti. In presenza di pH maggiormente alcalini, la deprotonazione dell'acido ascorbico induce un aumento della forza riducente di tale molecola che accelera in questo modo la riduzione degli ioni metallici. [51,52] Tale fenomeno, tipico di molti precursori metallici, tra cui quelli a base argento e oro, si verifica, perché tale anione, che risulta termodinamicamente instabile, induce un'immediata conversione degli ioni metallici, favorendo una nucleazione più rapida. Un incremento del pH porta quindi ad una diminuzione del diametro medio delle nanoparticelle con conseguente spostamento del picco plasmonico a lunghezze d'onda inferiori. [50] Inoltre, anche l'instabilità chimica dell'acido ascorbico influenza la sintesi. Infatti, entro poche ore dalla preparazione della miscela di reazione (circa 0.5-1 ora), l'acido ascorbico va incontro a degradazione. Tale fenomeno è accompagnato dalla diminuzione di intensità della banda di assorbimento UV caratteristica di tale molecola (265 nm), come osservabile dagli spettri UV-Vis in Figura 1.10 e dalla concomitante formazione di altre due bande dipendenti da sottoprodotti formati da gruppi carbonilici e specie tautomeriche che assorbono tra 210 nm e 220 nm. [50,53] L'impiego durante la sintesi di una soluzione di acido ascorbico appena preparata porta alla formazione di nanoparticelle sferiche. Al contrario l'utilizzo di acido ascorbico invecchiato induce la formazione di strutture anisotrope (es. bastoncini). Il cambiamento morfologico è associabile alla cinetica di riduzione dovuto alla sua degradazione. [52]

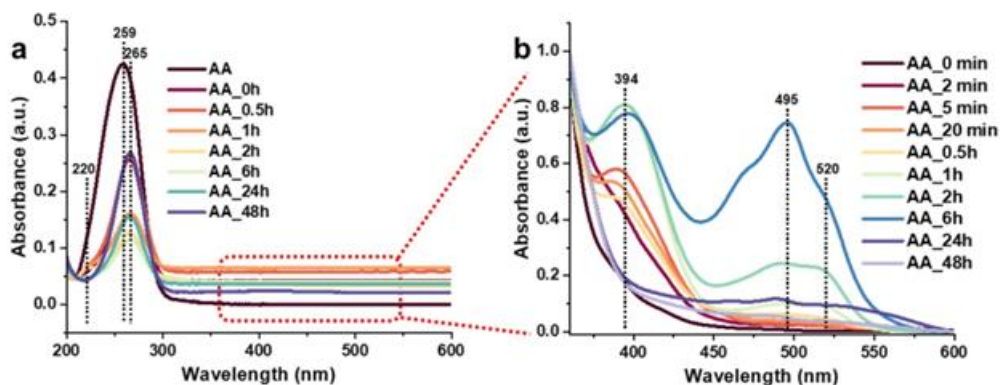


Figura 1.10: Spettri UV/Vis di una soluzione di acido ascorbico in ambiente alcalino (NaOH, pH 11), acquisiti nell'arco di 48 ore. [50]

In presenza di tale agente riducente, quindi, il controllo del pH e del tempo di preparazione della soluzione svolge un ruolo cruciale per garantire riproducibilità durante le sintesi. [50,52]

### 1.3 Stabilità colloidale e fenomeni di aggregazione nelle nanoparticelle metalliche

La presenza di nanoparticelle disperse in un solvente porta alla formazione di un sistema colloidale, un sistema termodinamicamente instabile, la cui instabilità dipende dall'elevata energia superficiale, che induce l'aggregazione delle nanoparticelle. [54] In soluzione, infatti, la stabilità è guidata dal bilancio tra forze attrattive e repulsive, come descritto dalla teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO). [55] Secondo tale teoria, le forze attrattive di Van der Waals portano alla formazione di aggregati e alla conseguente perdita delle proprietà nanometriche. In particolare, le forze attrattive, sono forze a corto raggio, sempre presenti che favoriscono l'avvicinamento tra le NP. Tali forze, inoltre, tendono ad incrementare con l'aumento delle dimensioni delle nanoparticelle. [56] Contemporaneamente, le forze di repulsione di natura elettrostatica che si instaurano a seguito della sovrapposizione dei doppi strati elettrici delle nanoparticelle, creano una barriera attorno alle nanoparticelle attraverso la formazione del doppio strato elettrico [55], ovvero una struttura ionica che si sviluppa all'interfaccia tra le nanoparticelle e il mezzo in cui vengono sintetizzate, che impedisce l'aggregazione. Tale forza aumenta con il potenziale zeta (differenza di potenziale tra il piano di scorrimento della particella e il liquido circostante) e diminuisce con la forza ionica. [57] Il doppio strato si forma quando in presenza degli anioni dell'agente stabilizzante o riducente i nuclei metallici delle nanoparticelle carichi attirano gli ioni con carica opposta, presenti in soluzione, organizzandosi nella formazione di tale strato. Esso è costituito da 2 livelli, il primo, quello più interno definito piano di Stern costituito da ioni molto adesi alla superficie e il secondo, più esterno caratterizzato da una minor concentrazione ionica. Il doppio strato impedisce alle nanoparticelle di avvicinarsi, generando quindi una forza di repulsione (Fig. 1.11). [56,57] L'equilibrio del sistema, oltre ad essere governato dalla presenza di queste due forze, è dipendente anche dal moto browniano. Tale fenomeno induce collisioni casuali tra le nanoparticelle e rappresenta quindi il meccanismo che regola la frequenza degli urti tra nanoparticelle. In particolare, quando l'energia degli urti tra le nanoparticelle è sufficiente a superare la barriera repulsiva del doppio strato elettrico, il sistema giunge a coalescenza, al

contrario invece, se la barriera riesce a prevenire il contatto tra le NP, la stabilità del colloide viene preservata. [58]

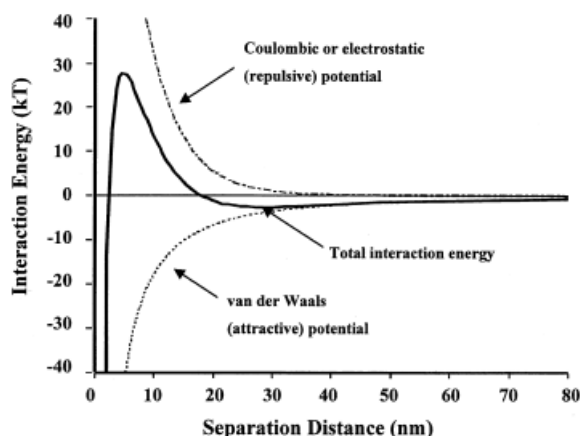


Figura 1.11: Schema illustrativo dell'energia di interazione DLVO rispetto alla distanza. [55]

L'aggregazione delle nanoparticelle si verifica quindi, quando le collisioni superano le forze repulsive rendendo il meccanismo dipendente sia dalla cinetica di diffusione, direttamente dipendente dal moto browniano, che dalle condizioni chimico-fisiche del mezzo. [56]

### 1.3.1 Influenza dei parametri termodinamici e cinetici sulla morfologia delle nanoparticelle

La formazione del sistema e conseguentemente la stabilità che esso possiede, dipendono da diversi parametri. Come già accennato, il pH regola dimensione e morfologia delle nanoparticelle. Aumentando tale parametro, infatti, la reazione si verifica più velocemente e si incrementa il numero di nuclei formati, ovvero i primi aggregati di atomi di argento ottenuti dalla reazione. I nuclei rappresentano centri termodinamicamente stabili che attirano a sé i precursori circostanti, e sono la base per la successiva fase di accrescimento delle nanoparticelle. [51] Il pH, quindi, agisce sulla cinetica di formazione del colloide. In particolare, interviene sullo stato di protonazione dei reagenti e regola conseguentemente le caratteristiche delle nanoparticelle. A pH basici, la reazione di sintesi si verifica con un'elevata velocità di riduzione, in cui avviene la transizione degli atomi da elementi solubili in soluzione alla formazione di strutture distinguibili dal mezzo circostante, ovvero si verifica il processo di nucleazione. [59] Il raggiungimento di tale soglia si verifica quando aumenta la concentrazione dei precursori metallici attivi ( $\text{Ag}^0$ ), ottenuti dagli ioni  $\text{Ag}^+$ . [50, 51, 59] Valori di pH elevati aumentano il potere riducente dell'AA e provocano un consumo istantaneo dei reagenti, riducendo rapidamente la concentrazione degli ioni argento e generando numerosi nuclei di piccole dimensioni.

Al contrario a pH acidi, la produzione dell'argento  $\text{Ag}^0$  avviene più lentamente per cui, la formazione delle nanoparticelle avviene a partire da pochi nuclei che crescono più lentamente e formano nanoparticelle con dimensioni maggiori. [50]

Un altro parametro che influenza la formazione del sistema colloidale è il rapporto molare tra riducente e precursore. Se infatti si ha un maggior quantitativo di agente riducente, ovvero, ad esempio dell'acido ascorbico, si verifica istantaneamente la formazione di un quantitativo elevato di atomi  $\text{Ag}^0$  che portano alla formazione dei nuclei, definendo quindi la "popolazione" iniziale del sistema. Se la concentrazione è bassa, l'acido ascorbico non riesce a ridurre rapidamente gli ioni argento, portando ad una crescita incontrollata di pochi nuclei, inoltre la presenza di una quantità insufficiente di agente stabilizzante non è sufficiente a prevenire la successiva aggregazione. [50,60] Al contrario, valori troppo elevati possono destabilizzare la formazione del sistema causando elevate velocità di nucleazione. [50, 61] Anche la concentrazione del precursore, però, risulta determinante: un eccesso di ioni argento può portare a crescita incontrollata e/o ad un'eccessiva riduzione del riducente disponibile, portando quindi alla formazione di poche nanoparticelle. [61, 62] Un'evidenza visiva di un giusto equilibrio tra gli elementi è rappresentata proprio da una colorazione della soluzione che nel caso di nanoparticelle sferiche apparirà gialla/ambrata. La stabilità del colloide che si ottiene dipende anche dall'agente di rivestimento che rappresenta quindi un limitatore nella crescita. La sua presenza, infatti, tende a fermare la crescita delle nanoparticelle agendo quindi come una barriera sterica. In sua assenza le NP continuerebbero ad aggregare e precipitare, formando sedimenti di nanoparticelle. [62] Anche la temperatura partecipa a tale equilibrio. Essa, infatti, influenza la velocità di nucleazione. Per valori di temperatura bassi, la reazione risulterebbe lenta, al contrario valori troppo elevati potrebbero accelerare la crescita delle nanoparticelle e indurre aggregazione, con conseguente formazione di nanoparticelle troppo grandi e non uniformi. [63] Infine, anche il tempo di reazione influisce sulla formazione del sistema. Tempi di reazione brevi, infatti, non sono sufficienti a completare la riduzione degli ioni argento, viceversa, tempi troppo lunghi portano alla formazione di un colloide con nanoparticelle costituite da strutture anisotrope, non più sferiche. Tale comportamento è fortemente dipendente dallo stabilizzante utilizzato. [60, 64] Inoltre, in condizioni di pH non controllato, tempi lunghi ed eccessiva presenza di acido ascorbico, il sistema incorre in fenomeni di aggregazione secondaria o crescita eccessiva di nuclei, portando quindi alla perdita del picco plasmonico caratteristico. [65]

I fenomeni termodinamici e cinetici quindi, influenzano la nucleazione, l'accrescimento e la stabilità del colloide. La sintesi inizia con la riduzione degli ioni argento, che porta alla formazione dei primi nuclei e successivo accrescimento [62]. La velocità con cui avviene tale processo influenza la struttura finale [62,66].

Dal punto di vista termodinamico, una riduzione lenta induce gli atomi a disporsi su superfici a minor energia, come le facce (111) del sistema, portando alla formazione di strutture più stabili, caratterizzate da morfologie isotrope e con distribuzione dimensionale uniforme. [66,67] La crescita, quindi, risulta controllata dalla minimizzazione dell'energia libera. Dal punto di vista cinetico, un aumento della velocità di riduzione, promuove una crescita accelerata e conseguente formazione di più nuclei. [68] In questa situazione gli atomi, disponendosi su facce a maggior energia, punti in cui normalmente la crescita è meno favorita, ne forzano l'accrescimento. La prevalenza del parametro cinetico può incrementare la probabilità di aggregazione o crescita anisotropa. [69,70]

Nella sintesi delle nanoparticelle, l'utilizzo del trisodio citrato svolge un ruolo centrale. Esso agisce sia come stabilizzante sia come riducente debole e adsorbendosi sulla superficie delle

nanoparticelle limita l'aggregazione mediante repulsione elettrostatica. [71] La presenza dell'acido ascorbico, invece, induce una riduzione più rapida accelerando la conversione di  $\text{Ag}^+$  in  $\text{Ag}^0$  e influenzando la velocità di nucleazione e crescita. [9] Inoltre, la presenza dell'acido ascorbico agisce sulla cinetica e conseguentemente sulla crescita delle nanoparticelle, infatti, se è presente in quantità elevate o lasciato in soluzione per tempi prolungati, (fattore che ne induce la degradazione), altera l'equilibrio della crescita sulle diverse facce cristalline, favorendo la deposizione dell'argento sulle facce meno protette, inducendo un cambio morfologico con perdita della forma sferica. [10, 61] In particolare, in tali condizioni, il sistema evolve verso la formazione di strutture con morfologie differenti. A concentrazioni nulle di AA, si ottengono NP sferiche caratterizzate dalla presenza di un solo picco plasmonico a 400 nm e da una colorazione della soluzione gialla. Incrementando la concentrazione di acido ascorbico, le nanoparticelle sferiche divergono in strutture costituite da nanoprismi triangolari la cui dimensione dipende dalla concentrazione. L'aumento della dimensione dei nanoprismi induce la formazione di un secondo picco plasmonico a lunghezze d'onda più alte (red-shift). Infatti, come si evince dalla figura 1.12, che mostra gli spettri UV-Vis di sistemi colloidali ottenuti variando le concentrazioni dell'acido ascorbico, a basse concentrazioni si individua un picco singolo nell'intorno di 400 nm, mentre, incrementando la concentrazione, si raggiungono lunghezze d'onda nell'intorno di 700 nm. [61]

Anche variando la concentrazione di nitrato d'argento, si osservano variazioni del picco plasmonico. Quando la concentrazione di metallo in soluzione è bassa, il sistema favorisce la formazione di particelle sferiche con un picco prevalente intorno ai 400 nm. L'aumento della concentrazione d'argento induce invece la formazione di nanoprismi triangolari caratterizzati da red-shift (Fig. 1.13). [61]

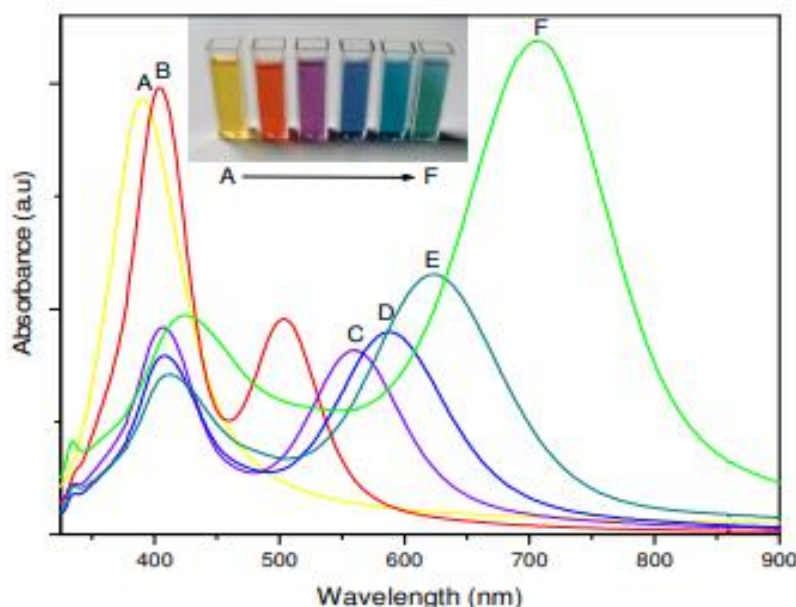


Figura 1.12: Spettri UV-Vis e rispettive colorazioni della soluzione colloidale di AgNP utilizzando varie concentrazioni di acido ascorbico, rispettivamente: A = 0 mM, B = 10 mM, C = 20 mM, D = 30 mM, E = 40 mM, F = 50 mM. [61]

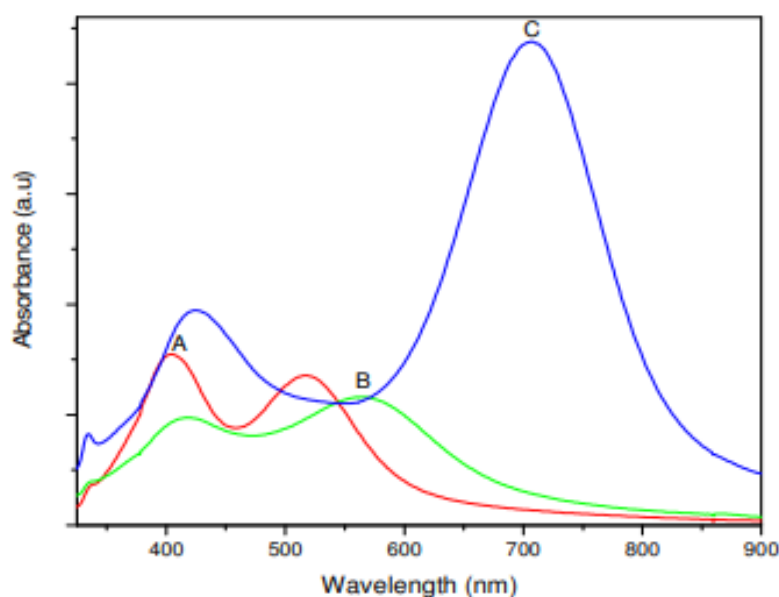


Figura 1.13: Spettri UV-Vis di soluzioni colloidale di AgNP ottenute utilizzando varie concentrazioni di nitrato d'argento, rispettivamente: A = 1,25 mM, B = 2,5 mM, C = 5 mM. [61]

Tale cambiamento risulta quindi responsabile della modifica delle proprietà ottiche del colloide, per cui si verifica uno shift del picco plasmonico verso lunghezze d'onda più alte. L'utilizzo di questi due reagenti, quindi, permette di modulare la dimensione delle nanoparticelle per mezzo di un controllo sulla cinetica di riduzione, portando il sistema a produrre forme più sferiche. [52,72]

Il controllo sulla morfologia dipende quindi dall'equilibrio di diversi parametri, tra cui velocità di riduzione, concentrazione dei reagenti, pH e stabilizzazione superficiale. L'ottimizzazione di tutti questi parametri risulta fondamentale per garantire una sintesi stabile e riproducibile, in grado di dare la morfologia e le proprietà ottiche richieste per l'applicazione.

## 1.4 Funzionalizzazione superficiale e proprietà delle nanoparticelle d'argento

Un aspetto fondamentale delle nanoparticelle d'argento è la possibilità di funzionalizzarne la superficie mediante diverse strategie chimiche e fisiche che in alcuni casi permettono l'ancoraggio selettivo di biomolecole. Tra i diversi metodi di funzionalizzazione distinguiamo: adsorbimento elettrostatico, ovvero un metodo che si basa sull'attrazione di cariche opposte, la chemisorzione con gruppi tiolici, in cui si sfrutta un legame tra molecole contenenti gruppi -SH e la superficie di interesse, e il legame covalente attraverso linker, ovvero una molecola legata alla superficie metallica, che fa da ponte con le biomolecole di interesse (Fig. 1.14). [24, 25] I vari approcci utilizzati per l'ancoraggio consentono la costruzione di sistemi ibridi nanoparticella-biomolecola altamente selettivi e funzionali. La costruzione di questi sistemi avviene principalmente attraverso i gruppi funzionali delle biomolecole quali tioli, ammine e carbossilati, che permettono la formazione di legami stabili con la superficie metallica. [25] Le funzionalizzazioni devono garantire l'attività delle biomolecole coniugate e la selettività del

sistema. Tra le diverse molecole utili alle funzionalizzazioni, distinguiamo ad esempio l'acido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) che si lega tramite gruppo tiolico all'argento e permette l'esposizione di gruppi carbossilici sulla superficie metallica. Tali gruppi possono essere utilizzati per legare biomolecole come, anticorpi o frammenti oligonucleotidici. [77] La funzionalizzazione delle NP, può avvenire anche legando direttamente sulla superficie metallica peptidi in grado di riconoscere proteine bersaglio, sfruttando anticorpi specifici per un antigene oppure utilizzando aptameri utili alla rilevazione di fattori di crescita o ulteriori biomolecole. [78] Infine, l'utilizzo di coating con polimeri conduttori, quali la polianilina, che possiede elevata conducibilità elettrica e buone proprietà redox, favorisce l'immobilizzazione di biomolecole, quali enzimi. [79]

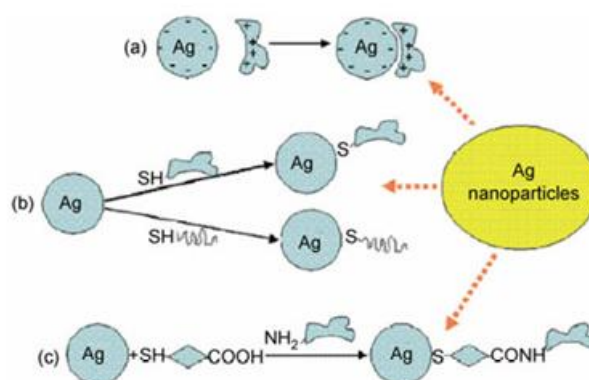


Figura 1.14: Sistemi biomolecola–nanoparticella: (a) adsorbimento elettrostatico; (b) chemisorzione con gruppi tiolici; (c) legame covalente attraverso linker. [25]

L'utilizzo delle funzionalizzazioni, quindi, svolge diversi ruoli, infatti permette di mantenere le NP disperse, impedisce la loro aggregazione spontanea e consente di preservarne dimensione e distribuzione. [78] Esse, quindi, non hanno solo influenza sulle proprietà chimico-fisiche che contraddistinguono le AgNP, modificando conseguentemente la risposta delle nanoparticelle, ma svolgono anche un ruolo strutturale volto a garantire l'ancoraggio di biomolecole e la stabilità del sistema, garantendo in molti casi funzioni biologiche alle nanoparticelle. [78, 75] La scelta del metodo di sintesi e delle condizioni operative influisce in modo significativo sulla stabilità colloidale [19]. Tali funzionalizzazioni sono molto utili nell'ambito di saggi colorimetrici. In particolare, esse devono mantenere una stabilità sufficiente del colloide durante l'utilizzo del saggio, ma devono anche permettere una variazione controllata della stabilità in risposta all'analita. [80] I saggi colorimetrici, infatti, sono metodi di analisi chimica volti alla rivelazione di molecole target. Tali approcci possono essere classificati principalmente in saggi basati sull'induzione dell'aggregazione delle nanoparticelle e saggi basati sul mantenimento della stabilità colloidale. I saggi che inducono aggregazione possono basarsi sull'utilizzo di *crosslinking* o su metodi di *non-crosslinking*. Nel primo caso, il processo si basa su un legame specifico tra molecola da rilevare e molecola usata per la funzionalizzazione. In particolare, quando l'analita si lega alla molecola posta sulla superficie, induce l'aggregazione delle nanoparticelle. Nel secondo caso invece, l'analita interagisce direttamente con la superficie metallica, destabilizzando il sistema e inducendo l'aggregazione. [80] Al contrario, nei saggi mirati al mantenimento della stabilità colloidale, le nanoparticelle vengono opportunamente funzionalizzate con proteine o altre biomolecole che ne preservano la stabilità, evitando fenomeni di aggregazione. [81]

Nel caso delle nanoparticelle d'argento, l'aggregazione può essere indotta da diverse tipologie di interazione tra analita e superficie metallica, tra cui interazioni elettrostatiche o legami a idrogeno. Nei saggi basati sul mantenimento della stabilità colloidale, le nanoparticelle vengono funzionalizzate con uno strato di molecole che agiscono come barriera protettiva contro l'aggregazione. In particolare, l'aggiunta di un elettrolita, come il cloruro di sodio che funge da agente aggregante, in condizioni normali indurrebbe l'aggregazione delle nanoparticelle neutralizzandone la carica superficiale. Grazie all'efficienza della funzionalizzazione, il sistema rimane stabile anche in presenza del sale. Se però la molecola adsorbita sulla superficie è in grado di interagire con uno specifico analita, in presenza di quest'ultimo la funzionalizzazione delle nanoparticelle viene meno e le nanoparticelle aggregano in maniera proporzionale alla concentrazione di analita presente. Il principio di rilevazione si basa quindi proprio sulla capacità di una sostanza specifica di compromettere tale rivestimento. Venendo meno la protezione, la barriera elettrostatica si indebolisce e l'elettrolita diventa in grado di indurre l'aggregazione, provocando il caratteristico viraggio di colore che segnala l'avvenuta rilevazione [26]. In figura 1.15 è rappresentato un esempio di saggio colorimetrico basato su nanoparticelle d'argento funzionalizzate con DNA per la rilevazione della coralyne ovvero una molecola organica in grado di interagire con sequenze di DNA ricche in adenina. In assenza dell'analita, il DNA a singolo filamento si adsorbe sulla superficie delle AgNP, stabilizzandole e impedendone l'aggregazione anche in presenza di sale. Al contrario in presenza di tale molecola organica, questa si lega alle sequenze di DNA inducendo la formazione di un complesso DNA-coralyne che riduce l'effetto stabilizzante del DNA sulla superficie delle nanoparticelle, in questo modo in presenza di sale le AgNP aggregano. [81a]

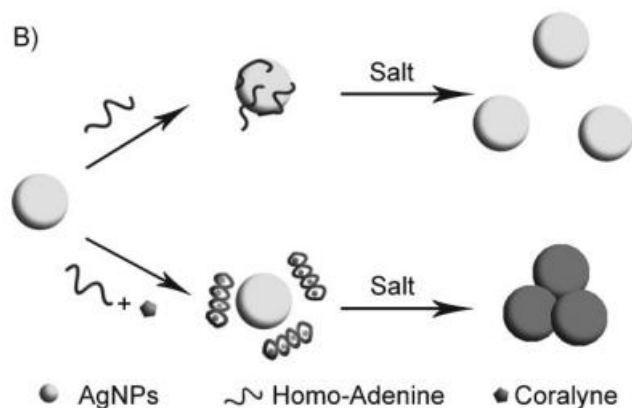


Figura 1.15: Principio di funzionamento del saggio colorimetrico con AgNP e DNA per la rilevazione di una molecola organica (coralyne). [81a]

Un altro esempio di funzionamento di saggio colorimetrico è rappresentato in figura 1.16 in cui le AgNP vengono funzionalizzate con una molecola organica, formando il complesso pSC4–AgNP. In assenza dell'analita le nanoparticelle rimangono disperse e stabili in soluzione, assumendo la classica colorazione che le contraddistingue, ovvero un colore giallo. In presenza dell'analita ovvero un pesticida Optunal che interagisce con le molecole poste sulla superficie delle nanoparticelle, viene indotto un processo di aggregazione. Conseguentemente all'aggregazione si verificherà un cambiamento di colore del colloide da giallo a rosso. [19]

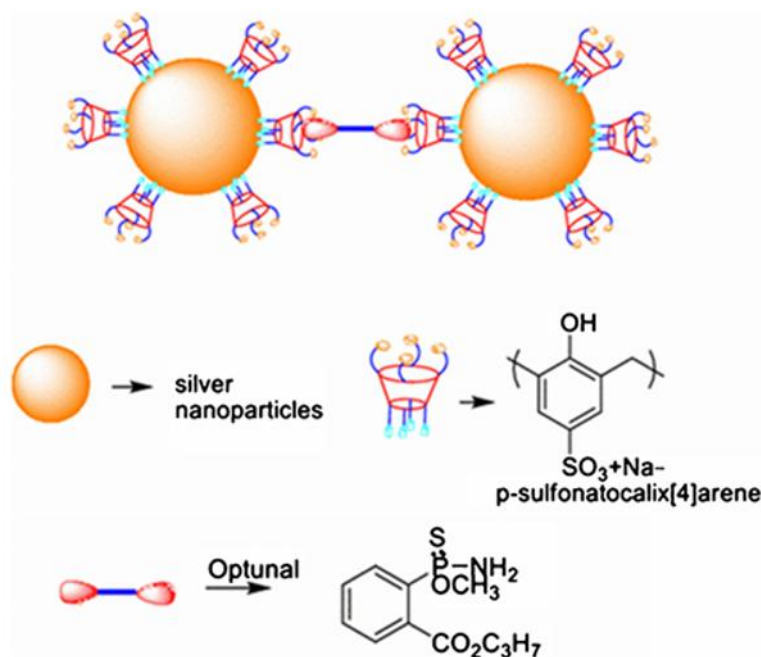


Figura 1.16: Principio di funzionamento del saggio colorimetrico pSC4-AgNP per la rilevazione del pesticida Optunal mediante aggregazione delle nanoparticelle. [19]

La funzionalizzazione con determinate biomolecole permette quindi di stabilizzare stericamente le nanoparticelle, quando la stabilizzazione mediante citrato non risulta sufficiente a garantire stabilità, soprattutto in presenza di tali elettroliti. In questo caso le proprietà plasmoniche vengono preservate e i fenomeni di aggregazione impediti in modo proporzionale alla concentrazione della biomolecola. [75] L'aggregazione indotta da determinate sostanze come il cloruro di sodio è rilevabile mediante variazioni del picco plasmonico. In condizioni di aggregazione, infatti, la formazione di hot spots, regioni sulla superficie delle nanoparticelle e intra-particellari ad elevata intensità del campo elettromagnetico, modifica le proprietà plasmoniche del colloide. Tali hot-spot permettono inoltre di amplificare il segnale Raman dell'analita o di molecole sonda legate alle NP, rappresentando quindi la base per lo sviluppo di applicazioni biosensoristiche basate sulla spettroscopia Surface Enhanced Raman Scattering (SERS). [14, 76,78] Tale strategia costituisce un'alternativa potenzialmente più sensibile rispetto alla rivelazione colorimetrica.

In presenza di determinate biomolecole risulta quindi possibile modulare la stabilità delle nanoparticelle sia stericamente che elettrostaticamente, ottenendo al contempo un miglioramento del segnale rilevabile. In particolare, l'albumina di siero bovino (BSA), ampiamente utilizzata nelle bio-funzionalizzazioni, svolge un ruolo fondamentale nella stabilizzazione di colloidali costituiti da nanoparticelle d'argento. La proteina, infatti, in presenza delle nanoparticelle d'argento, si adsorbe sulla superficie delle stesse mediante formazione di legami tra determinati gruppi funzionali che espongono in superficie, come gruppi carbossilici, amminici e tiolici, e la superficie metallica delle nanoparticelle. [25] Attraverso tale processo, la formazione di una corona proteica attorno alle nanoparticelle modifica il sistema, conferendo in determinate condizioni, maggior stabilità colloidale, sebbene tale rivestimento vari in funzione delle condizioni circostanti, tra cui, ad esempio la presenza di elettroliti. La

formazione di tale complesso, però, dipende da diversi parametri, quali le caratteristiche delle nanoparticelle (in particolare la presenza di superfici curve offre maggior interazione), il pH, poiché influisce sulla carica della proteina, e le proprietà della proteina stessa. [82] La formazione di un complesso proteina – nanoparticella non risulta un processo istantaneo ma è costituito da due step. Nel primo, si verifica la formazione di una “*soft corona*” ovvero la proteina risulta debolmente associata, seguito poi dallo sviluppo di una “*hard corona*” in cui il legame è fortemente più stabile (Fig. 1.17). [80,82] In presenza della BSA, tale adsorbimento è influenzato dalla morfologia delle nanoparticelle: in particolare, la presenza di nanosfere garantisce una forma stabile e uniforme della corona proteica in cui l’interazione tra questi due elementi risulta spontanea e guidata da forze idrofobiche. Secondo tale interazione le regioni apolari della proteina interagiscono con la superficie metallica in modo da minimizzare l’esposizione dei gruppi idrofobici in acqua. [83, 84]

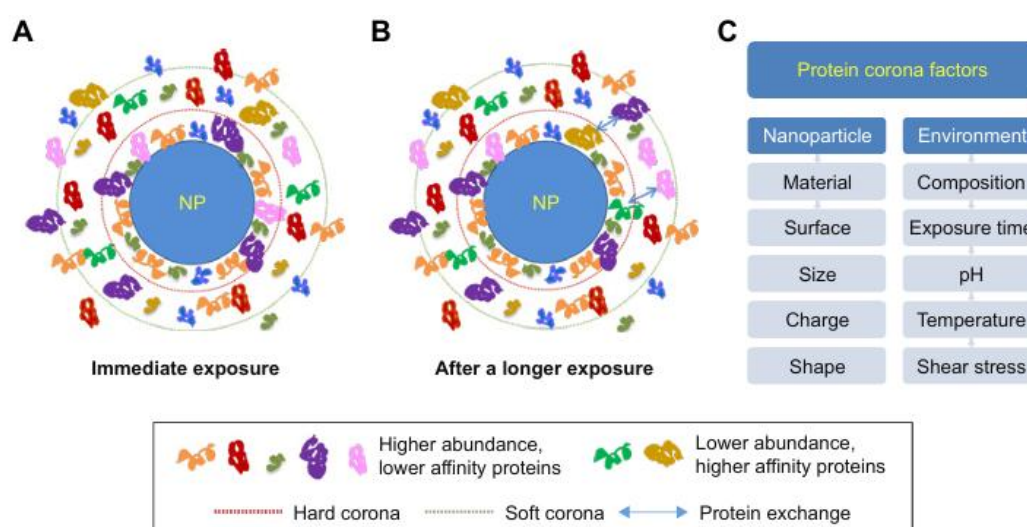


Figura 1.17: Formazione della corona proteica; (A) Formazione soft corona, (B) Formazione hard corona (C) Fattori che influenzano il pattern della corona proteica. [82]

La corona proteica, quindi, introduce una barriera sterica che ostacola il contatto tra le nanoparticelle e conseguentemente contribuisce alla stabilizzazione delle stesse preservando l’aggregazione e conseguente sedimentazione. La formazione della corona proteica, quindi, modifica il bilancio tra le interazioni elettrostatiche e steriche, contribuendo all’aumento della barriera energetica di aggregazione descritta dal modello DLVO. [82,85]

#### 1.4.1 Influenza del cloruro di sodio sulla corona proteica

La presenza della BSA induce quindi la formazione di una corona proteica. L’utilizzo di proteine o molecole stabilizza le nanoparticelle in presenza di determinate molecole. In particolare, nel caso delle nanoparticelle d’argento la presenza di un elettrolita, come il cloruro di sodio, riduce la repulsione elettrostatica e promuove l’aggregazione delle stesse. [86] Tale comportamento è ampiamente discusso in letteratura [35], infatti la presenza di tali elettroliti nella soluzione colloidale induce un cambiamento nello spettro di estinzione, dimostrando come le

nanoparticelle si stiano aggregando. Tale comportamento è visibile anche a occhio nudo, in particolare in Figura 1.18, si osserva come la soluzione colloidale inizialmente gialla/ambrata, cambi in seguito all'aggiunta di carbonato di sodio. Con la destabilizzazione delle NP indotta dal sale, l'intensità del picco plasmonico diminuisce a causa della riduzione delle NP stabili. In presenza di proteine, o molecole differenti, la formazione di un complesso nanoparticelle-BSA e conseguentemente lo sviluppo di una corona proteica attorno alle NP, limitano il contatto tra nanoparticelle e le proteggono dall'aggregazione indotta dal sale. [87] Tale comportamento e quindi l'efficacia del meccanismo è influenzato dalla concentrazione di BSA utilizzata. Utilizzando diverse concentrazioni di BSA, risulta possibile affermare, come già ampiamente discusso in letteratura, come a basse concentrazioni, la quantità di BSA non è sufficiente a garantire una copertura completa delle nanoparticelle, lasciando zone esposte suscettibili all'aggregazione. All'aumentare della concentrazione di proteina, questa induce via via maggiore stabilità anche in presenza di NaCl, garantendo quindi una copertura efficace delle nanoparticelle. [85,87] Questo meccanismo è inversamente proporzionale alla concentrazione di proteina e può essere sfruttato per lo sviluppo di saggi colorimetrici. La struttura della BSA è fortemente dipendente dal pH del mezzo in cui è inserita. In un ambiente con pH inferiore al punto isoelettrico della BSA ( $\text{pH} < 5.5$ ), la proteina risulta protonata, assumendo una carica positiva. [54] In questa situazione prevalgono le interazioni elettrostatiche e la proteina risulterà poco stabile. Questo induce fenomeni di aggregazione delle nanoparticelle. [88] All'aumentare del pH, la proteina risulterà via via deprotonata assumendo una carica sempre più negativa. In questa situazione le interazioni elettrostatiche tra molecole proteiche diventano repulsive contribuendo quindi ad una maggior stabilità colloidale. [89] In tale contesto, la presenza degli elettroliti gioca un ruolo importante, essi infatti diminuiscono la repulsione tra le molecole di BSA, riducendo la stabilità del colloide. [85] In presenza di elevate forze ioniche indotte dal sale, le interazioni elettrostatiche si riducono poiché il sale agisce sulle stesse minimizzandole, in questo modo prevalgono le forze attrattive, come le forze di van der Waals che determinano l'aggregazione delle NP. Questo fenomeno determina una denaturazione e/o riorganizzazione strutturale della corona proteica che conseguentemente compromette la stabilità del colloide. [80]

La presenza di elettroliti, modifica inoltre l'equilibrio di adsorbimento/desorbimento della corona proteica, influenzando l'interazione del complesso nanoparticella-proteina. In assenza di opportune funzionalizzazioni, le nanoparticelle incubate con elettroliti, tendono ad aggregare. Al contrario, la presenza di una corona proteica attorno alle AgNP, le stabilizza e in presenza di NaCl il complesso nanoparticella-BSA non viene perturbato. [87,88]

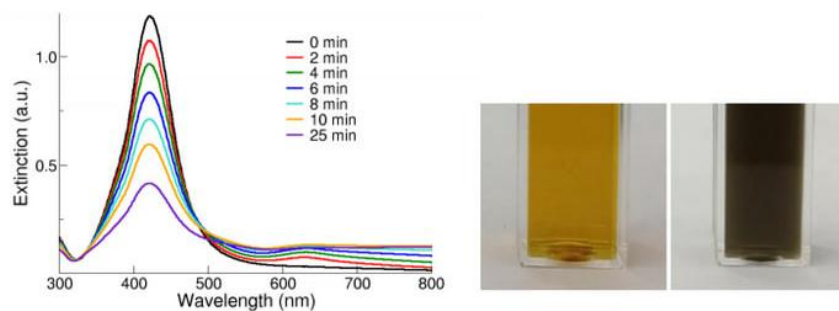


Figura 1.18: Evoluzione temporale degli spettri di estinzione UV-Vis di una sospensione di nanoparticelle d'argento a seguito dell'aggiunta al colloide di carbonato di sodio. [35]

## 1.5 Scopo del lavoro

Negli ultimi anni, le nanotecnologie hanno assunto un ruolo di fondamentale importanza in ambito biomedico. Le nanoparticelle metalliche destano un enorme interesse scientifico grazie alle loro peculiari proprietà, in particolare per quelle ottiche, governate dal fenomeno della risonanza plasmonica di superficie. Questo lavoro di tesi, inserendosi in tale contesto, è focalizzato sulla sintesi riproducibile e la successiva caratterizzazione di nanoparticelle d'argento (AgNP) da utilizzare nello sviluppo di un saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica. Nel saggio analizzato in questo lavoro di tesi, la funzionalizzazione delle NP è stata effettuata mediante semplici metodi di adsorbimento fisico, realizzando un sistema altamente sensibile e particolarmente utile per la rilevazione proteica, in quanto si basa su un metodo rapido e di facile lettura. Questo parametro risulta infatti spesso fondamentale in ambito biomedico, ma anche agroalimentare.

L'instabilità intrinseca delle soluzioni colloidali di AgNP, spesso suscettibili a fenomeni di aggregazione, rappresenta una delle sfide principali per le loro applicazioni moderne. Al fine di realizzare un sistema efficiente, la prima fase della ricerca è quindi dedicata all'ottimizzazione del processo di sintesi, basato sulla riduzione chimica di un precursore dell'argento con acido ascorbico e sodio citrato. L'influenza di parametri chiave come pH, temperatura e tempo di reazione sarà valutata rispetto alle proprietà morfologiche, alle dimensioni e alla stabilità del colloide risultante. In particolare, mediante un controllo sul pH è possibile ottenere nanoparticelle d'argento con dimensioni e morfologia controllata, mentre il controllo sulla temperatura regola la velocità di reazione. Infine, un controllo sul tempo di reazione permette di individuare il tempo ottimale per l'ottenimento della giusta morfologia e stabilità del colloide finale, evitando fenomeni di aggregazione e precipitazione delle nanoparticelle causati dalla progressiva perdita di stabilità.

Per la valutazione delle proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle tutti i colloidi saranno caratterizzati tramite spettroscopia UV-Vis per individuare la lunghezza d'onda alla quale si ha la risonanza plasmonica e tramite microscopia elettronica a scansione tramite *Field Emission Scanning Electron Microscopy* (FESEM) per ottenere dimensioni e forma delle nanoparticelle d'argento, potendo così effettuare un confronto con i dati ricavati dagli spettri UV-Vis. I diametri saranno stimati direttamente dalle immagini acquisite, o tramite un algoritmo Matlab sviluppato ad hoc nel corso della tesi. I valori ottenuti saranno confrontati anche con la misura

tramite *Dynamic Light Scattering* (DLS). Grazie alle diverse caratterizzazioni, per i vari colloidi saranno inoltre valutati la concentrazione e la superficie disponibile delle nanoparticelle, oltre al diametro medio.

Successivamente, le nanoparticelle ottimizzate saranno impiegate per lo sviluppo del saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica.

In tale saggio, le AgNP sono incubate con una concentrazione variabile di BSA e successivamente, viene aggiunta una certa concentrazione di NaCl per indurre l'aggregazione delle nanoparticelle. L'utilizzo nel saggio della BSA come proteina modello è giustificato dalla sua facile reperibilità, dall'economicità e dal largo impiego negli studi biochimici come riferimento. Tipicamente le soluzioni di nanoparticelle metalliche mostrano un tipico colore dovuto all'assorbimento ad una determinata lunghezza d'onda e quindi alla presenza di risonanze plasmoniche delle nanoparticelle stesse, disperse nel solvente. La dispersione è dovuta alla presenza di molecole stabilizzanti che mantengono la separazione delle diverse nanoparticelle in soluzione. L'aggiunta di sale perturba il sistema e induce l'aggregazione delle nanoparticelle e, di conseguenza, una variazione della lunghezza d'onda di assorbimento della risonanza plasmonica che si traduce in un cambio di colore della soluzione. La presenza della BSA, quindi, adsorbendosi sulla superficie delle nanoparticelle, le protegge dall'aggregazione indotta dal sale come illustrato in Figura 1.19.

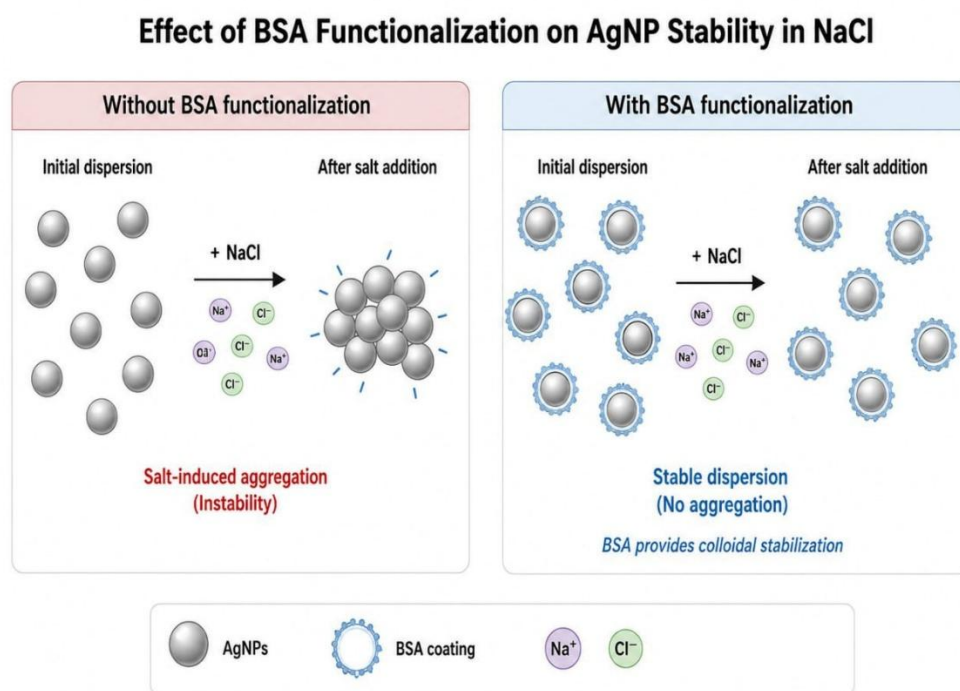


Figura 1.19: Schema rappresentativo del sistema NP–BSA–NaCl e formazione della corona proteica. [Immagine generata con IA]

In una prima fase, verrà valutata la stabilità colloidale in presenza del sale, in seguito sarà individuato il "range ottimale" di proteina necessario per saturare la superficie e proteggere le particelle dall'aggregazione indotta dal sale. In particolare, si studierà come i risultati del saggio colorimetrico, e quindi la suscettibilità all'aggregazione per mezzo di NaCl, siano influenzati

dalle diverse caratteristiche morfologiche delle nanoparticelle, precedentemente ottenute variando il pH di sintesi, al fine di individuare le condizioni ottimali per la stabilità del sistema. Una volta individuato un colloide con le caratteristiche migliori per il saggio colorimetrico, saranno ottimizzati alcuni parametri. Tra questi, verrà indagato l'effetto del tempo di incubazione delle nanoparticelle con la BSA, per garantire a quest'ultima di disporsi correttamente sulla superficie delle nanoparticelle, l'utilizzo di concentrazioni di sale differenti per valutare la stabilità dello "scudo" proteico ed infine l'utilizzo di concentrazioni differenti di BSA per testare e definire il range dinamico del saggio analitico.

I risultati ottenuti saranno successivamente interpretati considerando le concentrazioni teoriche di BSA necessarie al completo ricoprimento della superficie delle NP ricavate a partire dai diametri medi stimati mediante FESEM e DLS. Attraverso tali conti verrà stimata la superficie disponibile totale delle nanoparticelle ed il grado di ricoprimento teorico da parte della BSA, mettendo in relazione l'area disponibile del sistema colloidale con l'area occupata dalla proteina adsorbita.

Infine, le interazioni tra il sistema colloidale e le biomolecole saranno investigate non solo per via colorimetrica, ma anche sfruttando la spettroscopia *Surface-Enhanced Raman Scattering* (SERS), la quale consente di incrementare il segnale di scattering Raman delle molecole di interesse adsorbite sulla superficie delle nanoparticelle, ampliando così le potenzialità applicative e la sensibilità del metodo sviluppato. Tale tecnica, in particolare, permette il rilevamento di analiti anche a concentrazioni molto basse. Per tale ragione, il colloide ottimizzato sarà utilizzato per ulteriori prove focalizzate all'applicazione della spettroscopia SERS, utilizzando l'acido 4-mercaptobenzoico (4-MBA) come reporter Raman, per cercare di aumentare la sensibilità del saggio colorimetrico sviluppato. In particolare, l'aggregazione indotta dal sale genera "hot spot" che determinano un incremento del segnale del 4-MBA, rilevabile mediante SERS. La funzionalizzazione delle NP con 4-MBA permette di introdurre nel sistema colloidale una molecola sonda, il cui segnale SERS noto viene amplificato in modo inversamente proporzionale alla concentrazione di proteine. Dopo una prima valutazione della fattibilità della misura tramite SERS, per valutare come la presenza della BSA e del sale vadano ad influenzare l'intensità del segnale generato dal reporter, l'utilizzo di diverse concentrazioni proteiche permetterà quindi di identificare con precisione il range dinamico utile, entro il quale l'intensità del segnale SERS risulta riproducibile e rilevabile. La sensibilità del saggio colorimetrico e SERS sarà infine stimata attraverso il calcolo dei limiti di rivelabilità e di quantificazione a partire dalle curve di calibrazione.

## Capitolo 2

### Materiali e Metodi

#### 2.1 Sintesi di nanoparticelle d'argento

Per ottenere sistemi colloidali stabili di nanoparticelle d'argento con dimensioni nanometriche, è stata utilizzata la riduzione chimica in soluzione acquosa. La reazione è stata condotta in un volume finale pari a 8 ml, utilizzando una miscela di reazione contenente acido ascorbico 0.60 Mm, citrato di sodio 3.0 Mm e acqua deionizzata. Il pH della soluzione è stato aggiustato mediante aggiunta di idrossido di sodio. La formazione delle NP è avvenuta dopo aver aggiunto alla miscela di reazione 80  $\mu$ l di una soluzione di  $\text{AgNO}_3$  100 Mm, in modo tale da avere una concentrazione finale di 1 Mm di precursore.

Per la sintesi sono stati inizialmente miscelati acqua deionizzata, citrato di sodio e acido ascorbico. Successivamente è stato aggiustato il Ph con l'aggiunta di una soluzione di idrossido di sodio. La miscela di reazione è stata quindi posta in un bagno d'acqua su una piastra riscaldante con agitazione magnetica, impostando una temperatura di 30 °C e una velocità di agitazione pari a 650 rpm. Una volta raggiunte le condizioni di temperatura e agitazione desiderate, è stata aggiunta la soluzione di nitrato d'argento ( $\text{AgNO}_3$ ) alla miscela di reazione. Il sistema è stato mantenuto sotto agitazione continua per 5 minuti, consentendo lo svolgimento della reazione di riduzione e la formazione delle nanoparticelle d'argento.

Sono state realizzate diverse sintesi, variando il Ph, la temperatura e il tempo di reazione. In particolare, per alcune sintesi sono stati aggiunti volumi differenti di NaOH per regolare il Ph in un range compreso tra 7.0 e 12.0. Oppure, è stata variata la temperatura di reazione (20 °C, 30 °C e 40 °C), o il tempo di reazione (5, 15 e 30 minuti).

##### 2.1.2 Separazione delle nanoparticelle tramite centrifugazione

Al termine della sintesi, i campioni ottenuti sono stati centrifugati al fine di ottenere la frazione di pellet (fase sedimentata) e il surnatante (fase dispersa). Tale passaggio risulta fondamentale per riuscire a separare le nanoparticelle dai residui di reazione e per isolare il pellet e surnatante utili ad analisi successive. In particolare, 1 ml di soluzione colloidale è stato inserito in una provetta da 1,5 ml e sottoposto a centrifugazione a 13200 rpm per 5 minuti, al fine di ottenere la separazione. Al termine della centrifugazione, il surnatante è stato prelevato, mentre il pellet è stato risospeso in un volume variabile di acqua ultra-pura al fine di ottenere una densità ottica (OD) di circa 1. Il raggiungimento di tale valore risulta utile ad evitare la saturazione del segnale e assicurare una buona riproducibilità e

confrontabilità tra i campioni ottenuti nelle fasi successive. La procedura di separazione è schematizzata Tabella 2.1.

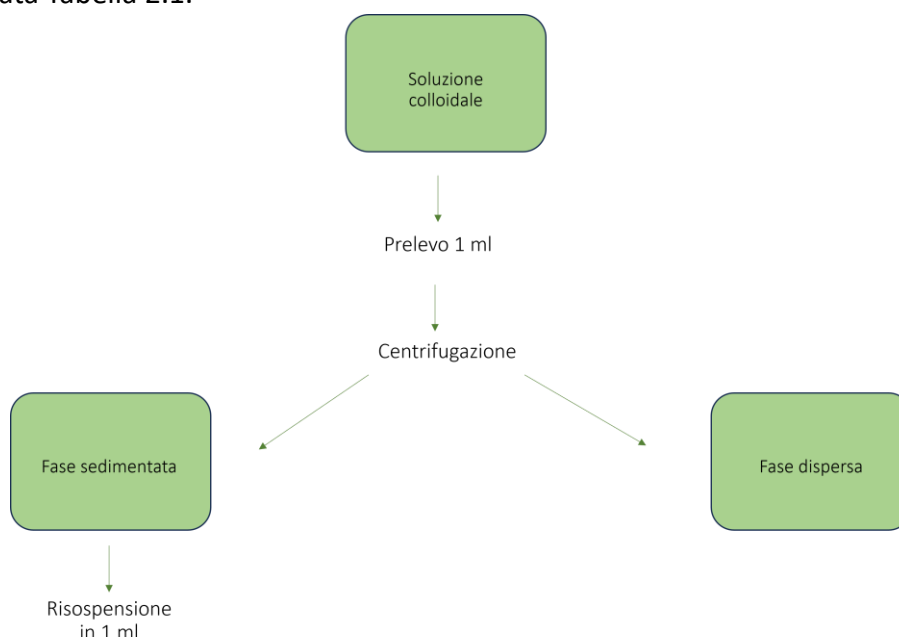


Tabella 2.1: Illustrazione dei passaggi eseguiti per la centrifugazione.

## 2.2 Caratterizzazione

I campioni ottenuti sono stati caratterizzati mediante diverse tecniche analitiche, al fine di valutarne le proprietà ottiche, la distribuzione dimensionale e il diametro medio delle nanoparticelle attraverso la loro interazione con la luce tramite spettroscopia UV-Vis e Dynamic Light Scattering. La morfologia è stata inoltre investigata mediante microscopia elettronica a scansione ad emissione di campo (FESEM).

### 2.2.1 Caratterizzazione UV-Vis

Mediante spettrofotometria UV-Vis i campioni sono stati analizzati al fine di ottenere un'analisi quantitativa e qualitativa delle caratteristiche delle nanoparticelle. In particolare, a partire dai campioni ottenuti a pH, temperatura e tempo di reazione differenti è stato possibile avere un'iniziale stima della concentrazione e della grandezza delle nanoparticelle in funzione dell'interazione del colloide con la luce. Tale tecnica si basa sull'assorbimento della radiazione elettromagnetica nel campo UV e visibile da parte delle nanoparticelle analizzate. In particolare, il fascio di luce prodotto da una sorgente luminosa viene inviato ad un monocromatore che scompone la luce nelle sue componenti spettrali, così da isolare le lunghezze d'onda di interesse. La luce viene successivamente indirizzata al campione, il quale assorbe una parte della radiazione luminosa in base alle proprie caratteristiche. La luce non assorbita colpisce un rivelatore, il quale convertirà l'intensità luminosa in un segnale elettrico,

trasformato successivamente in valori di assorbanza, ovvero un parametro che permette di quantificare l'assorbimento della radiazione luminosa da parte della soluzione esaminata (Fig.2.1)

Per la misura è stata utilizzata una cella per piccoli volumi (Traycell, Hellma) con un cammino ottico di 1 mm e per ogni campione sono stati misurati 4 µl. Gli spettri sono stati acquisiti tra 300 e 700 nm. Gli spettri risultano già corretti rispetto al bianco, poiché viene acquisito prima della misura uno spettro dell'acqua MilliQ utilizzata come riferimento per la linea di base.

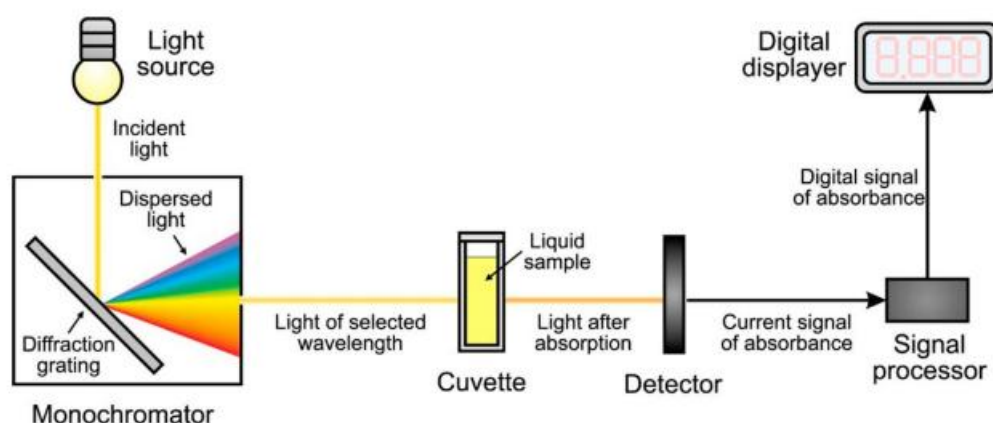


Figura 2.1: schema illustrativo del funzionamento di uno spettrofotometro. [90]

Gli spettri ottenuti hanno in ascissa la lunghezza d'onda e in ordinata l'assorbanza ( $A$ ). Tale parametro segue tale formula:

$$A = \log_{10} (T)$$

dove  $T$  è la trasmittanza, cioè il rapporto tra l'intensità della radiazione trasmessa,  $I$ , e l'intensità,  $I_0$ , della luce incidente. Mediante la legge di Lambert-Beer si relazionano assorbanza e concentrazione della soluzione:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot d \cdot c$$

dove  $c$  è la concentrazione della soluzione espressa come mol/L,  $\varepsilon(\lambda)$  è il coefficiente di assorbimento molare espresso come  $L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ed è il cammino ottico espresso in cm, ovvero lo spessore della soluzione attraversato dalla luce monocromatica che nel nostro caso compie un percorso pari a 1 mm. [91]

## 2.2.2 Caratterizzazione FESEM e DLS

L'analisi FESEM ha come obiettivo la valutazione della morfologia delle nanoparticelle e la loro dimensione e distribuzione. Le misure sono state eseguite mediante il sistema FESEM SUPRA 40 della Zeiss, che sfrutta una sorgente a emissione di campo (FEG) per la generazione del fascio elettronico utilizzato per bombardare e scansare la superficie del campione. Tale sorgente, costituita tipicamente da un filamento appuntito di tungsteno, genera un fascio di

elettroni ad alta energia che permette una risoluzione superiore rispetto ai classici microscopi SEM (Fig. 2.2). Il segnale prodotto dall'interazione tra fascio elettronico e campione, generato da elettroni primari (elettroni ad elevata energia che hanno origine dalla retrodiffusione del fascio incidente) e secondari (elettroni con bassa energia che provengono solo dagli strati più superficiali del campione) viene utilizzato per ricostruire immagini ad alta risoluzione della morfologia. [92]

Da ogni campione sintetizzato è stato prelevato 1  $\mu\text{l}$  di dispersione colloidale. La goccia è stata depositata su frammenti di silicio puliti con etanolo, a loro volta fissati mediante nastro conduttivo su stub metallici. Lo strato di silicio rende il campione conduttivo e permette quindi una migliore interazione tra fascio e superficie. Infine, le analisi sono state condotte dopo l'asciugatura della goccia. È stata utilizzata una tensione di accelerazione di 5 kV, una distanza di lavoro di 4 mm e un'apertura di 20  $\mu\text{m}$ . Per ogni campione, sono state acquisite immagini con ingrandimento variabile compreso tra 25 kx e 300 kx.

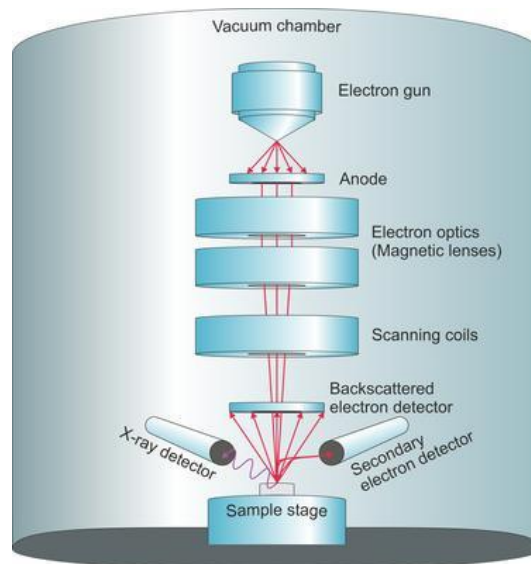


Figura 2.2: Schema generale di funzionamento del FESEM. [93]

Le diverse soluzioni colloidali sono state caratterizzate anche tramite Dynamic Light Scattering (DLS) con uno Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical), utilizzando una cuvette standard da 1 cm di cammino ottico. Per le misure sono stati impostati i seguenti parametri: per l'argento, un indice di rifrazione di 1.59 e un'assorbanza di 0.3, per il solvente (acqua) sono stati indicati un indice di rifrazione di 1.33 e una viscosità di 0.8872 cP, per la temperatura 25 °C, il tempo di equilibrio di 60 secondi. Ogni soluzione è stata misurata 3 volte e il dato mediato per ottenere la distribuzione di frequenza per i diversi diametri rilevati.

### 2.2.3 Analisi d'immagine mediante script Matlab

Un campione è costituito da una moltitudine di NP, per cui la misura manuale di pochi diametri dalle immagini FESEM ottenute potrebbe non risultare rappresentativa dell'intero colloide. Per risolvere tale problema, è stato sviluppato uno script Matlab al fine di automatizzare il conteggio e il calcolo delle dimensioni delle NP.

In particolare, a partire da tali immagini, l'analisi delle stesse è avvenuta mediante uno script Matlab progettato per eseguire in modo automatico il riconoscimento delle NP tramite segmentazione e successivo conteggio e caratterizzazione dimensionale. Le fasi del processo possono essere divise in 3 principali passaggi finalizzati all'ottenimento mediante algoritmo riproducibile della misura dei diametri. Essi riguardano:

- Pre-processing e normalizzazione: il codice legge in modo automatizzato il valore in nm della barra di scala sull'immagine e l'ingrandimento utilizzato nell'acquisizione a partire dalle informazioni riportate nel titolo (es.200nm\_100kx) così da determinare il rapporto di conversione da pixel a nanometro. Successivamente effettua un ritaglio automatico della regione di interesse (ROI) per escludere la barra inferiore contenente le informazioni imposte in fase di misura. Tale approccio permette di evitare artefatti nel conteggio delle nanoparticelle, prevenendo errori di interpretazione causati dalla somiglianza morfologica tra le particelle sferiche e alcuni caratteri alfanumerici (come le lettere 'o', 'O' o la cifra '0'), che potrebbero essere erroneamente interpretati come nanoparticelle. Il codice effettua quindi un pre-processing mediante *Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization* (CLAHE). Tale passaggio permette di aumentare il contrasto tra NP e il substrato su cui sono poste e successivamente si applica un filtro Gaussiano per ridurre e/o eliminare il rumore.
- Segmentazione e Watershed: per riuscire ad effettuare una separazione tra nanoparticelle e fondo, è stata implementata una procedura di segmentazione con soglia adattativa (*adaptive thresholding*) anche in presenza di variazioni di luminosità. Tale passaggio è seguito dall'eliminazione di componenti di piccole dimensioni e accoppiata alla trasformata Watershed, che permette di distinguere nanoparticelle aggregate. Attraverso tale metodo, vengono individuati i centri di massa di ogni NP e mediante la Watershed tali informazioni vengono utilizzate per definire in modo automatizzato i confini tra particelle vicine.
- Filtraggio Geometrico: al fine di escludere dal conteggio nanoparticelle con morfologie non uniformi, il codice esegue un filtraggio basato sulla geometria, determinando la circolarità delle NP ed escludendo nanoparticelle non sferiche e con artefatti. Implementa infine anche la funzione "regionprops" e la funzione "Solidity" per il calcolo dell'area e del diametro equivalente.

Per ogni campione si ricavano i diametri di tutte le nanoparticelle e vengono calcolati diametro medio, deviazione standard e il numero totale di particelle analizzate. Per ogni immagine vengono generate delle mappe a contrasto di colori, utili per la verifica qualitativa delle NP presenti, e degli istogrammi con la distribuzionale dimensionale ottenuta come visibile in Figura 2.3.

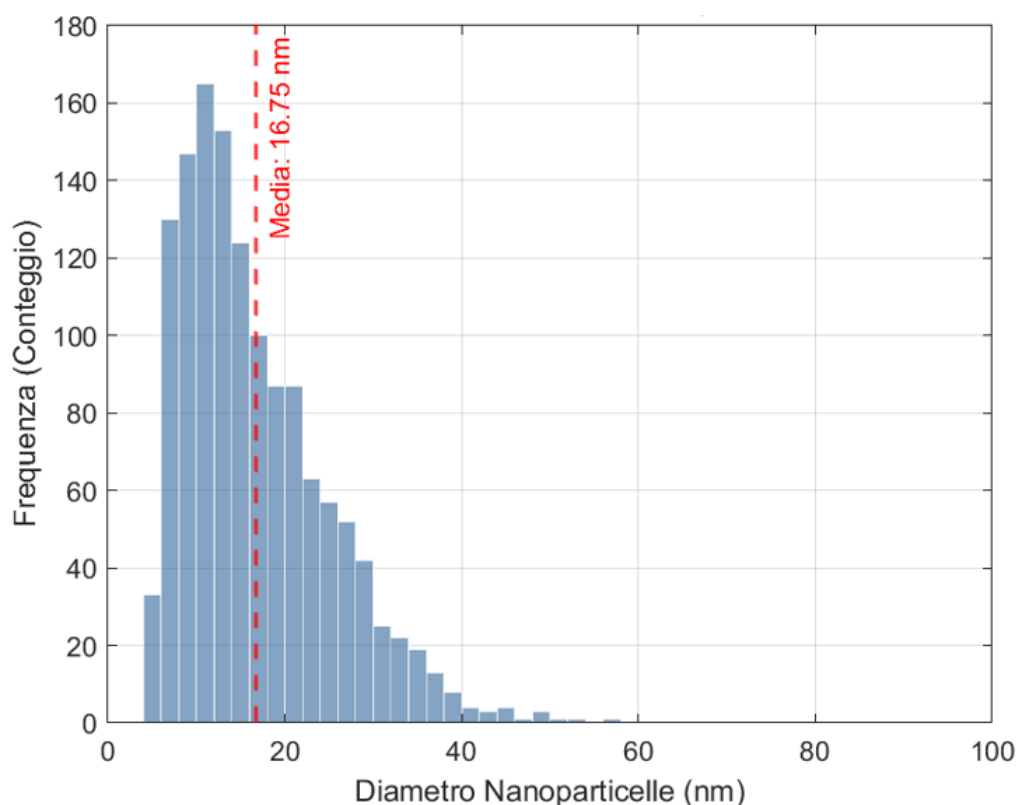


Figura 2.3: Esempio di distribuzione dimensionale ottenuta dall'analisi d'immagine del campione di nanoparticelle a pH=11.5.

Dai valori di diametro medio ottenuti mediante script, sono successivamente stati condotti i medesimi calcoli presenti in Tabella 3.3.

## 2.2.4 Calcolo delle concentrazioni e del numero di nanoparticelle

Mediante le immagini ottenute al FESEM è stato possibile ottenere una stima dei diametri delle NP sintetizzate. Tali valori sono inoltre stati utilizzati per calcolare la concentrazione delle nanoparticelle all'interno del colloide. In particolare, durante l'analisi, per ogni campione sono state effettuate diverse misurazioni al fine di poter ottenere una stima delle dimensioni delle nanoparticelle. Le nanoparticelle sono state approssimate a strutture con morfologia sferica e, per ogni campione, sono stati ricavati i diametri di un numero rappresentativo di particelle. I valori ottenuti sono stati mediati, così da ottenere un diametro medio ( $D_m$ ) rappresentativo del campione, e a partire da tale valore sono stati ricavati area (in  $\text{nm}^2$ ) e volume ( $\text{nm}^3$ ) delle NP.

Per ottenere la concentrazione di NP in ogni colloide, a partire dal diametro medio ottenuto mediante FESEM, script Matlab e DLS è stato calcolato il volume e tale valore è stato successivamente moltiplicato per la densità dell'argento, considerata pari a  $\rho = 1.05 \times 10^{-20} \text{ g/nm}^3$ . Da tale prodotto è stata ottenuta la massa di ogni particella. Successivamente, il numero totale di nanoparticelle è stato ottenuto dal rapporto tra la massa totale di argento e la massa di ogni particella. La massa totale è stata ottenuta dal seguente prodotto  $m = C \times V_{\text{tot}}$

× PM (Ag), in cui C rappresenta la concentrazione del precursore di argento (0.001 M) e  $V_{\text{tot}}$  (8 ml) il volume della soluzione e PM (peso molecolare) il peso molecole dell'argento (107.87 g/mol) considerando una conversione totale dell'AgNO<sub>3</sub>. Infine, sono state calcolate le moli totali di NP attraverso il numero di Avogadro ( $N_A$ ) e da tali valori la concentrazione molare delle nanoparticelle è stata calcolata dividendo il numero di moli per  $V_{\text{tot}}$ .

In Tabella 2.2 sono riportati i valori numerici ottenuti per il campione sintetizzato a pH 11.5, considerando come diametro medio il valore ricavato mediante script.

Tabella 2.2: Parametri sperimentali per il calcolo della concentrazione delle nanoparticelle

|                                |                          |
|--------------------------------|--------------------------|
| <i>Diametro medio (nm)</i>     | 30                       |
| <i>Area (nm<sup>2</sup>)</i>   | $2.83 \times (10^3)$     |
| <i>Volume (nm<sup>3</sup>)</i> | $1.41 \times (10^4)$     |
| <i>Massa (g)</i>               | $1.48 \times (10^{-16})$ |
| <i>Numero di particelle</i>    | $5.81 \times (10^{12})$  |
| <i>Moli (mol)</i>              | $9.66 \times (10^{-12})$ |
| <i>Concentrazione (M)</i>      | $1.21 \times (10^{-9})$  |

Per ogni diametro medio ottenuto (FESEM, DLS e script Matlab) è stato ottenuto un grafico a dispersione (Fig. 3.14). In particolare, sono stati rappresentati i diametri medi in funzione del pH. Ad ogni diametro è stata associata la rispettiva barra d'errore che corrisponde alla deviazione standard. Per il FESEM la barra d'errore è stata calcolata utilizzando la semidispersione del dato (mediante la differenza tra il valore massimo di diametro misurato e il valore minimo diviso due).

## 2.3 Saggio per la determinazione delle proteine

L'utilizzo di tale saggio ha come obiettivo lo sviluppo di un metodo per la determinazione della concentrazione proteica, utilizzando la BSA come proteina modello. La presenza di tale proteina a determinate concentrazioni induce una completa copertura delle nanoparticelle tale da prevenire l'aggregazione in presenza di NaCl e stabilizzare il sistema. In base allo stato di aggregazione delle NP dopo l'aggiunta del sale si ottiene un colore caratteristico e si può misurare un valore di intensità in corrispondenza del picco di massimo assorbimento plasmonico che sarà prossimo a zero per nanoparticelle totalmente aggregate e simile al colloide di partenza (leggermente diluito) per concentrazioni di BSA in grado di schermare le NP dall'effetto dell'NaCl. L'aggregazione sarà quindi inversamente proporzionale alla concentrazione di proteina.

### 2.3.1 Saggio colorimetrico con BSA

I campioni di nanoparticelle ottenuti (tal quale, pellet e surnatante) sono stati utilizzati per realizzare un saggio colorimetrico per la rivelazione della BSA, scelta come proteina modello, a partire da un saggio proposto in letteratura. [81] Questo approccio colorimetrico utilizza

nanoparticelle non modificate, rivelandosi un metodo semplice, a basso costo e con elevata sensibilità. Il saggio è stato condotto in piastre multi-pozzetto (96 pozzetti, fondo piatto, non trattate, Greiner).

In ciascuna condizione sperimentale sono stati utilizzati 100  $\mu\text{L}$  di sospensione colloidale, un volume variabile di soluzione di BSA 1 mg/ml e acqua MilliQ. La miscela costituita da nanoparticelle, BSA e acqua è stata incubata per 10 minuti. Successivamente, alla miscela sono stati aggiunti 10  $\mu\text{L}$  di NaCl 5 M, incubati per ulteriori 10 minuti. Per poter valutare l'interazione tra nanoparticelle e BSA, i campioni sono stati preparati incubando le NP con BSA a concentrazioni crescenti. Le concentrazioni includono: [0, 8.3, 16, 25, 33, 50, 66.6, 83]  $\mu\text{g/ml}$ . A parte le prime prove di ottimizzazione per riadattare il saggio da misura con spettrofotometro UV-Vis a lettore di piastre, tutte le prove sono state condotte mantenendo un volume finale costante di 120  $\mu\text{L}$  per pozzetto.

Sono stati ottenuti in totale 9 campioni (Tabella 2.3). Il primo campione presente è rappresentato dal controllo, ovvero una soluzione di NP e acqua utilizzato come condizione di riferimento.

Tabella 2.3: Volumi dei componenti impiegati nelle procedure di saggio colorimetrico.

| Campione                  | AgNP ( $\mu\text{L}$ ) | BSA ( $\mu\text{L}$ ) | H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ ) | NaCl ( $\mu\text{L}$ ) |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------|
| Controllo                 | 100                    | 0                     | 20                                 | 0                      |
| 0 ( $\mu\text{g/ml}$ )    | 100                    | 0                     | 10                                 | 10                     |
| 8.3 ( $\mu\text{g/ml}$ )  | 100                    | 1                     | 9                                  | 10                     |
| 16 ( $\mu\text{g/ml}$ )   | 100                    | 2                     | 8                                  | 10                     |
| 25 ( $\mu\text{g/ml}$ )   | 100                    | 3                     | 7                                  | 10                     |
| 33 ( $\mu\text{g/ml}$ )   | 100                    | 4                     | 6                                  | 10                     |
| 50 ( $\mu\text{g/ml}$ )   | 100                    | 6                     | 4                                  | 10                     |
| 66.6 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 100                    | 8                     | 2                                  | 10                     |
| 83 ( $\mu\text{g/ml}$ )   | 100                    | 10                    | 0                                  | 10                     |

La misura è stata fatta misurando lo spettro tra 300 e 700 nm con un lettore di piastre (MultiskanGO, ThermoFisher). Il principio di funzionamento prevede di irradiare i campioni con una luce incidente diretta dal basso verso il pozzetto (Fig. 2.4).

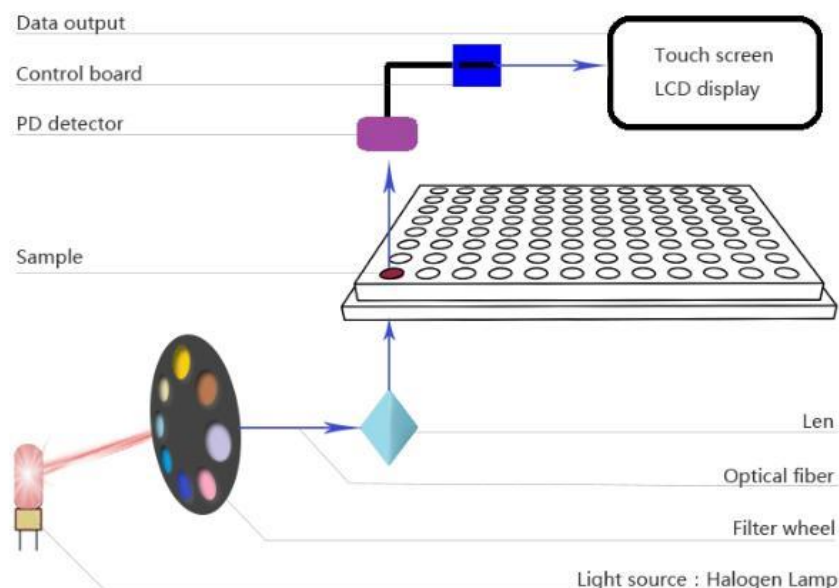


Figura 2.4: Rappresentazione schematica di un lettore di micropiastre per analisi spettrofotometriche. [94]

### 2.3.2 Analisi della concentrazione teorica e reale di BSA adsorbita sulle nanoparticelle

Per ogni sintesi è stato considerato il diametro medio (per una sintesi con  $D_m=30$  nm i calcoli per ricavare la concentrazione sono presenti in Tabella 3.3, 3.4) ed è stata calcolata la concentrazione teorica di BSA da utilizzare al fine di garantire la stabilità del colloide. Successivamente, tali valori sono stati confrontati con i valori reali, effettivamente utilizzati per lo sviluppo del saggio colorimetrico.

Sono state inizialmente calcolate le moli di NP disponibili come prodotto tra la concentrazione finale di NP precedentemente determinata e il volume totale della soluzione ( $V_{tot}$ ). Successivamente è stato calcolato il numero di particelle totali presenti in 8 ml, ma considerando che nel saggio è stato utilizzato un volume pari a 120  $\mu$ L, mediante un rapporto pari a 120/8000 è stato ottenuto un fattore di scala necessario a ottenere il numero totale di particelle presenti nelle condizioni sperimentali analizzate.

Successivamente è stata calcolata la superficie totale delle nanoparticelle disponibile all'adsorbimento della BSA. Per la BSA sono stati considerati due valori di area: Area min= 28.6403  $\text{nm}^2$  e Area max= 40.8850  $\text{nm}^2$ , a seconda dell'orientazione assunta dalla BSA sulla superficie della NP, utilizzando delle valutazioni bioinformatiche precedentemente sviluppate in laboratorio [105]. Tali valori sono stati utilizzati per determinare il numero di molecole necessarie a saturare la superficie di una singola nanoparticella mediante un rapporto tra l'area della BSA e l'area delle NP. In seguito, per confrontare direttamente i valori teorici ottenuti mediante i calcoli stimati a partire dal diametro medio e i valori effettivamente utilizzati durante lo svolgimento del saggio, le diverse concentrazioni utilizzate sono state trasformate in numero di molecole. In particolare, è stata inizialmente calcolata la massa di BSA utilizzata per ogni concentrazione proteica utilizzata (0, 8.3, 16, 25, 33, 50, 66.6, 83)  $\mu\text{g/ml}$ .

Tale valore è stato diviso per il peso molecolare della BSA (66432.90 g/mol) al fine di ottenere le moli ed infine, il valore ottenuto è stato moltiplicato per Na. Il numero di molecole ottenuto mediante tali calcoli è riportato in Tabella 2.4.

Tabella 2.4: Determinazione della massa, delle moli e del numero di molecole di BSA per ciascuna concentrazione del saggio.

| Concentrazione ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Massa ( $\mu\text{g}$ ) | Moli (mol)            | Numero Molecole      |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 0                                   | 0                       | 0                     | 0                    |
| 8.3                                 | 0.996                   | $1.5 \times 10^{-11}$ | $9.0 \times 10^{12}$ |
| 16                                  | 1.92                    | $2.9 \times 10^{-11}$ | $1.7 \times 10^{13}$ |
| 25                                  | 3.00                    | $4.5 \times 10^{-11}$ | $2.7 \times 10^{13}$ |
| 33                                  | 3.96                    | $6.0 \times 10^{-11}$ | $3.6 \times 10^{13}$ |
| 50                                  | 6.00                    | $9.0 \times 10^{-11}$ | $5.4 \times 10^{13}$ |
| 66.6                                | 7.99                    | $1.2 \times 10^{-10}$ | $7.2 \times 10^{13}$ |
| 83                                  | 9.96                    | $1.5 \times 10^{-10}$ | $9.0 \times 10^{13}$ |

## 2.4 Analisi Raman

Il saggio di detection delle proteine totali è stato riadattato per la misura tramite spettroscopia Raman in versione amplificata (SERS). I campioni incubati con MBA, BSA e NaCl sono stati quindi analizzati tramite un microscopio Raman inVia Qontor (Renishaw). La tecnica SERS permette di ottenere principalmente informazioni qualitative, ma anche semi-quantitative. È infatti possibile ottenere informazioni sulla composizione chimica del campione e studiare l'effetto che le molecole hanno quando vengono adsorbite sulla superficie di interesse. [95] Dal punto di vista delle informazioni semi-quantitative, a partire dall'intensità dei picchi Raman, è possibile ottenere una stima della concentrazione e dei composti adsorbiti. Il principio di funzionamento è illustrato in Figura 2.5.

Per le analisi SERS, 10  $\mu\text{L}$  di soluzione sono stati depositati su vetrino da microscopio rivestito con un foglio di alluminio, in modo da eliminare l'interferenza dovuta al segnale Raman del vetro stesso. Le acquisizioni sono state condotte utilizzando una sorgente laser a 785 nm con una potenza sul campione impostata al 5% di quella in uscita (250 mW). In seguito a test preliminari, il tempo di esposizione è stato impostato a 15 secondi e sono stati eseguiti 3 accumuli per ogni campione. Il segnale è stato raccolto in *backscattering*, utilizzando un obiettivo da microscopio 10x o 20x (come dettagliato nella sezione relativa ai risultati).

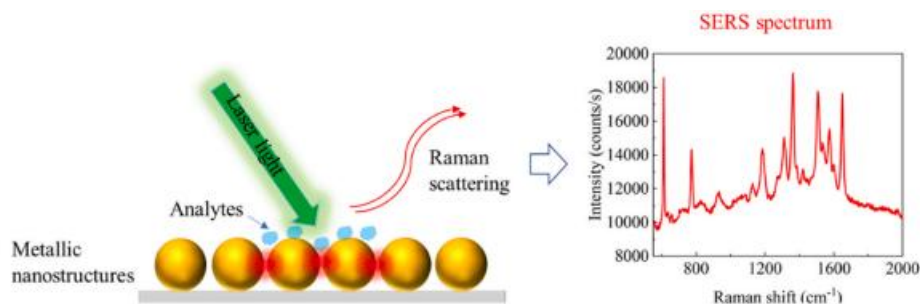


Figura 2.5: Illustrazione schematica dell'interazione tra campione e sorgente Raman. [96]

Tale prova è stata condotta su sintesi a pH differente al fine di valutare mediante gli spettri Raman:

- La conferma dell'avvenuta funzionalizzazione con MBA, in particolare come esso agisca da molecola reporter e se avvenga un legame con le nanoparticelle d'argento.
- Monitorare l'assorbimento della BSA in funzione della concentrazione utilizzata che può modificare l'ambiente chimico, schermando la superficie in maniera differente e alterare l'intensità del segnale SERS della molecola di MBA. La sua presenza inoltre può introdurre le bande vibrazionali caratteristiche delle proteine consentendo di studiare la formazione della corona proteica;
- Studiare l'effetto dell'aggiunta di cloruro di sodio. In assenza di funzionalizzazioni efficaci, l'elettrolita tende a ridurre la stabilità del colloide favorendo l'aggregazione e inducendo la formazione di hot spot;
- Studiare l'interazione tra le nanoparticelle e le molecole ai vari pH, e verificare come esse cambino la loro distribuzione e/o legame in funzione di morfologia e concentrazione.

#### 2.4.1 Saggio con MBA e BSA per applicazioni Raman

Lo schema rappresentativo dell'interazione tra nanoparticelle, MBA e BSA è rappresentato in Figura 2.6. In particolare, inizialmente si verifica un'interazione tra NP-MBA, successivamente incubate con BSA. La presenza di NaCl perturba il sistema, generando hot-spot nel caso di funzionalizzazione proteica non efficiente.

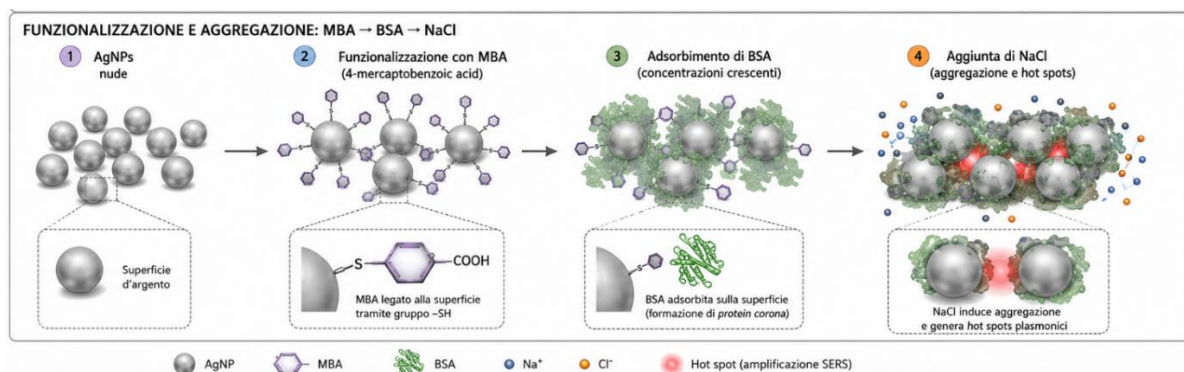


Figura 2.6: Schema rappresentativo del saggio riadattato per la misura tramite spettroscopia Raman amplificata (SERS) in cui si mostra in modo schematico l'interazione tra NP, MBA, BSA e NaCl. [Immagine generata con IA]

Le prove sono state effettuate incubando le nanoparticelle con una molecola reporter, l'MBA ( $10^{-5}$  M in acqua, ottenuto da stock 10 mM in etanolo). Tale molecola è stata incubata con le nanoparticelle per 10 minuti, successivamente sono stati preparati 9 campioni con una concentrazione differente di BSA, utilizzando rispettivamente stock di BSA in acqua MilliQ 1 mg/ml, 250 µg/ml e 100 µg/ml, a seconda del range proteico indagato, rispettivamente compreso tra 0 e 83 µg/ml, 0 e 20.88 µg/ml e tra 0 e 8.33 µg/ml. Tale incubazione è avvenuta per ulteriori 10 minuti, seguita da un altro step di incubazione con NaCl. La concentrazione di NaCl utilizzata è stata variata da 5 M a 1 M al fine di ottimizzare il saggio e ottenere un segnale più intenso e riproducibile.

In particolare, in una provetta da 1.5 ml sono stati aggiunti 1045 µl di soluzione contenente nanoparticelle e 55 µl di MBA. 100 µl di soluzione sono stati prelevati e inseriti in ogni pozzetto. Ogni campione è stato incubato con BSA a diversa concentrazione µg/ml. Per ogni campione il volume totale è pari a 120 µl di cui: 100 µl di NP + MBA, 10 µl NaCl e un volume variabile di acqua e BSA.

Le diverse miscele di reazione contenenti nanoparticelle-MBA, BSA a diversa concentrazione ed NaCl sono state misurate con il lettore di piastre e successivamente mediante spettroscopia SERS. La misura SERS ha come scopo la verifica della presenza della molecola reporter (MBA) e la valutazione delle variazioni di interazione della stessa in presenza di concentrazioni differenti di BSA a seguito dell'aggregazione indotta dall'NaCl. La presenza di MBA e BSA modifica il comportamento delle nanoparticelle, influenzando la risposta SERS e variando l'intensità del segnale finale [32]

Tutte le analisi sono state condotte su goccia, metodo che permette di concentrare le nanoparticelle in uno spazio minore e consente un'analisi locale della distribuzione e dell'aggregazione.

A partire dai dati sono state ottenute due curve di calibrazione che riportano l'area del picco principale dell'MBA in funzione della concentrazione di proteina (curve Area ( $1078\text{ cm}^{-1}$ ) - [BSA]). (Fig. 3.39), Le aree sono state calcolate integrando l'area del picco vibrazionale ed effettuando la media dei valori ottenuti dalle tre repliche di ogni campione.

Per confrontare i risultati ottenuti nelle prove a più bassa concentrazione di BSA (tra 0 e 20.88 µg/ml e tra 0 e 8.33 µg/ml) è stato necessario eseguire una normalizzazione al fine di ottenere grafici con intensità confrontabili tra loro, riducendo le variazioni dovute a differenze sperimentali. In particolare, considerando il picco caratteristico dell'MBA a maggior intensità, posto a  $1078\text{ cm}^{-1}$ , è stato fatto il rapporto tra l'intensità del picco ottenuto dalle prove effettuate nel range tra 0 e 8.33 µg/ml e quella del picco ottenuto utilizzando il range tra 0 e 20.88 µg/ml per il campione di controllo senza BSA (con concentrazione BSA 0 µg/ml). Dal rapporto ( $I_{100}/I_{250}$ ) è stato ottenuto un fattore di scala con cui è stato possibile normalizzare le intensità del picco della prova nel range tra 0 e 20.88 µg/ml.

## 2.5 Determinazione del LOD e del LOQ

Per determinare la sensibilità del saggio colorimetrico sono stati determinati il limite di rilevabilità (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ). A tale scopo è stata effettuata la media di

tre prove ottenute nelle medesime condizioni sperimentali ottimizzate (incubazione con BSA per 10 minuti ed NaCl 5 M), utilizzando le nanoparticelle sintetizzate con il metodo ottimale (30 °C, tempo di reazione 5 minuti, pH 11.5). In particolare, per ciascuna concentrazione di BSA analizzata è stato considerato il valore massimo del picco plasmonico ( $\lambda_{max}$ ) dello spettro di assorbimento; tali valori sono stati successivamente mediati al fine di ottenere la curva di calibrazione. Dalla curva di calibrazione ottenuta è stato eseguito un fit lineare nel tratto lineare, compreso tra 0 e 50  $\mu\text{g/ml}$ . L'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante il software OriginPro 2016, ottenendo l'equazione della retta:

$$y = a + b \cdot x$$

dove  $a$  rappresenta l'intercetta e  $b$  la pendenza della retta di calibrazione. Il valore di  $R^2$  ricavato dal fit risulta pari a 0.968.

Nel caso considerato l'equazione ottenuta è stata:  $y = 0.35629 + 0.03954 \cdot x$

Successivamente è stata calcolata la media ( $M_{\text{BIANCO}}$ ) e la deviazione standard ( $SD_{\text{BIANCO}}$ ) dei controlli no BSA (con contrazione BSA 0  $\mu\text{g/ml}$ ).

Il LOD è stato calcolato sommando alla media dei bianchi il valore della deviazione standard moltiplicata per 3.3. A tale valore è stato sottratto il valore dell'intercetta e infine il numero ottenuto è stato diviso per la pendenza. Il LOQ è stato calcolato seguendo i medesimi passaggi ma moltiplicando la deviazione standard per 10. Si riportano le rispettive formule:

$$LOD = \frac{M_{\text{bianco}} + 3.3 SD_{\text{bianco}} - a}{b}$$

$$LOQ = \frac{M_{\text{bianco}} + 10 SD_{\text{bianco}} - a}{b}$$

Calcoli analoghi sono stati ulteriormente eseguiti per le prove SERS. Anche in questo caso è stato considerato un colloide con pH=11.5 (30 °C, tempo di reazione 5 minuti) incubato con MBA  $10^{-5}$  M, incubato con BSA (in un range compreso tra 0 e 20.88  $\mu\text{g/ml}$  per una prova e compreso tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$  per un'altra prova) per 10 minuti e con NaCl 1 M. Come nel caso precedente, è stata calcolata la media ( $M_{\text{BIANCO}}$ ) e la deviazione standard ( $SD_{\text{BIANCO}}$ ) dei controlli no BSA (con contrazione BSA 0  $\mu\text{g/ml}$ ). Dalla calibrazione ottenuta plottando ogni valore dell'area del picco principale dell'MBA in funzione delle concentrazioni proteiche analizzate, è stato ottenuto un andamento non lineare, pertanto, è stato utilizzato un fit non lineare, considerando un modello esponenziale decrescente del tipo:

$$y = y_0 + A \cdot e^{-x/t}$$

dove  $y_0$  rappresenta il valore asintotico del segnale,  $A$  l'ampiezza del decadimento e  $t$  la costante del sistema.

Data la natura non lineare del modello, per il calcolo del limite di rilevabilità (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ) si è fatto ricorso a un'approssimazione, seguendo le linee guida dell'International Council for Harmonisation (ICH) per la validazione dei metodi analitici qui riportata: [97]

$$LOD \approx \frac{3.3 \cdot \sigma}{S} = \frac{3.3 \cdot \sigma \cdot t}{A}$$

Il LOD è stato quindi ottenuto moltiplicando la deviazione standard dei bianchi ( $SD_{BIANCO}$ ) per 3.3 ed infine per il valore  $t_1$ . Il valore ottenuto è stato diviso per  $A_1$ . Il LOQ è stato calcolato seguendo i medesimi passaggi ma moltiplicando la deviazione standard per 10. Di seguitosi riportano le rispettive formule:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot SD_{bianco} \cdot t_1}{A_1}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot SD_{bianco} \cdot t_1}{A_1}$$

## Capitolo 3

### Risultati e discussione

#### 3.1 Sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle

La sintesi delle nanoparticelle d'argento in questo lavoro di tesi è stata effettuata utilizzando l'acido ascorbico come agente riducente e il trisodio citrato come agente stabilizzante. L'utilizzo di questi due agenti permette di ottenere soluzioni colloidali stabili e riproducibili. La formazione delle nanoparticelle si verifica mediante una riduzione degli ioni argento in argento metallico ( $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ ), dove l'acido ascorbico influenza direttamente la nucleazione e la crescita. In particolare, il comportamento chimico dell'acido ascorbico risulta fortemente dipendente dai parametri chimico-fisici del sistema, principalmente dal pH, che modula lo stato di ionizzazione e di conseguenza il potere riducente, ma anche dal tempo di reazione e dalla temperatura che influenzano la cinetica di nucleazione e infine dalla concentrazione dei reagenti utilizzati che andrà a determinare la resa finale. [50,52,62]

A titolo di esempio si riporta la caratterizzazione di una soluzione di AgNP ottenuta seguendo un protocollo da letteratura [80], preso inizialmente come riferimento e leggermente modificato. In particolare, la sintesi è stata condotta a pH 11.5, ad una temperatura di 30 °C per 5 minuti, utilizzando acido ascorbico 0.6 mM, sodio citrato 3 mM e  $\text{AgNO}_3$  1 mM. In Figura 3.1 si riporta lo spettro UV-Vis della soluzione appena sintetizzata (in nero), che mostra il tipico picco di assorbimento plasmonico delle nanoparticelle d'argento, posizionato intorno a 390 nm, indicativo della formazione di un sistema colloidale stabile e costituito da nanoparticelle di piccole dimensioni. Il risultato è confermato anche dall'analisi FESEM (Figura 3.1) che mostra una buona omogeneità nel colloide, con NP di 30 nm. [49] La presenza di NP di piccole dimensioni permette di avere controllo sul sistema, che risulta riproducibile e garantisce una superficie specifica molto più elevata. Inoltre, la presenza di nano-dimensioni migliora l'interazione con biomolecole conferendo miglior stabilità soprattutto in presenza di proteine. [49,52]

Per valutare meglio la distribuzione delle taglie delle NP ottenute, è stata inoltre effettuata una caratterizzazione mediante DLS. È possibile osservare la distribuzione in Figura 3.2. L'analisi è stata condotta su 3 repliche prelevate dalla stessa sintesi. L'analisi mostra come non sia presente una singola popolazione di nanoparticelle in termini di dimensione media. Si evidenziano infatti 2 picchi caratterizzati da intensità differenti, un picco caratterizzato da NP con diametro pari a 69.0 nm e deviazione standard pari a 29.0 e un picco secondario meno intenso con dimensione media pari a 7.94 nm e deviazione standard uguale a 2.95. La non perfetta sovrapposizione delle curve è indicativa di una lieve variabilità nella distribuzione delle taglie per le diverse repliche. Questa si riflette anche sul valore di deviazione standard registrato.

Un parametro cruciale che è stato ulteriormente valutato è rappresentato dall'invecchiamento del sistema. Si sa, infatti, da letteratura che nel tempo le nanoparticelle in soluzione subiscono

vari processi che ne determinano un cambiamento delle proprietà chimico-fisiche, ed in particolare di dimensioni e morfologia. [98] Questo cambiamento influisce sulla lunghezza d'onda a cui è centrata la banda di assorbimento plasmonico, poiché le risonanze plasmoniche di superficie localizzate delle nanoparticelle sono fortemente sensibili a modifiche morfologiche. Tali variazioni sono solitamente attribuite a processi di aging del sistema colloidale, durante i quali le nanoparticelle subiscono fenomeni di riorganizzazione strutturale e crescita. In particolare, lo shift del picco è riconducibile a meccanismi di *Ostwald ripening*, processo in cui le particelle di dimensioni maggiori crescono a discapito di quelle più piccole, che risultano termodinamicamente meno stabili, determinando conseguentemente una variazione delle dimensioni medie e morfologiche. [98] La riorganizzazione strutturale che ne deriva sposta il picco plasmonico a lunghezze d'onda maggiori per via di cambiamenti dimensionali e conformazionali delle nanoparticelle. La misura UV-Vis può essere quindi utile per monitorare la stabilità del colloide nel tempo. L'effetto di invecchiamento della soluzione è stato quindi verificato con una misura della stessa soluzione colloidale nelle ore successive alla sintesi, da cui è possibile vedere come i valori di assorbanza tendano a diminuire leggermente, ma soprattutto si vede un piccolo shift del massimo di assorbimento. In particolare, tale comportamento risulta visibile in Figura 3.1. Infatti, inizialmente (a  $t=0$ ) il picco è posto a 390 nm per poi spostarsi intorno a 410 nm (a  $t=24h$ ) e con un'intensità che tende a diminuire raggiungendo un OD uguale a 0.9. [13,57]

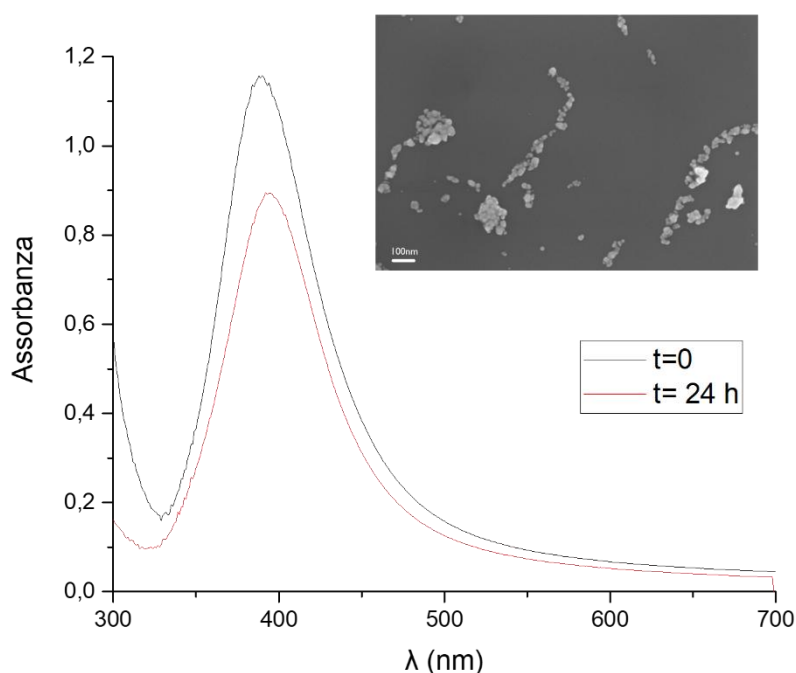


Figura 3.1: Confronto tra gli spettri di assorbimento UV-Vis del sistema colloidale di riferimento: analisi effettuata alla sintesi ( $t = 0$ , linea nera) e dopo 24 ore ( $t = 24 h$ , linea rossa). Caratterizzazione morfologica delle nanoparticelle d'argento in soluzione tramite microscopia elettronica a scansione a emissione di campo (FESEM).

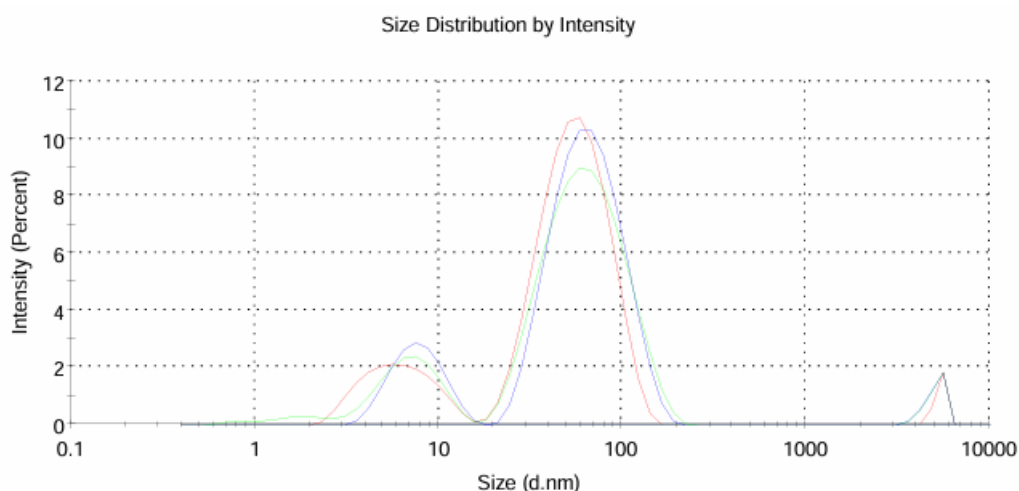


Figura 3.2: Curve di distribuzione dimensionale ottenute tramite DLS per tre repliche del colloide a pH=11.5.

Per l'ottimizzazione della formazione dei colloidi, le nanoparticelle d'argento sono state sintetizzate variando diversi parametri di reazione come: pH, temperatura e tempo di reazione. Il controllo di questi parametri rappresenta un elemento chiave per l'ottenimento di nanoparticelle con dimensioni e distribuzione omogenea oltre che per avere un controllo sulla morfologia. [11,64, 100,101]

### 3.1.1 Analisi Matlab della morfologia delle nanoparticelle

Per ottenere una caratterizzazione completa della morfologia delle nanoparticelle ottimizzate nel lavoro di tesi, è stato ottimizzato un algoritmo Matlab per l'analisi automatica delle immagini FESEM. La complessità delle immagini, costituite da rumore di fondo e presenza di cluster, ha reso complessa la discriminazione di ogni singola nanoparticella. Lo script ha permesso di trasformare le immagini in dati statistici mediante la formazione di mappe a contrasto colori, ricavando il diametro medio e la relativa deviazione standard. Tale algoritmo è stato applicato ad ogni immagine di ogni campione sintetizzato. Mediante l'ottenimento di mappe a contrasto di colore è stato possibile confermare come ogni colore identifichi un oggetto rilevabile. In particolare, lo script si basa sulla tecnica *Watershed*, che converte l'immagine binaria in una mappa topografica. Tale processo prevede di calcolare la distanza tra il centro e il bordo di ogni NP, così da distinguere come elementi distinti NP poste vicine. Per ogni NP è stato calcolato il perimetro e, successivamente, ogni NP è stata colorata. Mediante il filtraggio "imhmin" vengono eliminate NP con irregolarità e infine il comando "regionprops" misura le proprietà geometriche dal quale poi vengono calcolati i parametri di interesse (diametro medio e deviazione standard).

Dalle immagini di confronto è possibile constatare come l'efficacia dell'algoritmo sia fortemente dipendente dalla morfologia e dalla dispersione delle nanoparticelle. Le particelle sono approssimate come sferiche anche se non sempre rispettano tale caratteristica. Inoltre, la presenza di cluster e la conseguente mancanza di uniformità di contrasto tra le nanoparticelle, impedisce al filtro di distinguerle e separarle correttamente, tendendo ad identificarle come un unico agglomerato di dimensioni maggiori. Questo accade anche in

presenza di nanoparticelle sovrapposte e/o disposte su più piani, dove lo script tende a interpretarle come un unico agglomerato, e, non rispettando i parametri sferici imposti, tende ad eliminarle per evitare errori di misura. Infine, la differente luminosità di ogni singola immagine non facilita l'algoritmo nella distinzione completa tra nanoparticella e background, rendendo complessa la binarizzazione. L'accumulo di nanoparticelle nella stessa zona genera una regione densamente popolata rendendo complessa l'identificazione di una soglia in grado di isolarle. Si riportano a titolo di esempio alcune immagini significative e la rispettiva immagine binarizzata in automatico dall'algoritmo. In presenza di molti aggregati e/o nanoparticelle sovrapposte, come in Figura 3.3, lo script non permette di discriminare ogni singolo elemento, motivo per cui l'affidabilità risulta inferiore. Al contrario, la presenza di nanoparticelle più distanziate, come in Figura 3.4, migliora il riconoscimento e il risultato è più attendibile.

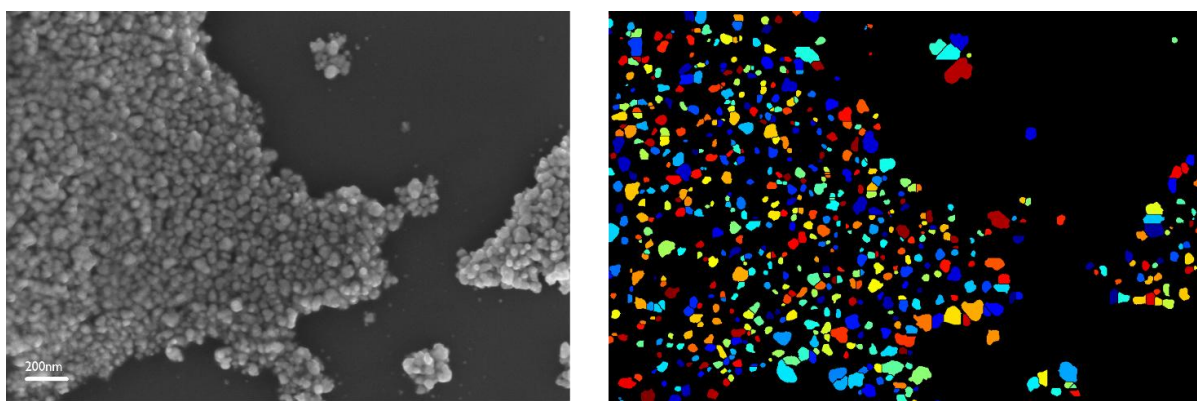


*Figura 3.3: Immagine FESEM e relativa mappa a contrasto di colore ottenuta tramite segmentazione Watershed su nanoparticelle aggregate.*

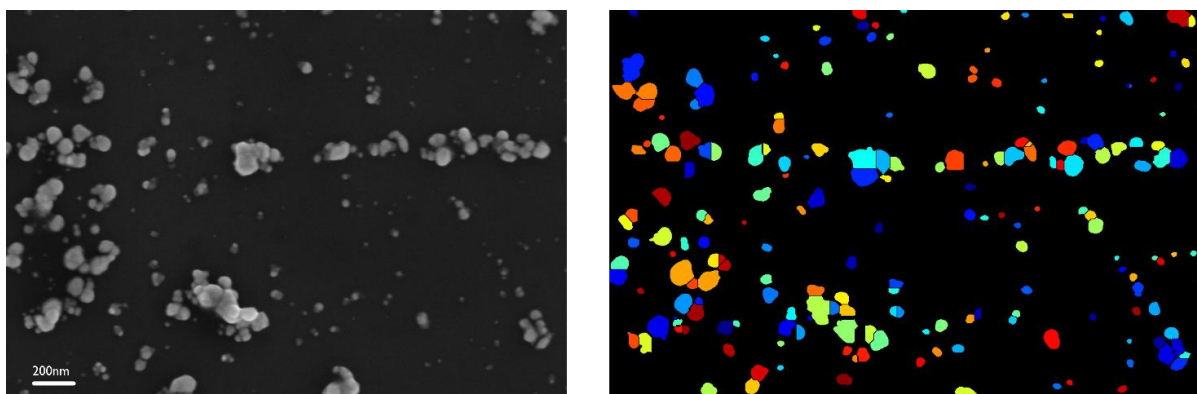


*Figura 3.4: Immagine FESEM e relativa mappa a contrasto di colore ottenuta tramite segmentazione Watershed su nanoparticelle non aggregate.*

L'efficacia dello script risulta quindi strettamente legata alla distribuzione delle nanoparticelle. Nonostante tale criticità, tale metodo permette quindi di effettuare in modo rapido la caratterizzazione dei campioni, ottenendo così una stima delle distribuzioni di nanoparticelle e ricavando i parametri di interesse.

### 3.1.2 Effetto della variazione della temperatura sulla sintesi delle AgNP

La temperatura di reazione rappresenta un parametro fondamentale dal quale la morfologia della sintesi risulta essere fortemente dipendente. Tale parametro, infatti, è in grado di influenzare la cinetica dei processi di nucleazione e crescita delle nanoparticelle.

In particolare, l'aumento della temperatura, se da un lato accelera la riduzione degli ioni  $\text{Ag}^+$  da parte dell'acido ascorbico, favorendo una più rapida formazione delle nanoparticelle, dall'altro, se eccessivo, può portare a un incremento termico incontrollato che compromette la cinetica di accrescimento delle nanoparticelle e altera l'omogeneità e la riproducibilità del colloide. [52] Durante la sintesi, l'acido ascorbico va incontro a una rapida degradazione alcalina e ossidativa che si verifica sulla stessa scala temporale in cui si verifica la reazione stessa. Di conseguenza, il suo consumo repentino durante le fasi iniziali della sintesi compromette il bilancio dinamico tra formazione di nuclei e successivo accrescimento. [52] Per tale motivo, l'effetto di differenti temperature (20, 30 e 40 °C) durante la sintesi è stato valutato con una miscela di reazione a pH 11.6. La reazione è stata portata avanti per un tempo totale di 5 minuti.

L'utilizzo di basse temperature ( $\leq 20$  °C) rallenta il processo di sintesi, generando soluzioni tendenti al rosso. [100] Al contrario temperature progressivamente più elevate aumentano la velocità di reazione, portando ad una formazione di colloidi dal color ambrato a temperature intermedie (30 °C), e istantaneamente nere per temperature più elevate ( $\geq 40$  °C). Tali variazioni cromatiche trovano riscontro negli spettri UV-Vis, in cui modifiche nella posizione e nell'intensità del picco plasmonico riflettono cambiamenti nelle dimensioni e nella distribuzione dimensionale delle nanoparticelle. [102]

Lo spettro UV-Vis (Fig. 3.5) mostra come a 20 °C il picco plasmonico risulta largo, poco intenso e posizionato a lunghezze d'onda elevate (circa 450–500 nm). A 30 °C il picco risulta più intenso e definito, con lunghezza d'onda del massimo a circa 390–400 nm. Tale spettro è indicativo di una formazione rapida di nanoparticelle. Nonostante ci si aspetterebbe una velocità di reazione ulteriormente incrementata a temperature superiori, la reazione effettuata a 40 °C (Fig. 16) mostra un profilo spettrale ancora più ampio e appiattito rispetto alla reazione a 20 °C. Tale comportamento potrebbe riflettere l'instabilità termica dell'acido ascorbico, di cui l'incremento di temperatura accelera la degradazione, di fatto rallentando il completamento della reazione, con formazione di AgNP più grandi e/o polidisperse. [52,100]

In seguito, è stata valutata l'evoluzione nel tempo dell'assorbanza dei diversi colloidi (Fig. 3.5), per verificare la stabilità delle AgNP. Gli spettri ottenuti mostrano come per ogni colloide l'intensità del picco rimanga pressoché invariata anche a distanza di diverse settimane.

Lo shift che si osserva a basse temperature rispetto alla sintesi effettuata a 30 °C è compatibile con la presenza di nanoparticelle di dimensioni elevate e/o polidisperse, dato confermato dalle immagini ottenute al FESEM (Fig. 3.6). In tale situazione la riduzione risulta più lenta, favorendo la formazione di pochi nuclei con dimensioni più elevate, con un diametro medio pari a 60 nm, dato confermato anche in letteratura [93] per cui la presenza di NP più grandi induce uno shift del picco di assorbimento. L'incremento della temperatura a 30 °C porta alla formazione di nanoparticelle piccole (30 nm) e con distribuzione dimensionale più uniforme, compatibile con una maggior velocità di nucleazione. Infine, a 40 °C il sistema progredisce

verso la formazione di nanoparticelle di dimensioni maggiori rispetto a 30 °C, con diametro medio rispettivamente pari a 50 nm. La formazione degli aggregati, visibile in Figura 3.6, potrebbe dipendere dall'asciugatura del campione posto sulla superficie di supporto per la successiva caratterizzazione FESEM o potrebbero invece essersi formati durante la sintesi, ma questo aspetto non è stato ulteriormente indagato.

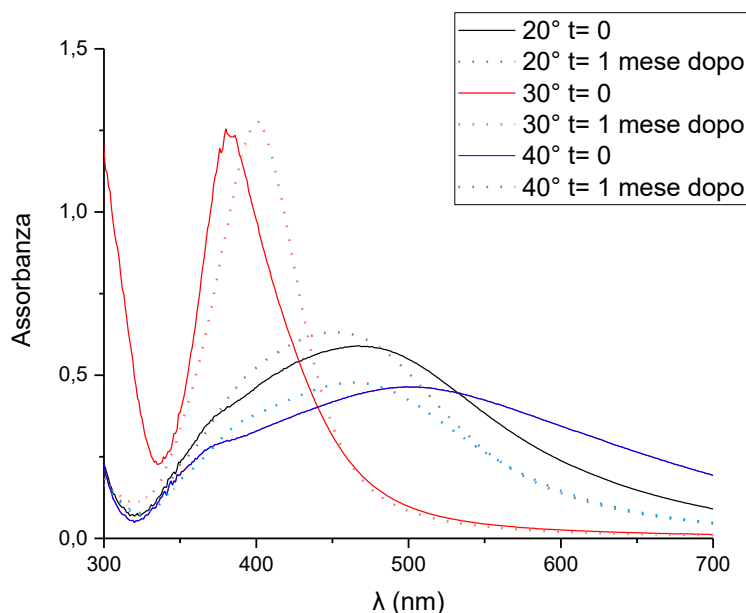


Figura 3.5: Spettri di assorbimento UV-Vis in funzione della temperatura (20 °C, 30 °C, 40 °C) e del tempo ( $t=0$  e  $t=1$  mese).

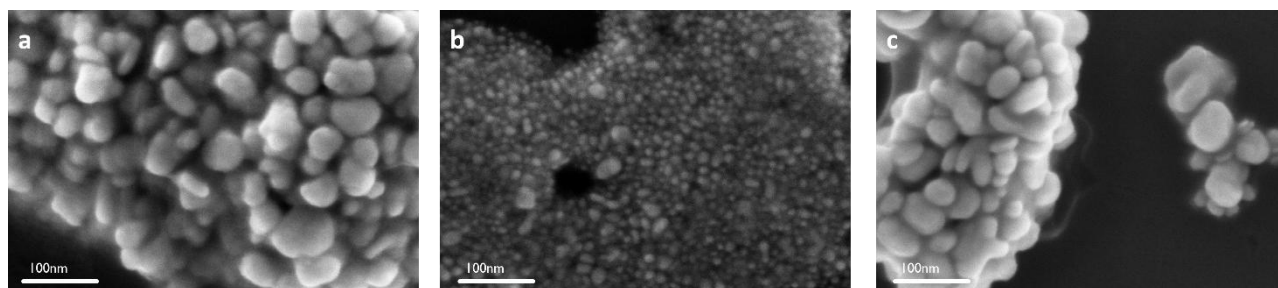


Figura 3.6: Caratterizzazione morfologica tramite FESEM delle nanoparticelle d'argento ottenute rispettivamente a 20 °C (a), 30 °C (b) e 40 °C (c).

Nel complesso, tutte queste osservazioni indicano come la temperatura intermedia (30 °C) rappresenti una condizione ottimale tra quelle investigate. Tale valore favorisce un equilibrio tra nucleazione e crescita delle particelle, svolgendo quindi un ruolo molto importante, regolando la cinetica, la forma e la distribuzione delle nanoparticelle. A temperature inferiori (20 °C) si verifica una crescita lenta e non istantanea, mentre a 40 °C l'incremento eccessivo della temperatura induce una degradazione precoce dell'acido ascorbico che si traduce macroscopicamente nello spostamento della banda plasmonica verso lunghezze d'onda maggiori, segno di una perdita del controllo dimensionale e della comparsa di fenomeni di aggregazione. [100,101]

### 3.1.3 Effetto della variazione del pH sulla sintesi delle AgNP

L'influenza del pH sull'acido ascorbico e conseguentemente sulla sintesi delle AgNP permette di controllare la velocità di riduzione, e di conseguenza la velocità con cui il colloide si forma, la coalescenza delle stesse nanoparticelle, e quindi la morfologia, passando da dimensioni più elevate nel caso di pH meno basici a dimensioni più piccole per pH maggiormente alcalini. [52] A pH meno alcalini la reazione si verifica più lentamente, favorendo la formazione di pochi nuclei con dimensioni più grandi. Al contrario, l'incremento del pH porta progressivamente a reazioni più veloci, favorendo la formazione di più nuclei e nanoparticelle di piccole dimensioni. [11,100]

Si è quindi valutato l'effetto del pH sulla sintesi delle AgNP, che è stata eseguita a 30 °C, per 5 minuti, variando il pH tra 7.0 a 12.0. L'incremento del pH ha progressivamente generato dei colloidi di diverse colorazioni, partendo da soluzioni grigie tendenti al verde, come nel caso di pH vicini alla neutralità (7.0 - 8.0), per poi passare a soluzioni ambrate a pH intermedi e infine soluzioni più scure a pH più alti (12.0) (Fig.3.7).



Figura 3.7: Nanoparticelle ottenute da sintesi a pH crescente, rispettivamente pari a 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0.

Dal grafico UV-Vis (Fig. 3.8) è possibile vedere come la variazione del pH influenzi significativamente il comportamento delle nanoparticelle d'argento sintetizzate, evidenziando differenze sia nell'intensità sia nella posizione del picco di risonanza plasmonica. A pH meno alcalini, gli spettri presentano valori di assorbanza più bassi con un picco più largo e spostato a lunghezze d'onda maggiori (red shift), a circa 430 nm. Tale comportamento suggerisce la presenza di nanoparticelle con una distribuzione dimensionale più ampia e di dimensioni maggiori, compatibile anche con quanto riportato in letteratura, secondo cui all'aumentare del diametro medio, il picco tende a spostarsi verso lunghezze d'onda maggiori e l'intensità massima a ridursi. [35] A pH vicini alla neutralità, le nanoparticelle si destabilizzano in modo più rapido formando degli aggregati. [11,100] Con questi valori di pH, l'acido ascorbico presenta un minor potere riducente, influenzando la formazione dei nuclei, che risulterà essere più lenta. All'aumentare del pH, l'intensità del picco tende progressivamente a crescere, diventando più stretto e definito, raggiungendo valori massimi per le sintesi a pH più basici. Parallelamente all'incremento dell'assorbanza, è possibile osservare uno spostamento del

picco massimo verso lunghezze d'onda inferiori a circa 390-400 nm (blue shift), indicativo della presenza di un maggior quantitativo di nanoparticelle di piccole dimensioni. L'andamento degli spettri fornisce informazioni molto importanti sulle caratteristiche dei colloidi, infatti l'intensità del picco potrebbe indicare un maggior quantitativo di NP formate, che in aggiunta al restringimento della banda (FWHM) rappresenta la prova di un controllo dimensionale da parte di questo parametro sulla distribuzione delle nanoparticelle. [102]

A valori di pH basici ( $\text{pH} > 11.0$ ), l'acido ascorbico diventa più reattivo e aumenta la sua capacità riducente favorendo una rapida nucleazione, poiché risulta maggiormente deprotonato. L'incremento del potere riducente rende la reazione spontanea e rapida. La rapidità della reazione e la presenza di un ambiente alcalino garantiscono inoltre una stabilizzazione elettrostatica che protegge il colloide dall'aggregazione. [52,103] In particolare, le nanoparticelle acquisiscono una forte carica superficiale negativa che genera repulsione che impedisce loro di aggregare e/o precipitare. [11] L'utilizzo dell'acido ascorbico permette quindi di guidare la riduzione del precursore metallico in maniera molto rapida, mentre la combinazione con il citrato di sodio, che agisce come stabilizzante, migliora la stabilità del colloide finale. A pH elevati ( $\text{pH} > 11.0$ ), entrambi i reagenti sono nelle forme completamente deprotonate, permettendo l'ottenimento di colloidi monodispersi. [49, 50, 72] Tali condizioni portano all'ottenimento di sistemi stabili grazie alla maggior repulsione tra cariche negative. Inoltre, si verifica una riduzione più elevata degli ioni argento impedendo la formazione di cluster. [11]

Dai grafici riportati in Figura 3.8, è possibile dedurre come condizioni a pH maggiori di 10.0 sembrano rappresentare la condizione ottimale, in quanto combinano l'elevata intensità del segnale e la presenza di un picco stretto e definito, indicativi di nanoparticelle numerose, piccole e uniformemente distribuite. Tali evidenze, trovano riscontro in letteratura, in cui risulta evidente come un controllo sul pH possa regolare dimensione e la stabilità dei colloidi d'argento. Infatti, a pH fortemente basici la crescita incontrollata delle nanoparticelle risulta rallentata e/o bloccata poiché l'ambiente alcalino massimizza l'effetto delle cariche elettriche che impediscono l'aggregazione. [11] Mediante tale grafico, è possibile effettuare un confronto con gli spettri in Figura 1.5, per cui risulta possibile affermare che per valori di pH meno basici (7.0 e 8.0) lo shift del picco plasmonico potrebbe essere attribuito a nanoparticelle con diametri pari a circa 70 nm. Incrementando il pH, la presenza del picco a lunghezze d'onda inferiori (nell'intorno di 390-400 nm), risulta compatibile con diametri di 20-30 nm.

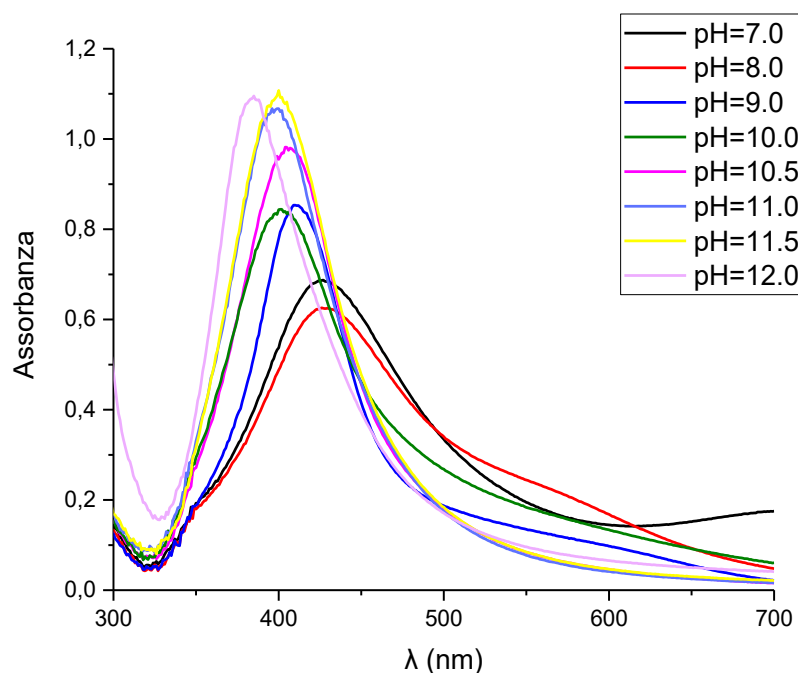


Figura 3.8: Spettri di assorbimento UV-Vis dei sistemi colloidali ottenuti con sintesi a diversi valori di pH.

A conferma di quanto osservato negli spettri UV-Vis (Fig.3.8) e dal confronto effettuato con gli spettri di riferimento pubblicati della Nanocomposix (Fig. 1.5) [91], le immagini ottenute al FESEM sembrano dimostrare chiaramente un'influenza del pH sulle caratteristiche morfologiche dell'intero sistema.

Come si evince dalle Figure 3.3a e 3.3b, a pH più vicini alla neutralità, le nanoparticelle risultano più grandi e la morfologia meno regolare, con forme non perfettamente sferiche. Con pH progressivamente crescenti (Fig. 3.9c, 3.9d, 3.9e, 3.9f, 3.9g, 3.9h) la dimensione media delle nanoparticelle tende a diminuire accompagnata da una maggiore uniformità morfologica. A valori di pH più elevati infatti le nanoparticelle risultano prevalentemente sferiche e monodisperse, come evidenziato anche dal blue shift osservabile nello spettro ottenuto mediante spettroscopia UV-Vis (Fig.3.8), in cui si evidenzia una posizione del massimo di assorbimento intorno ai 390-400 nm. [104]

L'aumento del pH riduce il diametro medio delle nanoparticelle e incrementa il numero di NP formate della reazione; infatti, a pH molto alcalini tutto il precursore metallico viene ridotto più rapidamente in forma metallica per via dell'elevata reattività dell'acido ascorbico. [49] Tali considerazioni risultano ulteriormente supportate dai calcoli effettuati per la stima della concentrazione delle nanoparticelle (Tab.3.1). Per ogni diametro medio di interesse è stata calcolata la concentrazione delle nanoparticelle nel volume di interesse. In particolare è stato calcolato il volume di ogni NP e successivamente la massa. I calcoli sono stati effettuati basandosi sulle proprietà fisiche dell'argento (densità e massa molare). Infine il numero delle NP è stato ottenuto dividendo la massa totale di argento nella soluzione di precursore per la massa della NP, dividendo per  $N_A$  e infine per il volume totale. Tali conti sono stati anche effettuati a partire dal diametro medio ricavato mediante analisi FESEM (le misure sono state

acquisite durante la caratterizzazione) e mediante lo script Matlab (metodo ottimizzato al fine di automatizzare il processo per ricavare il diametro medio).

In particolare, i campioni sintetizzati a valori di pH prossimi alla neutralità presentano concentrazioni inferiori, mentre condizioni più alcaline sono associate a concentrazioni significativamente più elevate. Si osserva tuttavia che alcuni valori mostrano deviazioni rispetto a questo andamento generale; tali discrepanze possono essere attribuite alle modalità di stima della concentrazione, che risultano fortemente dipendenti dal diametro medio delle nanoparticelle assunto nel calcolo, dato fortemente influenzato dalla morfologia.

*Tabella 3.1: Analisi comparativa dei campioni colloidali: confronto tra le concentrazioni calcolate mediante misure ricavate al FESEM e mediante misure ricavate dallo script Matlab.*

| Campione   | Concentrazione stimata ( $\times 10^{-9}$ ) | Concentrazione script ( $\times 10^{-9}$ ) |
|------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| pH=7       | 0.151                                       | 2.42                                       |
| pH=8       | 0.151                                       | 2.85                                       |
| pH=9       | 0.509                                       | 4.55                                       |
| pH=10      | 0.440                                       | 4.37                                       |
| pH=10.5    | 0.995                                       | 6.18                                       |
| pH=11      | 1.21                                        | 10                                         |
| pH=11.5    | 1.21                                        | 17.2                                       |
| pH=12      | 4.07                                        | 4.02                                       |
| Surnatante | 3.52                                        | 23.6                                       |
| Pellet     | 1.21                                        | 4.26                                       |

Nonostante queste limitazioni, i risultati complessivi risultano in buon accordo con quanto osservato negli spettri UV-Vis, dove a pH alcalini si registrano valori di assorbanza più elevati e picchi più definiti, indicativi di una maggiore concentrazione di nanoparticelle. Inoltre, le dimensioni e le morfologie, sono coerenti con il ruolo del pH nel modulare il potere riducente dell'acido ascorbico.

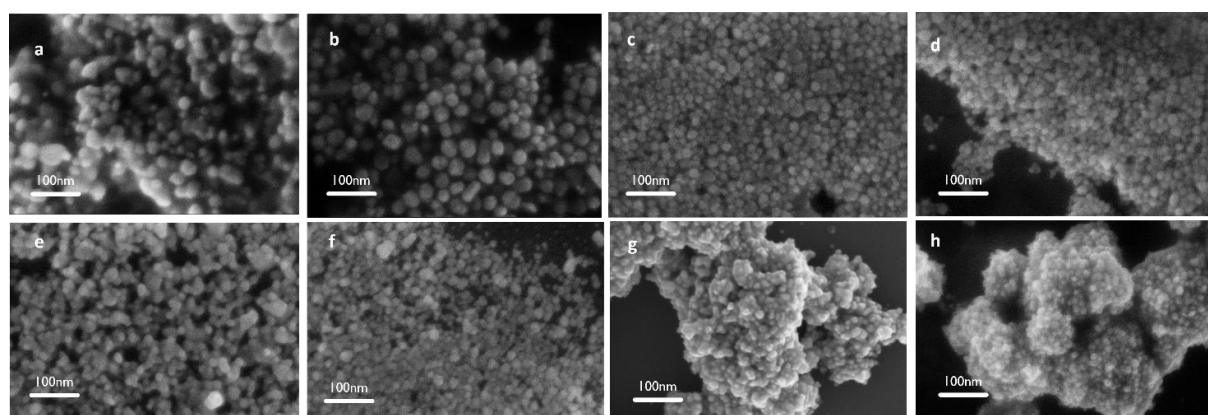


*Figura 3.9: Caratterizzazione morfologica tramite FESEM delle nanoparticelle d'argento ottenute rispettivamente a pH pari a 7.0 (a), 8.0 (b), 9.0 (c), 10.0 (d), 10.5 (e), 11.0 (f), 11.5 (g), 12.0 (h).*

### 3.1.4 Effetto della variazione del tempo di reazione sulla sintesi delle AgNP

Ulteriori prove sono state condotte sulla variazione del tempo di reazione, che rappresenta un parametro chiave durante la sintesi di nanoparticelle. Esso influisce, anche se in modo meno marcato, sui processi di nucleazione, sulla crescita e sulla stabilità delle nanoparticelle. Tali prove sono state condotte su sintesi con pH=11.6 e a 30 °C rispettivamente per 5, 15 e 30 minuti.

La variazione del tempo di permanenza in un bagno d'acqua calda a temperatura costante non modifica la cinetica intrinseca di riduzione degli ioni  $\text{Ag}^+$ , ma influenza l'evoluzione del sistema colloidale, come la nucleazione e la crescita. Maggior tempo di reazione può favorire processi di crescita secondaria e riorganizzazione delle nanoparticelle, che determinano un aumento della polidispersità e variazioni dell'intensità del picco plasmonico. [49] Tale comportamento, si può attribuire a dei processi di riorganizzazione del sistema colloidale, includendo meccanismi di crescita e coalescenza compatibili con meccanismi di tipo *Ostwald ripening*, per cui nanoparticelle più piccole si dissolvono o aggregano favorendo la formazione di nanoparticelle più grandi. [99]

Dalle prove effettuate, risulta possibile affermare come tempi di permanenza maggiori di 5 minuti, portano il sistema ad assumere tonalità scure, compatibili con fenomeni di accrescimento delle nanoparticelle.

Dall'analisi degli spettri UV-VIS (Fig. 3.10), i profili risultano complessivamente molto simili. Con un tempo di permanenza pari a 5 minuti, il picco plasmonico appare un po' più intenso, suggerendo la presenza di un maggior quantitativo di nanoparticelle di piccole dimensioni. A 15 minuti, i valori di assorbanza tendono ad essere leggermente inferiori, senza significative variazioni inerenti la posizione del picco, suggerendo come le nanoparticelle possano andare incontro a processi di riorganizzazione del sistema. Infine, a 30 minuti, l'intensità tende a diminuire ulteriormente rispetto agli altri due casi e la banda dello spettro subisce anche un lieve allargamento. Tale comportamento è compatibile con una diminuzione della concentrazione di nanoparticelle stabili e/o maggior quantitativo di NP sedimentate o con diametri maggiori.

Questo risultato è confermato anche da alcuni studi [35] (Fig. 1.5) in cui si utilizzano nanoparticelle d'argento commerciali e per cui è possibile constatare come all'aumentare della dimensione media delle NP, il picco plasmonico tenda a spostarsi via via a lunghezze d'onda maggiori e con un'intensità che diminuisce gradualmente. Secondo tale articolo, quindi, la curva con un picco più ampio (sintesi condotta a 30 minuti), potrebbe essere rappresentata da una distribuzione di NP con diametro medio intorno a 40 nm o più, compatibilmente alle misure FESEM (Fig. 3.11) eseguite. Al contrario la sintesi eseguita in minor tempo, risulta compatibile NP con dimensioni inferiori (30 nm).

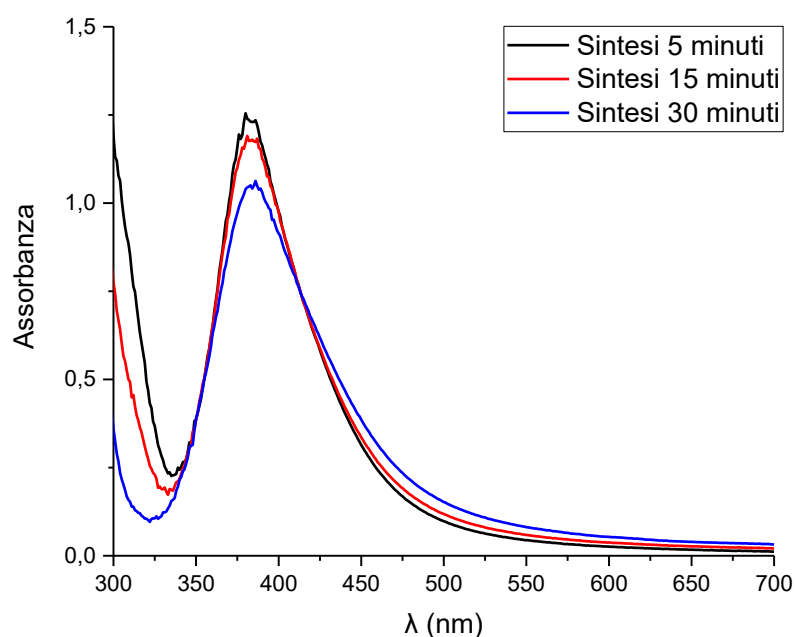


Figura 3.10: Spettri di assorbimento UV-Vis dei sistemi colloidali a diversi valori di tempo di reazione.

Un tempo di permanenza inferiore rappresenta quindi, il tempo ottimale per ottenere un colloide stabile e riproducibile. Il prolungato mantenimento a temperatura elevata e a pH basico può favorire fenomeni di evoluzione del sistema colloidale, con conseguente perdita di omogeneità e riduzione dell'intensità del picco plasmonico. [49]

Seppur le differenze di dimensione siano minime, queste vengono confermate dalle immagini FESEM riportate in Figura 3.11, in cui è possibile osservare una somiglianza morfologica tra i campioni analizzati ai diversi tempi di reazione. In particolare, al tempo più breve (5 minuti) le nanoparticelle appaiono più definite e relativamente uniformi, con una dimensione media di circa 36 nm, mentre all'aumentare del tempo si evidenzia una progressiva perdita di omogeneità e presenza di NP di maggiori dimensioni.

Tale comportamento è coerente con quanto osservato negli spettri UV-Vis sia sperimentali che da letteratura [91], dove l'allargamento della banda plasmonica a tempi più lunghi suggerisce un incremento della polidispersità del sistema e l'insorgere di fenomeni di evoluzione post-sintesi.

Il diametro medio stimato mediante DLS non risulta tuttavia confrontabile con quanto ricavato dalla caratterizzazione morfologica e UV-Vis. In particolare, per le due condizioni estreme (5 minuti e 30 minuti), l'analisi DLS fornisce rispettivamente un diametro medio pari 19.30 nm e 19.95 nm. In particolare, la popolazione principale è costituita da nanoparticelle con diametri di 41.78 nm (a 5 minuti) e 55.37 nm (a 30 minuti), valori che presentano una buona coerenza con la morfologia FESEM. Il valore medio dei diametri ottenuti tramite DLS è fortemente influenzato dalla presenza di un picco secondario a bassi diametri (circa 1.7 nm e 3.9 nm). La presenza di questi picchi sposta conseguentemente verso il basso la media complessiva ed evidenzia quindi una discrepanza tra la taglia stimata in base al confronto con gli spettri UV-Vis da letteratura e il dato sperimentale acquisito. Da tali dati emerge come la caratterizzazione morfologica FESEM e l'analisi UV-Vis siano in linea con la dimensione prevalente delle NP,

associata al picco a maggiore intensità nella misura DLS, confermando la crescita di dimensioni per tempi di reazione crescenti. Infatti, le divergenze riscontrate potrebbero dipendere dalla capacità della misura DLS di individuare una popolazione di nanoparticelle con diametro medio molto ridotto, che sfugge all'analisi delle immagini FESEM e presenta un contributo molto ridotto negli spettri UV-Vis.

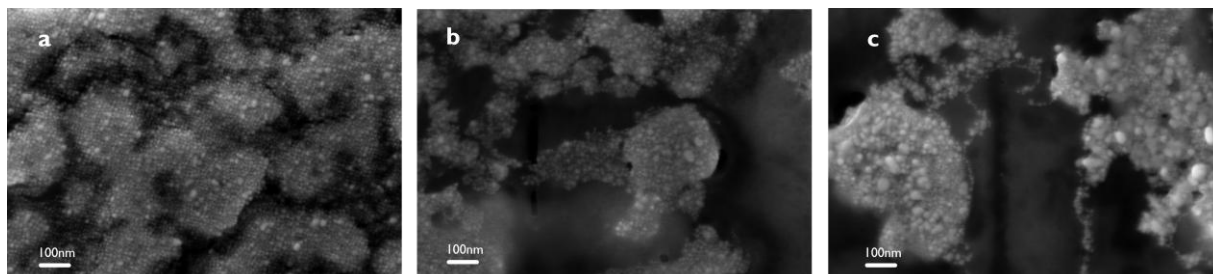


Figura 3.11: Caratterizzazione morfologica tramite FESEM delle nanoparticelle d'argento rispettivamente a  $t=5$  minuti (a),  $t=15$  minuti (b),  $t=30$  minuti (c).

### 3.1.5 Effetto della centrifugazione

A partire dalle sintesi ottenute, sono state effettuate delle centrifugazioni sui colloidi permettendo così una distinzione tra frazione sedimentata (pellet) e frazione costituita dal surnatante. Tale procedura permette di eliminare dal mezzo i reagenti in eccesso e i sottoprodotti di reazione rimasti nella soluzione, ma anche di comprendere l'effettiva distribuzione delle nanoparticelle in soluzione, separando le AgNP più piccole che restano nel surnatante, rispetto a quelle più grandi che sedimentano. Mediante la centrifugazione, infatti avviene una separazione delle nanoparticelle basata sulla dimensione, densità e stato di aggregazione. Visto che le nanoparticelle sono tutte dello stesso elemento, e quindi presentano uguale densità, è possibile tentare una separazione dimensionale. Il pellet, sarà maggiormente costituito da nanoparticelle di dimensioni maggiori o aggregate, poiché mediamente tali particelle tendono a sedimentare più facilmente formando appunto il pellet. Al contrario, nanoparticelle più piccole rimangono disperse nel surnatante.

Come si evince dal grafico in Figura 3.12 relativo al campione sintetizzato a partire da una miscela di reazione con pH iniziale pari a 11.5, il colloide tal quale (non centrifugato) presenta valori di assorbanza più elevati a 383 nm, suggerendo la presenza di nanoparticelle di piccole dimensioni e distribuzione omogeneo. Il surnatante presenta una riduzione dell'intensità del picco plasmonico superficiale (LSPR), che indica una diminuzione della concentrazione di nanoparticelle. Al contrario seppur la variazione di intensità risulti minima, il pellet sospeso in 1 ml di acqua, presenta spettri caratterizzati da valori più elevati, compatibili con una concentrazione di nanoparticelle maggiore e da un lieve allargamento della banda, compatibile con la presenza di aggregati o particelle di dimensioni maggiori, come confermato anche in letteratura. In particolare, la variazione di tali spettri risulta confrontabile con il grafico della Nanocomposix (Fig. 1.5). Ad una dimensione media compresa tra 20 e 30 nm corrisponde un picco plasmonico centrato intorno a 390 nm, compatibile con le NP presenti nel TQ e nel pellet. Per quest'ultimo, tuttavia, il profilo spettrale presenta una lieve spalla del picco, che potrebbe suggerire la presenza di una frazione di nanoparticelle di dimensioni maggiori e/o

aggregati. Al contrario la presenza nel surnatante di un picco (387 nm) con un'intensità di assorbanza (OD) prossima a 1, risulta compatibile con una concentrazione di nanoparticelle inferiore.

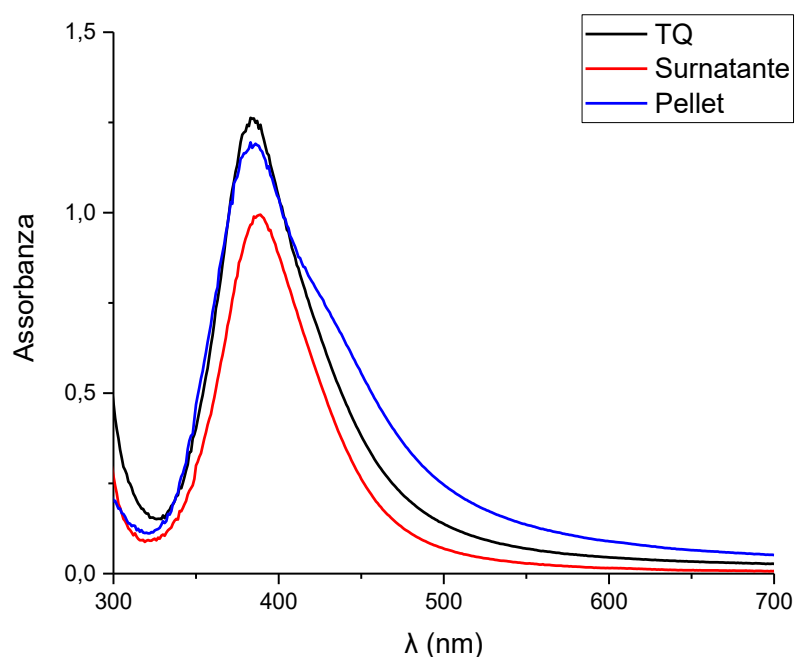


Figura 3.12: Spettri di assorbimento UV-Vis dei sistemi colloidali confronto tra: tal quale, surnatante e pellet.

Questo risultato conferma ed è coerente con il principio secondo cui mediante la centrifugazione viene favorita la separazione delle nanoparticelle di dimensioni superiori e/o aggregate, che tendono a sedimentare.

Mediante le misure effettuate al DLS, il surnatante presenta un diametro medio pari a 12.6 nm, al contrario il TQ presenta un diametro medio pari a 19.5 nm, tale risultato è compatibile con i valori di lunghezza d'onda intorno ai quali è possibile vedere il picco.

Anche le immagini FESEM in Figura 3.13 confermano i risultati della spettroscopia UV-Vis: il tal quale, infatti, mostra una distribuzione più eterogenea delle nanoparticelle in termini di dimensioni, con presenza sia di particelle isolate sia di piccoli aggregati. Nel surnatante, si riscontrano invece AgNP di piccole dimensioni, mentre nel pellet le immagini ottenute evidenziano nanoparticelle con dimensioni più grandi e con una certa omogeneità.

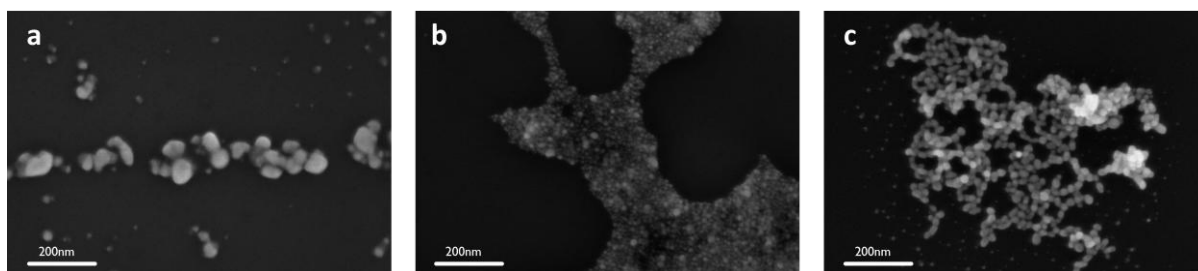


Figura 3.13: Caratterizzazione morfologica tramite FESEM delle nanoparticelle d'argento, confronto tra: tal quale (a), surnatante (b), pellet (c).

### 3.1.6 Analisi comparativa dei diametri

Sulla base dei risultati ricavati, è stato eseguito un confronto tra il diametro medio delle NP ricavato tramite: 1) le misure effettuate mediante il software del microscopio elettronico su alcune particelle durante le analisi FESEM, 2) le misure ricavate dallo script Matlab e 3) le analisi eseguite tramite DLS. Per alcuni campioni si evidenziano differenze evidenti. Questa differenza non è imputabile soltanto alle difficoltà riscontrate nel riconoscimento delle singole nanoparticelle da parte dello script, ma anche alle misure ricavate mediante microscopia FESEM poiché in questo caso l'analisi è stata limitata alla misura di poche nanoparticelle isolate, consentendo quindi una bassa rappresentatività statistica rispetto al conteggio automatizzato, anche se è stata valutata una barra d'errore considerando la semidisersione del dato.

Il grafico in Figura 3.14 evidenzia la differenza di dimensione delle NP in funzione del pH, monitorata tramite le diverse caratterizzazioni effettuate. Sebbene le diverse tecniche di analisi forniscano valori differenti (con il FESEM che sovrastima le dimensioni rispetto a Matlab e DLS), per tutte le sintesi risulta evidente come si verifichi una riduzione della dimensione delle nanoparticelle man mano che il pH della soluzione aumenta. Inoltre, si evidenzia come il diametro medio calcolato mediante script Matlab presenti valori elevati di deviazione standard, indicando un'elevata polidispersità delle nanoparticelle e di conseguenza, una minore precisione nella stima del diametro medio. Al contrario, la deviazione standard calcolata mediante DLS presenta valori più bassi, indicando una maggiore riproducibilità. Infine, l'analisi automatizzata delle immagini FESEM mediante algoritmo Matlab rappresenta uno strumento di supporto per la caratterizzazione quantitativa della morfologia delle nanoparticelle. Nonostante il metodo presenti alcune limitazioni soprattutto nella gestione di aggregati e particelle sovrapposte, i risultati ottenuti confermano il trend osservato con le tecniche sperimentali.

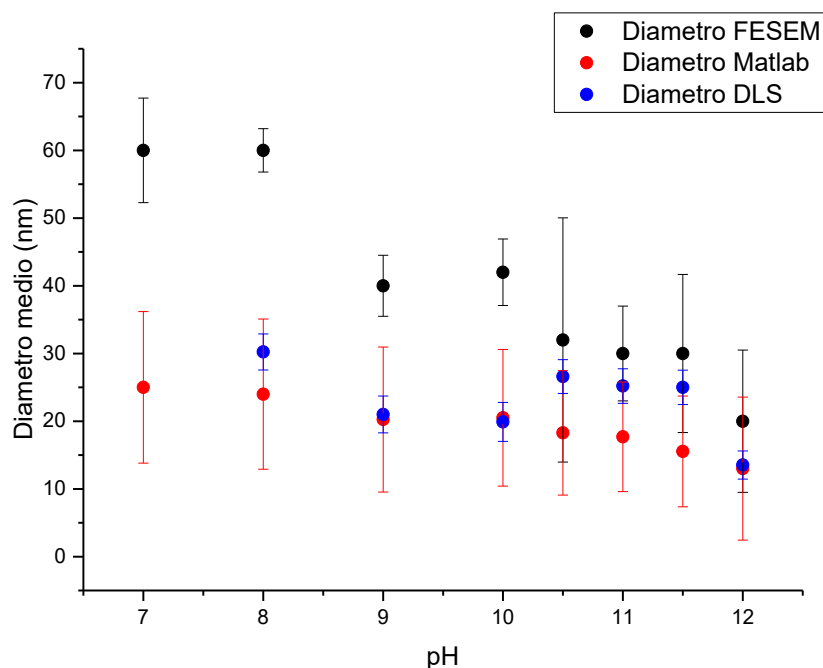


Figura 3.14: Confronto tra tecniche di misurazione dimensionale (FESEM, Matlab, DLS) delle nanoparticelle d'argento al variare del pH.

Mediante le differenti caratterizzazioni effettuate sono stati ottenuti risultati tra loro coerenti, confermando che le condizioni ottimali di sintesi siano rappresentate da valori di pH alcalini ( $\geq 11.0$ ), temperatura di  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e tempo di reazione di 5 minuti. Alcune soluzioni colloidali ottenute seguendo questa sintesi ottimizzata a pH 11.5 sono state monitorate per 6 mesi, evidenziando come il picco plasmonico subisca un abbassamento e uno shift da  $\lambda = 398\text{ nm}$  a  $\lambda = 410\text{ nm}$ . Tale shift potrebbe essere attribuito a fenomeni di riarrangiamento superficiale e/o processi di aging. Tuttavia, in tali campioni si osserva che le NP sintetizzate mostrano una buona stabilità temporale a temperatura ambiente. Il controllo spettrofotometrico (Fig. 3.15), ha confermato una buona stabilità del sistema successivamente al periodo di invecchiamento (spettro rosso), evidenziata dal picco di assorbimento rilevato, che nonostante sia caratterizzato da una lieve diminuzione dell'intensità, continua a mantenersi definito ed elevato.

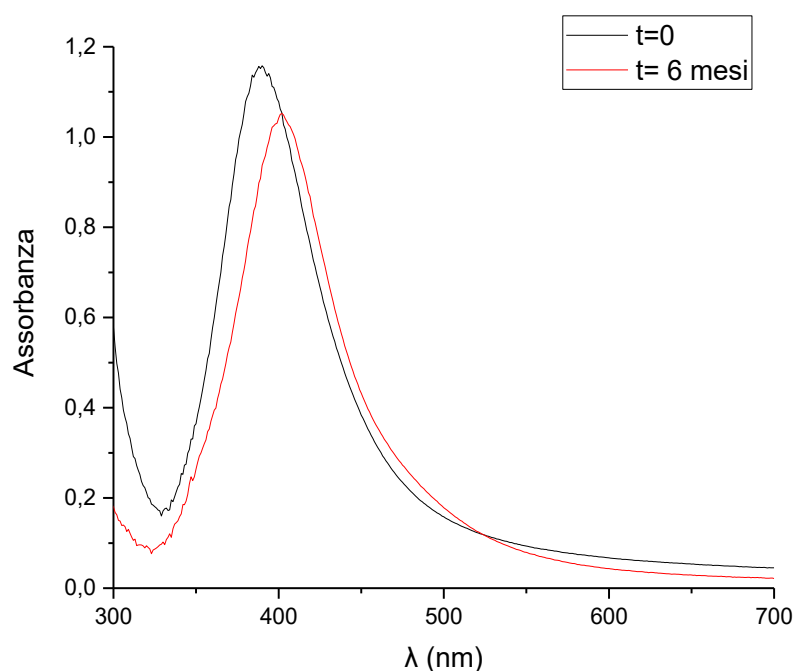


Figura 3.15: Confronto tra gli spettri di assorbimento UV-Vis del colloide a pH=11.5 in funzione del tempo: colloide istantaneamente prodotto t=0 (spettro nero) e colloide misurato a t=6 mesi (spettro rosso).

Sulla base dei risultati ottenuti, è evidente come i diversi parametri descritti, (pH, temperatura e tempo di reazione) influiscano sulla differenza di diametro. Essi, infatti, influenzano in modo determinante le proprietà chimico-fisiche e morfologiche delle nanoparticelle d'argento. In particolare, mediante un controllo sul pH viene conseguentemente regolato il potere riducente dell'acido ascorbico determinando variazioni significative nella dimensione, nella distribuzione dimensionale e nella concentrazione di NP ottenute. La temperatura invece permette di controllare il bilanciamento tra nucleazione e crescita delle nanoparticelle, evidenziando come 30 °C favoriscano la formazione di colloidali più omogenei e riproducibili. Infine, il tempo di reazione sembra avere minor influenza, pur mostrando come tempi prolungati potrebbero favorire fenomeni di riorganizzazione e/o perdita di stabilità colloidale. La centrifugazione ha inoltre confermato la diversa distribuzione dimensionale delle nanoparticelle tra surnatante e pellet, consentendo di discriminare NP di piccole dimensioni e/o più concentrate da NP più grandi o aggregate.

### 3.2 Saggio colorimetrico per la determinazione delle proteine totali

Le nanoparticelle sintetizzate sono state utilizzate per lo sviluppo di un metodo per la determinazione della concentrazione proteica, utilizzando la BSA come proteina modello. A questo scopo è stato ottimizzato un saggio colorimetrico che sfrutta la capacità delle proteine di adsorbirsi sulla superficie delle AgNP e di prevenirne l'aggregazione indotta attraverso l'aggiunta di NaCl. L'aggregazione è quindi inversamente proporzionale alla concentrazione di proteina incubata precedentemente con le nanoparticelle e viene rivelata grazie al cambiamento di colore della soluzione dal giallo-arancione originario del colloide a tonalità più scure o grigie in presenza di aggregati.

Più in dettaglio, la presenza di NaCl induce aggregazione nelle nanoparticelle grazie all'aumento della forza ionica indotto dalla presenza di sale, che comprime il doppio strato elettrico delle nanoparticelle, riducendo le repulsioni elettrostatiche tra particelle, come descritto dalla teoria DLVO. [57] Nel caso di nanoparticelle d'oro, tale fenomeno provoca uno shift della banda plasmonica verso lunghezze d'onda maggiori (red-shift), con conseguente cambiamento di colore della soluzione colloidale dal rosso al blu. [104] Nel caso di nanoparticelle d'argento, invece, questo comportamento si traduce in una diminuzione dei valori di assorbanza e uno spostamento e/o allargamento della banda plasmonica. La presenza della BSA modifica il comportamento delle nanoparticelle in presenza di NaCl; in particolare, la proteina infatti si adsorbe sulla superficie delle nanoparticelle attraverso interazioni elettrostatiche, formando una corona proteica che conferisce stabilità al sistema. Tale stabilità risulta essere fortemente dipendente dalla concentrazione di BSA. [85]

Inoltre, l'ottimizzazione del saggio colorimetrico ha permesso di comprendere l'interazione che intercorre tra le nanoparticelle d'argento e tale proteina, al fine di valutare la formazione di uno strato proteico superficiale e verificarne la stabilità in seguito all'aggiunta di NaCl. Nello specifico, l'ottimizzazione del saggio ha permesso di valutare l'influenza della morfologia delle nanoparticelle ottenute con parametri di sintesi differenti, rispetto alla presenza di BSA ed NaCl. Valutare l'impatto di questi parametri strutturali sul saggio colorimetrico permette di identificare la combinazione ottimale per massimizzare la sensibilità e la riproducibilità del metodo.

Per l'ottimizzazione del saggio sono state impiegate concentrazioni crescenti di proteina modello, al fine di individuare quale range rappresenti la quantità ottimale per saturare la superficie delle nanoparticelle e prevenire l'aggregazione. [81]

Questo saggio è stato condotto su 9 diverse sintesi (Tab. 3.2) e per ottimizzarlo sono stati variati alcuni parametri, come il pH, i volumi dei reagenti, le concentrazioni proteiche, i tempi di incubazione e la concentrazione di sale, al fine di valutare come questi possano direttamente influenzare le caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle e conseguentemente l'interazione tra nanoparticelle, proteina modello ed NaCl.

È possibile notare, come già precedentemente mostrato in Figura 3.14, come ci sia un andamento decrescente dei diametri per tutte le stime considerate (FESEM, script Matlab e DLS). All'aumentare dell'alcalinità, infatti, le dimensioni medie delle nanoparticelle diminuiscono progressivamente. A partire dai calcoli effettuati risulta possibile verificare quali concentrazioni di BSA risultano efficaci per proteggere le NP da aggregazione.

Tabella 3.2: Analisi comparativa dei campioni colloidali: confronto tra diametro medio stimato dalle immagini FESEM, diametro ottenuto da script Matlab e DLS.

| NOME             | pH   | Diametro stimato (nm) | Diametro Matlab (nm) | Diametro DLS (nm) |
|------------------|------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| SINTESI 1        | 7.0  | 60                    | 25                   |                   |
| SINTESI 2        | 8.0  | 60                    | 24                   | 30.2              |
| SINTESI 3        | 9.0  | 40                    | 20.25                | 21                |
| SINTESI 4        | 10.0 | 42                    | 20.52                | 19.9              |
| SINTESI 5        | 10.5 | 32                    | 18.28                | 26.6              |
| SINTESI 6        | 11.0 | 30                    | 17.7                 | 25.2              |
| SINTESI 7        | 11.5 | 30                    | 15.55                | 25                |
| SINTESI 8        | 12.0 | 20                    | 13                   | 13.53             |
| SINTESI 9        | 11.5 |                       |                      | 12.66             |
| SURNATANTE       |      | 21                    | 11.7                 |                   |
| SINTESI 9 PELLET | 11.5 | 30                    | 20.7                 |                   |

Il saggio sviluppato è stato inizialmente riadattato da un lavoro presente in letteratura [105], in cui le AgNP sono state preparate utilizzando glucosio come riducente e il saggio viene provato su volumi di 500  $\mu\text{l}$  con una misura finale fatta in cuvette tramite spettrofotometro. Da alcune prove preliminari di sintesi con glucosio è risultato come la sintesi non del tutto controllabile e le nanoparticelle così ottenute non siano per nulla stabili, in quanto soggette ad aggregazione dopo pochi minuti o in ogni caso entro 24-48 ore. Anche per questo motivo in questo lavoro è stata ottimizzata la sintesi tramite acido ascorbico, che risulta molto più stabile e ha permesso di controllare la morfologia delle NP finali. Inoltre, nel laboratorio dove si è svolto il lavoro di tesi questo saggio è stato precedentemente adattato per la misura su piccoli volumi (vol. totale del saggio di 120  $\mu\text{l}$ ) utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis equipaggiato con una cella per la misura di un esiguo volume (4  $\mu\text{l}$ ), campionato dal volume totale del saggio. In questo modo è possibile sfruttare il metodo per determinare le proteine anche su campioni di cui si dispone di piccoli volumi, e allo stesso tempo il costo medio del test risulta molto inferiore, visto che il quantitativo di AgNP necessario è minimo. Per questo motivo, una prima prova è stata condotta su un colloide ottenuto da una sintesi a pH pari a 11.5, e la variazione della risposta ottica del colloide in funzione della concentrazione di BSA è stata monitorata tramite spettrofotometro UV-Vis (Figura 3.16a). In assenza di BSA (curva rossa), la presenza dell'NaCl induce un'aggregazione repentina delle NP, visibile anche a occhio nudo per via della classica colorazione grigiastra che il colloide assume. Incrementando la quantità di BSA presente, l'aggregazione tende progressivamente a diminuire, dimostrando come essa dipenda fortemente dalla concentrazione di BSA presente, e il picco plasmonico diventa via via più simile al controllo (solo NP), nonostante non si raggiunga il medesimo valore di assorbanza. La presenza dello strato proteico protegge quindi le nanoparticelle dall'aggregazione indotta dal sale. La formazione della corona proteica, inoltre, dipende da molteplici fattori, tra cui le proprietà intrinseche delle nanoparticelle, dal pH, ma anche dalle interazioni che si instaurano tra proteine e nanoparticelle. Tale processo di adsorbimento non è statico, ma evolve nel tempo e cambia in funzione di questi parametri. In particolare, l'incubazione con NP a pH progressivamente più alcalini induce una conformazione della BSA

più estesa che può modificare l'interazione con le nanoparticelle e favorire la formazione della corona proteica. [80, 89]

In Figura 3.16b si riporta la rispettiva curva ottenuta dal valore del massimo di assorbanza di ogni curva ( $A_{\lambda_{max}}$ ) per le diverse concentrazioni di BSA. Questo permette di costruire una curva di calibrazione che in questo caso mostra un trend crescente.

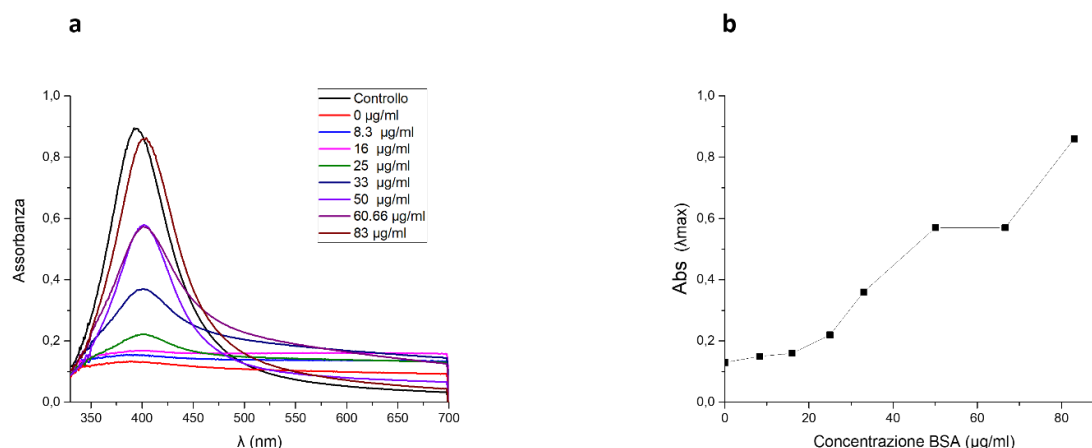


Figura 3.16: Spettri del saggio colorimetrico con BSA ottenuti mediante UV-vis. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta di NaCl a differenti concentrazioni di BSA (0–83 µg/ml) (a), e l'andamento del comportamento del colloide in funzione della BSA (b).

### 3.2.1 Adattamento del saggio colorimetrico per la misura con lettore di piastre ed effetto del volume della sospensione colloidale sull'interazione nanoparticelle–BSA

Dopo le prime prove, si è deciso di riottimizzare il saggio per adattarlo per essere eseguito in piastre multipozzetto, con misura tramite lettore di piastre. La misura della risposta ottica del colloide con lettore di piastra risulta particolarmente conveniente in quanto, in vista dell'applicazione finale, consente di analizzare molti campioni in parallelo e di accelerare i tempi del saggio. Solitamente però la lettura in piastra richiede l'uso di volumi maggiori rispetto alla metodologia utilizzata per la misura UV-Vis allo spettrofotometro, è stato quindi valutato l'effetto sul saggio dell'uso di volumi diversi della sospensione colloidale mantenendo costanti le altre condizioni sperimentali. In questo modo è infatti possibile valutare come l'adsorbimento di concentrazioni crescenti di BSA sulle nanoparticelle possa dipendere in modo diretto dai volumi utilizzati. Tale test ha permesso di verificare se l'aumento delle quantità di nanoparticelle disponibili in soluzione comporti differenze nell'adsorbimento superficiale della proteina e di conseguenza nella stabilità del colloide in presenza di NaCl. Alla condizione di pH = 12.0 (n.8) e diametro medio stimato pari a 13 nm il saggio con BSA è stato testato utilizzando 200 µl di NP, 20 µL complessivi di H<sub>2</sub>O + BSA e 20 µl di NaCl 5 M. La prova è stata inizialmente misurata all'UV-Vis (Fig. 3.17a) ed in parallelo mediante lettore di piastra. Per quest'ultima misura, però, il segnale ha rilevato un fenomeno di saturazione,

motivo per cui è stato necessario diluire il campione in un rapporto 1:2, mantenendo però un volume finale nel pozzetto di 240  $\mu\text{l}$ .

Mediante l'analisi eseguita al lettore di piastra (Fig. 3.17b), l'andamento risulta analogo e i picchi più stretti ma con valori di assorbanza più alti. L'andamento degli spettri risulta proporzionale alla concentrazione di BSA utilizzata con un trend via via crescente.

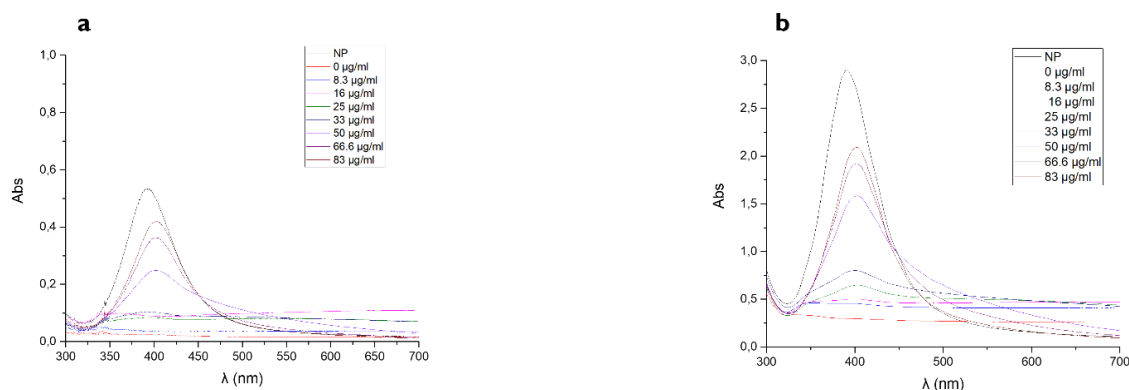


Figura 3.17: Confronto tra gli spettri di assorbanza ottenuti dalle miscele NP-proteina alle diverse concentrazioni di BSA dopo diluizione del campione misurati tramite spettrofotometro UV-Vis (a) o tramite lettore di piastre (b).

In linea con quanto osservato nel caso della sintesi a  $\text{pH} = 11.5$  precedentemente analizzata, l'andamento del grafico assorbanza- concentrazione risulta essere crescente e proporzionale alla concentrazione di BSA. In particolare, risulta pressoché lineare alle basse concentrazioni, mentre a concentrazioni più elevate si verificano delle variazioni piuttosto marcate. Questo andamento si potrebbe collegare a una progressiva saturazione della superficie delle nanoparticelle: alle basse concentrazioni, l'adsorbimento della BSA avviene in modo relativamente uniforme, mentre all'aumentare della concentrazione la possibile formazione di multistrati e la presenza di fenomeni di interazione proteina-proteina possono generare tale trend.

Confrontando il campione diluito e non diluito effettuata mediante spettrometro (Fig. 3.18) ma di cui si evidenzia la misura effettuata anche al lettore di piastra presente in appendice (Fig.1), è possibile notare come il campione non diluito presenti valori di assorbanza significativamente più alti rispetto al campione diluito lungo tutto l'intervallo di concentrazioni. Nel campione non diluito si osserva un aumento più marcato dell'assorbanza soprattutto oltre 33  $\mu\text{g/ml}$ , mentre nel campione diluito l'incremento è più graduale e con valori complessivamente inferiori.

In ogni caso, in quanto la diluizione 1:2 potrebbe influenzare il risultato finale poiché' modifica anche la concentrazione di BSA, è stato infine preferito misurare in piastra con volume dimezzato per evitare la saturazione, tornando ad un volume totale di test di 120  $\mu\text{l}$ .

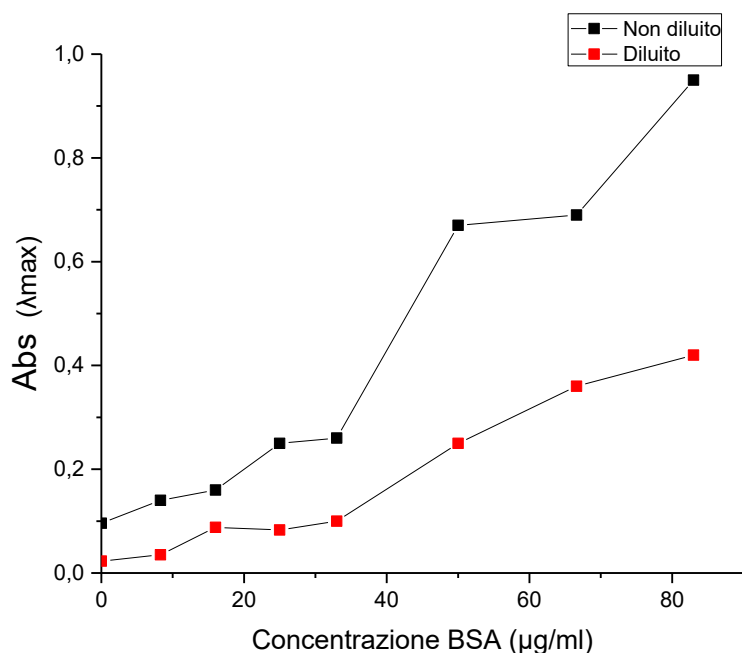


Figura 3.18: Profilo di assorbanza ottenuti in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento confronto tra: campione diluito e non. (misure effettuate allo spettrometro)

### 3.2.2 Effetto del pH sulla stabilità e interazione nanoparticelle–BSA

Il saggio colorimetrico con BSA è stato condotto su ogni campione ottenuto da sintesi a pH crescente, al fine di valutare come l'influenza del pH, e la conseguente variazione del diametro delle nanoparticelle ottenute, agiscano sulla risposta del sistema. Per questa valutazione sono state utilizzate le stesse sintesi condotte a diverso pH riportate nel paragrafo 3.1.3, nell'intervallo 7.0–12.0.

In particolare, dai risultati ottenuti al lettore di piastra a seguito dell'interazione con concentrazioni crescenti di BSA e NaCl, è possibile constatare come a pH più bassi, la banda plasmonica appare più ampia e meno intensa, al contrario pH più alti sono caratterizzati da una banda plasmonica più stretta e più intensa (Appendice Fig. 2,3,4,5,6,7,8,9).

Dal grafico (Fig.3.19) è possibile dividere le curve in tre regioni: nella prima zona, a basse concentrazioni di BSA, la protezione è insufficiente e prevale l'aggregazione indotta dal sale; a concentrazioni intermedie si osserva un rapido aumento dell'assorbanza, attribuibile alla progressiva copertura della superficie delle nanoparticelle; infine, nella terza zona, a concentrazioni più elevate si raggiunge un plateau, indicativo della saturazione superficiale. Il pH influenza il diametro e le proprietà delle nanoparticelle, motivo per cui è possibile osservare come pH meno alcalini (7.0-8.0) raggiungono il plateau per valori di assorbanza meno elevati, a causa della presenza di diametri maggiori, che portano anche ad avere concentrazioni inferiori di nanoparticelle (Tab.1). A pH più basici, si raggiungono plateau di assorbanza significativamente più elevati ( $A = 2.0 - 2.5$ ).

Tali risultati suggeriscono come un pH elevato nella sintesi favorisca la formazione di nanoparticelle più uniformi e una migliore interazione con la BSA, mentre condizioni meno basiche portino a sistemi meno stabili, in cui l'adsorbimento della proteina risulta meno evidente. La variazione di intensità dei valori di assorbanza raggiunti risulta quindi dipendente sia dalla geometria delle NP, per cui la presenza di gap strutturali tra le stesse permette di raggiungere assorbimenti plasmonici con massimi limitati nell'intorno di 1, sia dall'efficienza del processo di adsorbimento della proteina.

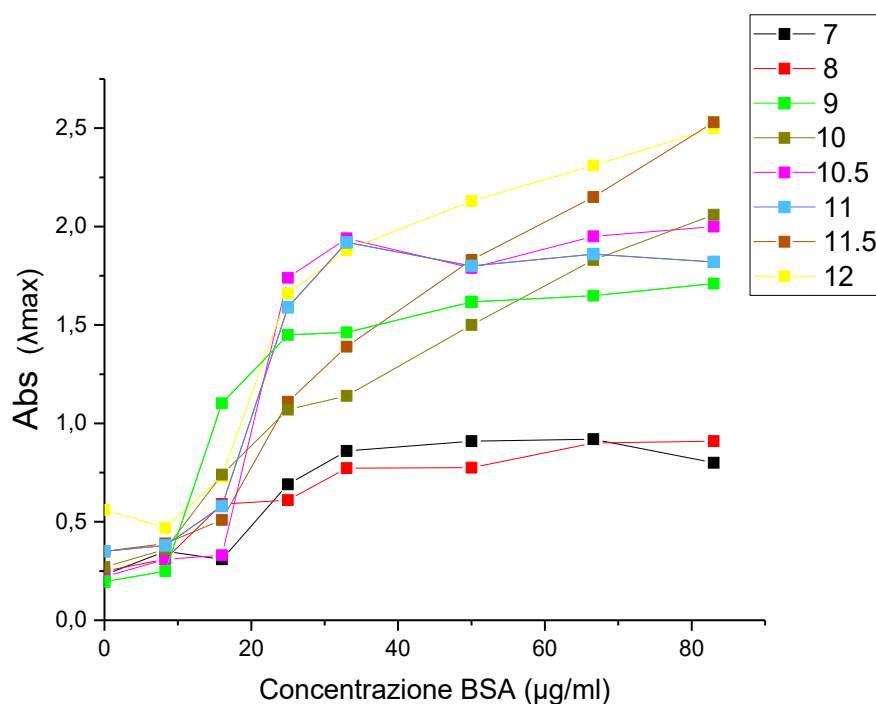


Figura 3.19: Profili di assorbanza in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento sintetizzate a differenti valori di pH.

Per supportare tale ipotesi, sono state effettuate delle stime dell'area superficiale disponibile per ogni campione, e dell'ingombro di una singola molecola di BSA. Tutte le nanoparticelle sono state approssimate a delle sfere, potendo così ricavare la superficie disponibile per la BSA. Assumendo i 2 possibili orientamenti che la proteina modello può assumere sulla superficie delle nanoparticelle, distinguiamo: l'orientamento di testa ("end-on"), a cui corrisponde un'area di ingombro minima ( $A_{min}=28.6403\text{nm}^2$ ), e l'orientamento di lato ("side-on"), caratterizzato da un'area di ingombro massima ( $A_{max}=40.8850\text{nm}^2$ ). [106] Dal rapporto tra l'area superficiale totale delle nanoparticelle e questi due valori di ingombro sterico, è stato possibile stimare l'intervallo teorico del numero totale di molecole di BSA necessarie per la saturazione superficiale (formazione del monostrato) in ciascun campione analizzato. In Tabella 3.3 e 3.4, i calcoli sono stati effettuati considerando la sintesi a pH 11.5 e 7.0 selezionate in quanto rappresentano i due estremi dimensionali studiati, in particolare le nanoparticelle sintetizzate a pH 7.0 presentano un diametro medio doppio rispetto a quelle ottenute a pH 11.5. Per i calcoli sono stati utilizzati i diametri medi ottenuti mediante FESEM e DLS.

Successivamente sulla base di tali calcoli, è stato possibile stimare il numero di molecole effettivo, necessario alla completa copertura delle NP, considerando un volume complessivo pari a 120  $\mu\text{l}$ . I calcoli effettuati sono riportati in Tabella 3.3, 3.4 e 3.5. Nelle seguenti tabelle è stata definita la “concentrazione critica di saturazione” con cui si indica la quantità di BSA necessaria per ottenere la saturazione della superficie delle nanoparticelle nel volume di lavoro impiegato (120  $\mu\text{l}$ ). Per i colloidi considerati, le concentrazioni teoriche necessarie alla saturazione delle nanoparticelle risultano minori rispetto a quelle utilizzate in laboratorio (8.3 - 83  $\mu\text{g/ml}$ ). Il confronto tra i calcoli teorici e i dati sperimentali relativi alla saturazione della superficie delle nanoparticelle con BSA evidenzia significative differenze basate sul diametro utilizzato. Basandosi sui diametri stimati tramite FESEM (Tab. 3.3), per il colloide a pH 11.5 si ottengono concentrazioni di 7.93  $\mu\text{g/ml}$  (posizione *end-on*) e 5.55  $\mu\text{g/ml}$  (posizione *side-on*), valori che confermano come la concentrazione reale minima utilizzata in laboratorio (8.3  $\mu\text{g/ml}$ ) sia superiore a quella calcolata. Analogamente, per il colloide a pH 7.0, le concentrazioni teoriche di 4.01  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\min}$ ) e 2.81  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\max}$ ) rimangono inferiori rispetto al range di BSA testato. Utilizzando il diametro medio DLS1 (media complessiva dei picchi) (Tab. 3.4 e 3.5), le concentrazioni teoriche necessarie risultano pari a: per il colloide a pH 11.5 a 3.28  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\min}$ ) e 2.30  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\max}$ ), mentre per quello a pH 7.0 sono pari a 1.01  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\min}$ ) e 0.713  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\max}$ ). Considerando invece il diametro del picco a maggior intensità DLS2 (Tab. 3.3. e 3.4), le concentrazioni richieste aumentano, raggiungendo per il colloide a pH 7.0 valori di 6.33  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\min}$ ) e 4.43  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\max}$ ), e per quello a pH 11.5 valori di 28.63  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\min}$ ) e 20.5  $\mu\text{g/ml}$  ( $A_{\max}$ ). In conclusione, sebbene i calcoli teorici basati su FESEM e DLS suggeriscano che le concentrazioni impiegate dovrebbero essere sufficienti a garantire la saturazione, i dati realmente utilizzati dimostrano che sono necessari valori di concentrazione più elevati per proteggere completamente le nanoparticelle dall’aggregazione indotta da sale. I risultati sperimentali ottenuti mostrano che le concentrazioni più basse di BSA (0- 33  $\mu\text{g/ml}$ ) non sono risultate sufficienti a indurre la completa protezione delle nanoparticelle, con conseguente aggregazione. La saturazione è stata osservata a partire da circa 50  $\mu\text{g/ml}$ . Probabilmente questo è dovuto alla necessità di avere più strati di BSA sulla superficie o al fatto che in realtà l’adsorbimento della BSA sia regolato da un equilibrio dinamico in soluzione e non tutta la proteina presente resta stabilmente sulla superficie. Entrambe le teorie sono ampiamente discusse in letteratura. [106] Allo stesso tempo, la discrepanza potrebbe essere dovuta all’incertezza sul valore utilizzato per il diametro delle nanoparticelle.

Tale discrepanza evidenzia come i calcoli teorici forniscano una stima ideale della quantità di BSA necessaria alla saturazione, mentre nel saggio effettuato intervengono ulteriori fattori, quali: la dimensione delle nanoparticelle e le dinamiche di adsorbimento della proteina sulla loro superficie. [82]

Tabella 3.3: Stima teorica della quantità di BSA necessaria per la saturazione superficiale delle nanoparticelle d'argento, utilizzando un diametro medio calcolato mediante immagini acquisite al FESEM.

| pH                                                  | 11.5 ( $A_{min}$ )             | 11.5 ( $A_{max}$ )             | 7 ( $A_{min}$ )                | 7 ( $A_{max}$ )                |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Diametro                                            | 30 nm                          | 30 nm                          | 60 nm                          | 60 nm                          |
| Area NP                                             | 2816 nm <sup>2</sup>           | 2826 nm <sup>2</sup>           | 11304 nm <sup>2</sup>          | 11304 nm <sup>2</sup>          |
| Area singola molecola                               | 28.64 nm <sup>2</sup>          | 40.89 nm <sup>2</sup>          | 28.64 nm <sup>2</sup>          | 40.89 nm <sup>2</sup>          |
| Numero totale di molecole di BSA per la saturazione | $8.63 \times 10^{12}$ molecole | $6.04 \times 10^{12}$ molecole | $4.36 \times 10^{12}$ molecole | $3.06 \times 10^{12}$ molecole |
| Rapporto molecole BSA / singola nanoparticella      | 98.74                          | 69.12                          | 394.69                         | 276.58                         |
| Quantità in moli di BSA (n)                         | $1.43 \times 10^{-12}$ mol     | $10.0 \times 10^{-12}$ mol     | $7.25 \times 10^{-12}$ mol     | $5.08 \times 10^{-12}$ mol     |
| Massa teorica di BSA richiesta (m)                  | 0.952 µg                       | 0.665 µg                       | 0.481 µg                       | 0.337 µg                       |
| Concentrazione critica di saturazione (0.12 ml)     | 7.93 µg/ml                     | 5.55 µg/ml                     | 4.01 µg/ml                     | 2.81 µg/ml                     |

Tabella 3.4: Stima teorica della quantità di BSA necessaria per la saturazione superficiale delle nanoparticelle d'argento per il colloide a pH 7.0, utilizzando rispettivamente per DLS1 il diametro medio e per DLS2 il diametro del picco a maggior intensità.

|                                                     | DLS1                           |                                | DLS2                           |                                |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| pH                                                  | 7 ( $A_{min}$ )                | 7 ( $A_{max}$ )                | 7 ( $A_{min}$ )                | 7 ( $A_{max}$ )                |
| Diametro                                            | 30.2 nm                        | 30.2 nm                        | 75.4 nm                        | 75.4 nm                        |
|                                                     | 2869 nm <sup>2</sup>           | 2869 nm <sup>2</sup>           | 17851 nm <sup>2</sup>          | 17851 nm <sup>2</sup>          |
| Area singola molecola                               | 28.64 nm <sup>2</sup>          | 40.89 nm <sup>2</sup>          | 28.64 nm <sup>2</sup>          | 40.89 nm <sup>2</sup>          |
| Numero totale di molecole di BSA per la saturazione | $11.1 \times 10^{12}$ molecole | $77.6 \times 10^{12}$ molecole | $6.89 \times 10^{12}$ molecole | $4.83 \times 10^{12}$ molecole |
| Rapporto molecole BSA / singola nanoparticella      | 100.19                         | 70.18                          | 623.30                         | 436.62                         |
| Quantità in moli di BSA (n)                         | $1.84 \times 10^{-12}$ mol     | $1.29 \times 10^{-12}$ mol     | $1.14 \times 10^{-11}$ mol     | $8.02 \times 10^{-12}$ mol     |
| Massa teorica di BSA richiesta (m)                  | 0.122 µg                       | 0.086 µg                       | 0.760 µg                       | 0.533 µg                       |
| Concentrazione critica di saturazione (0.12 ml)     | 1.01 µg/ml                     | 0.713 µg/ml                    | 6.33 µg/ml                     | 4.43 µg/ml                     |

Tabella 3.5: Stima teorica della quantità di BSA necessaria per la saturazione superficiale delle nanoparticelle d'argento per il colloide a pH 11.5, utilizzando rispettivamente per DLS1 il diametro medio e per DLS2 il diametro del picco a maggior intensità.

|                                                     | DLS1                           |                                | DLS2                            |                                |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| pH                                                  | 11.5 ( $A_{min}$ )             | 11.5 ( $A_{max}$ )             | 11.5 ( $A_{min}$ )              | 11.5 ( $A_{max}$ )             |
| Diametro                                            | 19.3 nm                        | 19.3 nm                        | 57 nm                           | 57 nm                          |
|                                                     | 1170 nm <sup>2</sup>           | 1170 nm <sup>2</sup>           | 10202 nm <sup>2</sup>           | 10202 nm <sup>2</sup>          |
| Area singola molecola                               | 28.64 nm <sup>2</sup>          | 40.89 nm <sup>2</sup>          | 28.64 nm <sup>2</sup>           | 40.89 nm <sup>2</sup>          |
| Numero totale di molecole di BSA per la saturazione | $3.57 \times 10^{12}$ molecole | $2.50 \times 10^{12}$ molecole | $31.10 \times 10^{12}$ molecole | $21.8 \times 10^{12}$ molecole |
| Rapporto molecole BSA / singola nanoparticella      | 40.84                          | 28.61                          | 356.21                          | 294.53                         |
| Quantità in moli di BSA (n)                         | $5.93 \times 10^{-12}$ mol     | $4.15 \times 10^{-12}$ mol     | $5.17 \times 10^{-11}$ mol      | $3.62 \times 10^{-11}$ mol     |
| Massa teorica di BSA richiesta (m)                  | 0.394 µg                       | 0.276 µg                       | 3.43 µg                         | 2.40 µg                        |
| Concentrazione critica di saturazione (0.12 ml)     | 3.28 µg/ml                     | 2.30 µg/ml                     | 28.63 µg/ml                     | 20.5 µg/ml                     |

I risultati ottenuti osservando gli spettri, seppur non del tutto equiparabili ai calcoli teorici, permettono di affermare come a pH più basici, corrispondenti a concentrazioni maggiori di nanoparticelle, le concentrazioni crescenti di BSA portino ad una copertura superficiale fino a saturazione. Al contrario, a pH meno alcalini, i colloidi sono costituiti da una concentrazione inferiore di nanoparticelle, per cui a concentrazioni inferiori di BSA si raggiunge un plateau più in fretta. L'aggregazione riduce, inoltre, l'area reale che la proteina dovrebbe coprire, per cui tale adsorbimento si traduce in una stabilizzazione sterica a basse concentrazioni proteiche sufficiente a bloccare l'ulteriore crescita cinetica degli aggregati motivo per cui, negli spettri si osserva un plateau.

### 3.2.3 Effetto dei tempi di incubazione della BSA sulle nanoparticelle

Al fine di valutare come l'adsorbimento della corona proteica cambi nel tempo, il saggio colorimetrico è stato provato con diversi tempi di incubazione tra proteina e nanoparticelle. La formazione della corona proteica attorno alle nanoparticelle rappresenta un parametro importante che evolve progressivamente fino al raggiungimento di un equilibrio e successiva saturazione. Tale comportamento è infatti influenzato inizialmente da fenomeni di adsorbimento sulla superficie delle nanoparticelle, seguito da riorganizzazioni conformazionali fino al raggiungimento di un equilibrio. [82]

In particolare, sono state testate 2 sintesi, a pH rispettivamente pari a 11.0 (n.6) e 11.5 (n.7) rispettivamente con diametro medio stimato mediante script uguale a 17.7 nm e 15.5 nm e pari a 25.20 nm (pH=11.0) e 25 nm (pH=11.5) stimato mediante DLS. Le prove sono state condotte incubando la BSA, rispettivamente per 10, 30 e 60 minuti. Dall'analisi dei grafici concentrazione – assorbanza (Fig.3.20 a), ottenuti a partire dagli spettri ricavati al lettore di piastra (Appendice Fig. 10,11,12), è possibile vedere come i colloidi con diametro pari a 17.7 nm (pH 11.0) abbiano valori di assorbanza leggermente più elevati rispetto al colloide a pH=11.5 (Fig. 3.20 b) (Appendice Fig. 14,15,16). Questo potrebbe non dipendere da una maggior concentrazione di nanoparticelle. Infatti, le concentrazioni risultano uguali nel caso di

diametri calcolati al FESEM, ma leggermente differenti quando ottenute sulla base dei diametri stimati mediante script Matlab o DLS (Tab.3.1). La diversa assorbanza potrebbe quindi essere una conseguenza delle proprietà ottiche individuali delle nanoparticelle. Questo trend, infatti, può essere direttamente collegato al diametro medio delle nanoparticelle, che risulta maggiore a valori di pH più bassi. All'aumentare della dimensione media delle nanoparticelle, infatti, cambiano le proprietà di estinzione ottica, che includono i contributi legati all'assorbimento e allo scattering. In particolare, per particelle con diametro inferiore a 50 nm il contributo legato all'assorbimento è dominante, al contrario, in presenza di diametri maggiori ( $d > 50-80$  nm) il contributo dello scattering diventa più rilevante ed infine per particelle di grandi dimensioni, tale contributo tende a predominare. [8] Di conseguenza, le variazioni dei valori di assorbanza riflettono le differenze morfologiche delle nanoparticelle e le proprietà ottiche, piuttosto che a un cambiamento nel modo in cui la proteina modello si lega alla superficie metallica. Per entrambe le sintesi, il trend risulta sovrapponibile per tutti e tre i tempi di incubazione, per cui tale parametro, nel range temporale analizzato, non sembra influire in modo significativo sul modo in cui la proteina si dispone attorno alle nanoparticelle. L'interazione della proteina con le nanoparticelle si verifica mediante un rapido adsorbimento guidato da diverse forze, come interazioni elettrostatiche e forze di Van der Waals e, inoltre, sembra verificarsi in modo analogo nei due sistemi e nelle varie condizioni sperimentali testate, suggerendo come nei primi 10 minuti l'adsorbimento della BSA raggiunga probabilmente uno stato prossimo all'equilibrio. [82,84,87]

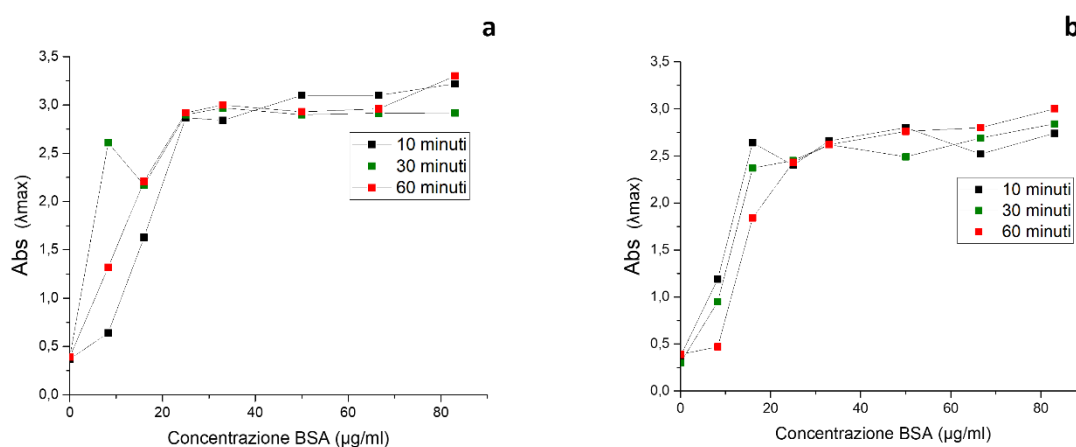


Figura 3.20: Profili di assorbanza in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento sottoposte a diversi tempi di incubazione; confronto tra: pH=11.0 (a) pH=11.5 (b).

Nel complesso, dai risultati emerge come l'adsorbimento della proteina avvenga secondo modalità simili ai diversi tempi di incubazione analizzati, mentre le proprietà ottiche delle nanoparticelle, come dimostrato già precedentemente, determinano variazioni quantitative, osservabili negli spettri (Appendice Fig.10-15). Il tempo di incubazione appare dunque come un parametro secondario se comparato alle caratteristiche morfologiche e ottiche delle nanoparticelle, nel range temporale analizzato. La formazione della corona proteica con BSA si dimostra quindi come un processo rapido che non determina variazioni significative della stabilità e non rappresenta un parametro critico nel determinare modifiche sostanziali nell'organizzazione della corona proteica stessa.

### 3.2.4 Effetto del tempo di incubazione e dell'estensione del range di concentrazione di BSA sul sistema di nanoparticelle

Al fine di testare un intervallo più ampio di concentrazione proteica, il saggio è stato ripetuto introducendo due variazioni nel sistema: i) utilizzo di uno stock di BSA pari da 0 a 166  $\mu\text{g/ml}$ , e ii) variazione dei tempi di incubazione. Tale passaggio ha permesso di verificare se la differenza del trend dipendesse dalla concentrazione o dai tempi di incubazione. Tale prova è stata effettuata sulla sintesi n.9 a  $\text{pH} = 11.5$  e diametro medio stimato pari a 15.5 nm. Anche in questo caso il saggio è stato condotto seguendo tre condizioni sperimentali. Nella prima l'incubazione con BSA e nanoparticelle è avvenuta per 10 minuti, seguita dall'incubazione con NaCl per 10 minuti. Nella seconda, invece, l'incubazione con BSA è stata mantenuta per trenta minuti, e nella terza per un'ora.

Dal grafico UV-vis (Appendice Fig. 16,17,18) è possibile constatare come gli spettri presentano una distribuzione omogenea e con incremento graduale dell'intensità del picco, confermato anche dal grafico  $A_{\lambda_{\text{max}}}$  --concentrazione (Fig.3.21), in cui è possibile vedere come l'andamento risulti crescente, e come l'aggregazione indotta dal sale diminuisca in maniera proporzionale con la concentrazione di BSA. Come si evince dal grafico, l'incubazione per più tempo con la BSA (Fig.3.20) e in un range proteico maggiore conferisce al colloide un adsorbimento più completo e/o miglior arrangiamento della BSA attorno alle nanoparticelle, oltre che miglior stabilità. Tempi maggiori (30 e 60 minuti) permettono di raggiungere valori di assorbanza più elevati, in particolare a concentrazioni di BSA superiori a 100  $\mu\text{g/ml}$ , il valore di  $A_{\lambda_{\text{max}}}$  non aumenta più e tutte le curve tendono a convergere. Indipendentemente dal tempo di incubazione, il sistema ha raggiunto la capacità massima di adsorbimento.

È interessante notare come tale saturazione avvenga a concentrazioni differenti a seconda del pH di sintesi. Confrontando tale risultato con i grafici posti nel paragrafo 3.3.3, in particolare per la sintesi a pH 11.0, la saturazione era già evidente sopra i 30  $\mu\text{g/ml}$ . In questo caso invece (Fig. 3.20) il plateau è raggiunto oltre i 100  $\mu\text{g/ml}$ . Risulta quindi plausibile ipotizzare che una diversa dimensione delle NP, influenzi la superficie disponibile per l'adsorbimento. Allo stesso tempo la discrepanza potrebbe essere dovuta semplicemente ad un po' di variabilità del saggio, e non direttamente alle dimensioni delle nanoparticelle.

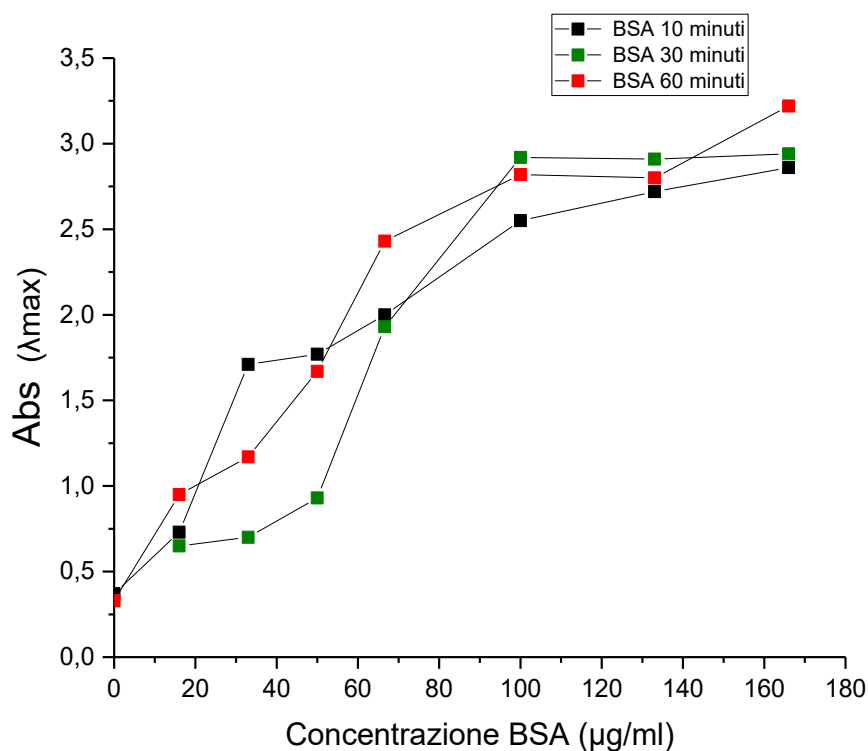


Figura 3.21: Effetto di diversi tempi di incubazione della BSA sul saggio colorimetrico nel range 0-166 µg/ml

Nel complesso, questi dati dimostrano come il raggiungimento della saturazione indotta dalla BSA possa dipendere dalla concentrazione della proteina, e in maniera meno marcata dai tempi di incubazione. Considerando gli andamenti simili e le parziali sovrapposizioni tra le curve nei diversi intervalli temporali, non è possibile escludere che lievi variazioni riscontrate siano in parte influenzate da variabili sperimentale del sistema.

Tempi di interazione più lunghi, quindi, potrebbero favorire la stabilità e l'uniformità del rivestimento proteico. Tuttavia, data la sovrapposizione delle curve, il ricoprimento con BSA ottenuto già a 10 minuti risulta sufficiente a garantire la protezione del colloide dall'aggregazione indotta dal sale. Inoltre, una riduzione delle tempistiche è sempre un vantaggio quando si sviluppa un saggio analitico, se i risultati finali non vengono compromessi, come in questo caso. Per le prove successive la BSA sarà quindi incubata per 10 minuti.

### 3.2.5 Effetto della separazione delle nanoparticelle tramite centrifuga sul saggio

Per ottenere una chiara comprensione di come avvenga l'interazione tra le nanoparticelle e la BSA, tale saggio è stato testato sul surnatante e sul pellet di nanoparticelle risospese, ottenuti tramite centrifugazione. Teoricamente, tale step permette sia di lavare le nanoparticelle dai reagenti in eccesso e da eventuali sottoprodotti di sintesi rimasti nella soluzione, sia di distinguere il comportamento delle nanoparticelle rimaste sospese (più piccole) da quelle precipitate (più grandi), così da poter differenziare come i fenomeni di adsorbimento della proteina e stabilizzazione superficiale siano influenzati dalle caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle ed in particolare dal diametro medio.

Il surnatante e il corrispettivo pellet risospeso in acqua della sintesi (n.9) a pH 11.5 sono stati testati con le medesime condizioni sperimentali, in modo da garantire un confronto diretto.

Dal confronto, riportato in Figura 3.22, emergono differenze significative già evidenziate nella fase di caratterizzazione. Infatti, entrambe mostrano un andamento generale simile, suggerendo come l'interazione tra BSA e nanoparticelle sia analoga: a basse concentrazioni di proteina i valori di assorbanza rimangono minimi, indice dell'avvenuta aggregazione e conseguente precipitazione. A concentrazioni maggiori di BSA si osserva per entrambe le frazioni un repentino e marcato incremento dell'assorbanza, che successivamente si stabilizza progressivamente verso un plateau. La differenza più evidente è collegata ai valori di assorbanza raggiunti: il surnatante, infatti, presenta valori di assorbanza inferiori (Appendice Fig. 19,20), mentre il pellet presenta valori più elevati, le lunghezze d'onda invece risultano molto simili, ovvero 400 nm per il surnatante e 403 nm per il pellet. Tale risultato potrebbe suggerire come la differenza tra le due frazioni sia legata ad una differenza di concentrazione di NP piuttosto che alla presenza di popolazioni dimensionali leggermente differenti.

Tali dati suggeriscono come la centrifugazione non modifichi sostanzialmente il comportamento di adsorbimento della BSA, poiché l'interazione tra proteina e superficie delle NP risulta invariata in termini di andamento, il quale risulta coerente per entrambe le frazioni. Al contrario, la concentrazione, la morfologia e la distribuzione delle nanoparticelle influenzano diversamente l'intensità della risposta spettroscopica.

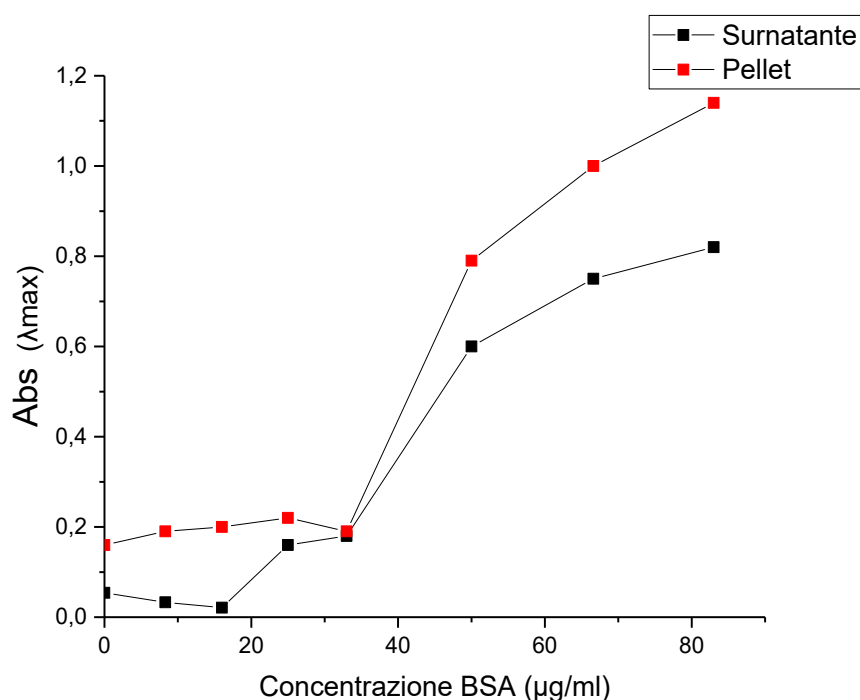


Figura 3.22: Profili di assorbanza in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento confronto tra: surnatante e pellet.

Nel complesso, questi risultati evidenziano, come già dimostrato nella sezione 3.1.5, come la separazione tramite centrifuga abbia solo una lieve influenza sull'intensità della risposta spettroscopica. Ciò si riflette, nel caso del pellet, in un comportamento più lineare e prevedibile dell'assorbanza in funzione della concentrazione di BSA. Al contrario, il surnatante, contenente particelle più piccole, mostra una risposta meno intensa. La separazione tra surnatante e pellet fornisce, quindi, informazioni rilevanti sull'interazione tra nanoparticelle e proteina, ma non sembra essere un parametro fondamentale per la riuscita del saggio.

### 3.2.6 Effetto di concentrazioni crescenti di NaCl sul saggio

Al fine di valutare la risposta del sistema in presenza di diverse concentrazioni saline, il saggio è stato provato su nanoparticelle d'argento ottenute a pH differenti, nello specifico pari a 7.0 (n.1), 8.0 (n.2) e 11.0 (n. 6). In questo modo, l'effetto della concentrazione salina è stato studiato su nanoparticelle di dimensione differente. Per quanto riguarda la sintesi n.6, le medesime condizioni sperimentali sono state applicate anche alla frazione ottenuta mediante centrifugazione, lavaggio e successiva risospensione.

Come si evince dai grafici in Figura 3.23, a pH meno alcalini (Campioni n.1 e n.2, rispettivamente a pH 7.0 e 8.0), la concentrazione di NaCl 1 M permette di raggiungere valori di assorbanza maggiori. Tale comportamento, potrebbe essere favorito dall'azione protettiva della corona proteica di BSA che, nella condizione a minor concentrazione salina tra quelle testate, risulta particolarmente efficace nel proteggere le nanoparticelle. Al contrario, all'aumentare della concentrazione di NaCl (2.5 M e soprattutto 5 M), si osserva generalmente

una riduzione dei valori di assorbanza e una minore regolarità dell'andamento, per cui la BSA non riesce a proteggere le nanoparticelle, queste aggregano e precipitano. Tale comportamento, risulta coerente con la teoria DLVO, secondo cui l'incremento della forza ionica riduce le repulsioni elettrostatiche e rende predominanti le interazioni attrattive, favorendo instabilità colloidale e quindi processi di aggregazione. [106]

L'andamento degli spettri ottenuto mediante lettore di piastra risulta visibile in Appendice Figura 21 e 22. Per entrambi i campioni, l'utilizzo della concentrazione NaCl 1 M rappresenta la condizione più favorevole per mantenere elevati livelli di assorbanza, indicando quindi una miglior dispersione del sistema. La destabilizzazione indotta da un'elevata forza ionica (come nel caso della condizione a 5 M) risulta maggiore a valori di pH meno alcalini poiché la stabilità del colloide è già ridotta a causa della minor carica superficiale e minor efficacia nelle interazioni repulsive. In tali condizioni, la compressione del doppio strato elettrico indotta dal NaCl diventa il fattore predominante nel determinare l'aggregazione delle nanoparticelle. [56,57,107]

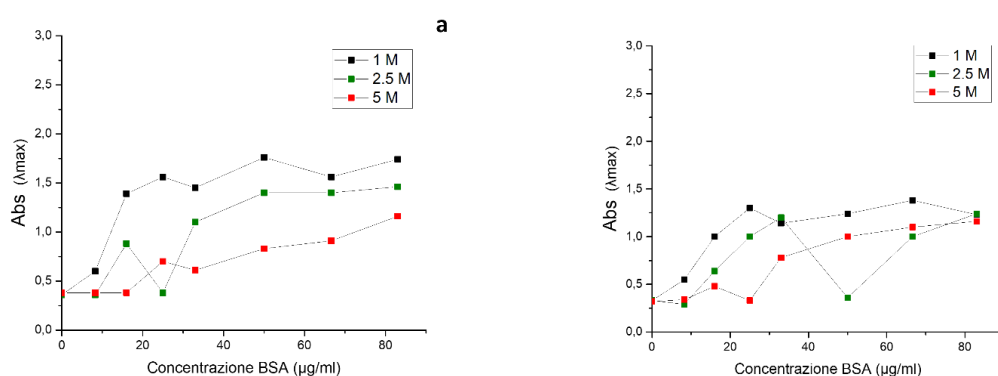


Figura 3.23: Valori di assorbanza  $\lambda_{max}$  in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento confronto tra: pH=7.0 (a) e pH=8.0 (b).

A pH più basici e a concentrazione più elevate di NaCl (5 M) si osservano valori iniziali di assorbanza inferiori (Fig. 3.24) compatibili con un'aggregazione più marcata indotta dall'elevata forza ionica. A concentrazioni maggiori di BSA l'andamento degli spettri risulta progressivo e ben distinguibile (Appendice Fig. 23) indicando che l'effetto della BSA è tale da stabilizzare efficacemente le nanoparticelle, impedendo o limitando l'aggregazione indotta dall'elevata concentrazione di sale. Infatti, la BSA, adsorbendosi sulla superficie delle nanoparticelle, contribuisce, come già evidenziato, alla formazione di una corona proteica. A tali valori di pH la BSA, trovandosi a un valore superiore al proprio punto isoelettrico ( $5.1 < pI < 5.5$ ), presenta una forte carica netta negativa. [54] Tale condizione favorisce la formazione di una barriera sterica, che unita alla repulsione elettrostatica tra le cariche, protegge le nanoparticelle dall'aggregazione. [108]

A concentrazioni più basse di NaCl, e a elevate concentrazioni di BSA, l'assorbanza presenta valori meno intensi, tale comportamento potrebbero essere attribuito ad una variabilità presente tra le misure eseguite.

L'incremento della concentrazione di BSA porta ad una convergenza delle 3 curve nelle condizioni analizzate, con valori simili di assorbanza suggerendo il raggiungimento di una condizione prossima alla saturazione, in modo indipendente dalla concentrazione salina

utilizzata. Si può quindi concludere che pH e forza ionica influenzino la formazione della corona proteica attorno le nanoparticelle. [57] La forza ionica ha una maggior influenza a pH più vicini alla neutralità, andando a condizionare l'adsorbimento della BSA e la stabilità colloidale. A tutti i valori di pH testati, essendo superiori al pI della BSA, la sua deprotonazione genera una carica netta negativa che induce ad aumentare la propria repulsione intermolecolare, la presenza dell'NaCl modula in modo rilevante schermatura e aggregazione. [106] La stabilità, quindi, dipende dall'equilibrio tra forza ionica e copertura proteica. A valori di pH più alcalini, l'aumento della carica negativa della BSA contribuisce ad aumentare la stabilizzazione elettrostatica, influenzando la conformazione proteica e la distribuzione superficiale delle proteine riducendo le differenze iniziali dovute alla forza ionica, portando alla formazione di sistemi più uniformi. In tale sistema, il parametro limitante è rappresentato dalla capacità massima di adsorbimento della superficie determinando conseguentemente un effetto meno marcato dell'NaCl sul sistema. In tale saggio, la BSA agisce come agente protettivo ma la sua funzione dipende dal pH, dalla concentrazione salina e dalla conformazione proteica. [85, 89]

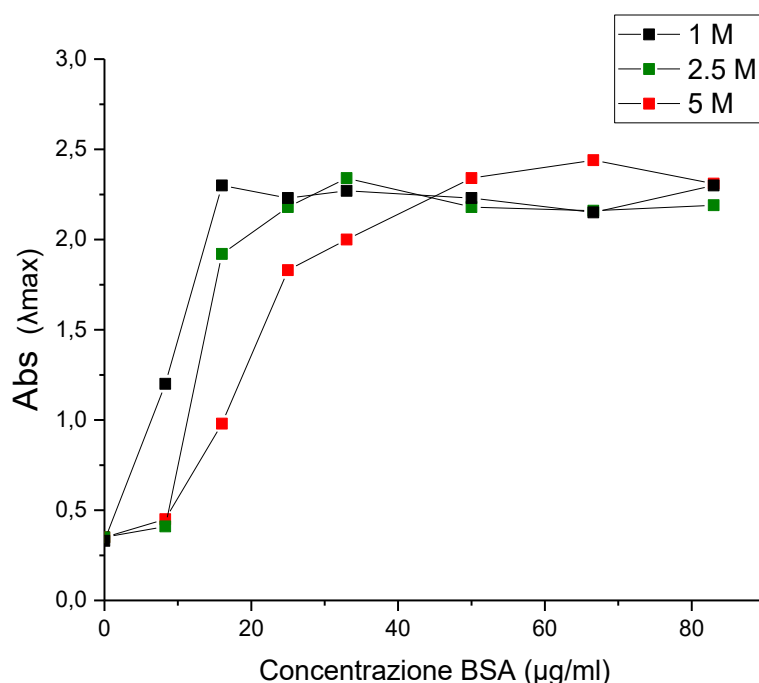


Figura 3.24: Profili di assorbanza  $\lambda_{\max}$  in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento a pH=11.0.

La medesima prova è stata infine condotta anche sulla frazione sedimentata (pellet) della sintesi a pH maggiormente alcalino (n.6 pH=11.0). L'ottenimento di un pool di nanoparticelle più regolari come morfologia e di medesime dimensioni garantisce un andamento delle curve di assorbanza più coerente con le diverse concentrazioni di BSA (Fig. 3.25), seppur con un evidente salto alle più basse concentrazioni testate. Confrontando il pellet e il tal quale (TQ), nel primo caso si nota un aumento molto rapido dell'assorbanza tra 8 e 16 µg/ml. Nel TQ, invece, lo stesso aumento di segnale in termini di assorbanza si registra nel range tra 8 e 30 µg/ml. Ciò potrebbe suggerire che l'uniformità delle nanoparticelle nel pellet permetta di

ottenere una risposta più rapida alla BSA, perché la concentrazione effettiva di nanoparticelle è maggiore e vi è una quantità ridotta di residui di sintesi che possono competere con l'adsorbimento della proteina. A concentrazioni elevate di BSA entrambi i sistemi sembrano in ogni caso raggiungere la saturazione superficiale, evidenziata dal plateau dell'assorbanza.

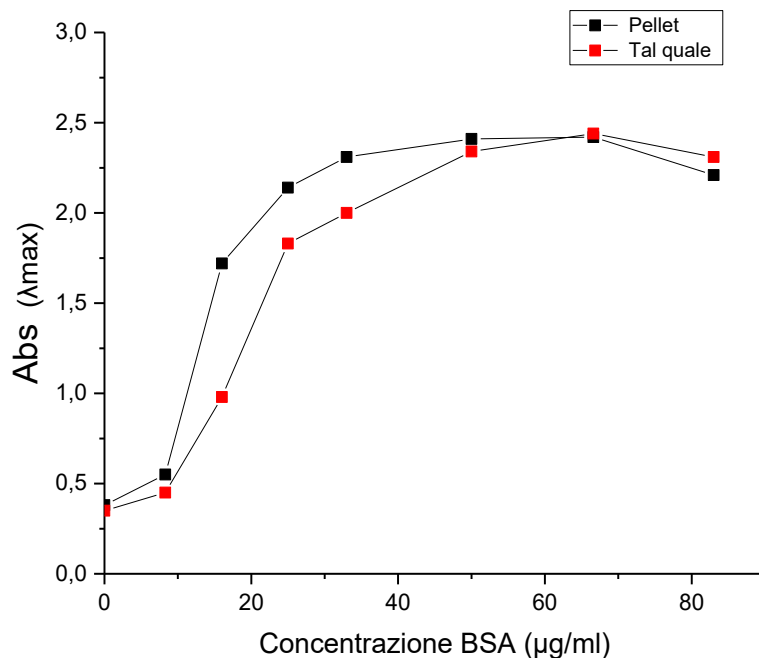


Figura 3.25: Profili di assorbanza  $\lambda_{\max}$  in funzione della concentrazione di BSA per nanoparticelle d'argento del colloide tal quale o dopo risospensione del pellet ottenuto da centrifugazione in presenza di NaCl (5 M).

Alla luce di questi risultati, i risultati ottenuti con pellet o TQ non sono troppo diversi e quindi si è deciso di utilizzare la soluzione colloidale tal quale nelle prove successive, per semplificare il più possibile i passaggi necessari per la realizzazione del saggio.

### 3.2.7 Valutazione del LOD e del LOQ

Per individuare le condizioni sperimentali migliori per ottenere una buona riproducibilità e sensibilità, i vari parametri del saggio sono stati ottimizzati. Il protocollo finale prevede l'impiego di nanoparticelle sintetizzate a 30 °C per 5 minuti a pH 11.5, incubate con BSA per 10 minuti, utilizzando un volume finale di reazione pari a 120 µl. Definite le condizioni ottimali, è stata valutata la sensibilità del metodo mediante la determinazione del limite di rilevabilità (LOD). In Figura 3.26a è riportata la curva di calibrazione ottenuta eseguendo la media di 3 prove sperimentali effettuate nelle medesime condizioni sperimentali. Il calcolo del LOD è stato effettuato considerando l'intervallo di concentrazione compreso tra 0 e 50 µg/ml, poiché a concentrazioni superiori la risposta del sistema non presenta più un andamento lineare. In particolare, la retta di calibrazione è stata costruita secondo procedura descritta nei Materiali e Metodi, tramite fit lineare (Fig.3.26b), come riconosciuto a livello internazionale. Il valore del LOD è stato successivamente calcolato considerando l'equazione della retta ottenuta dal fit

lineare, interpolando il segnale medio ottenuto dai bianchi (no BSA) a cui è stato precedentemente sommata 3.3 volte la deviazione standard degli stessi bianchi. Il valore ottenuto per il LOD è risultato pari a 0.97  $\mu\text{g/ml}$ . Analogamente, il limite di quantificazione (LOQ) è stato determinato considerando il segnale medio dei bianchi a cui è stata sommata dieci volte la deviazione standard dei bianchi stessi, ottenendo un valore pari a 2.93  $\mu\text{g/ml}$ .

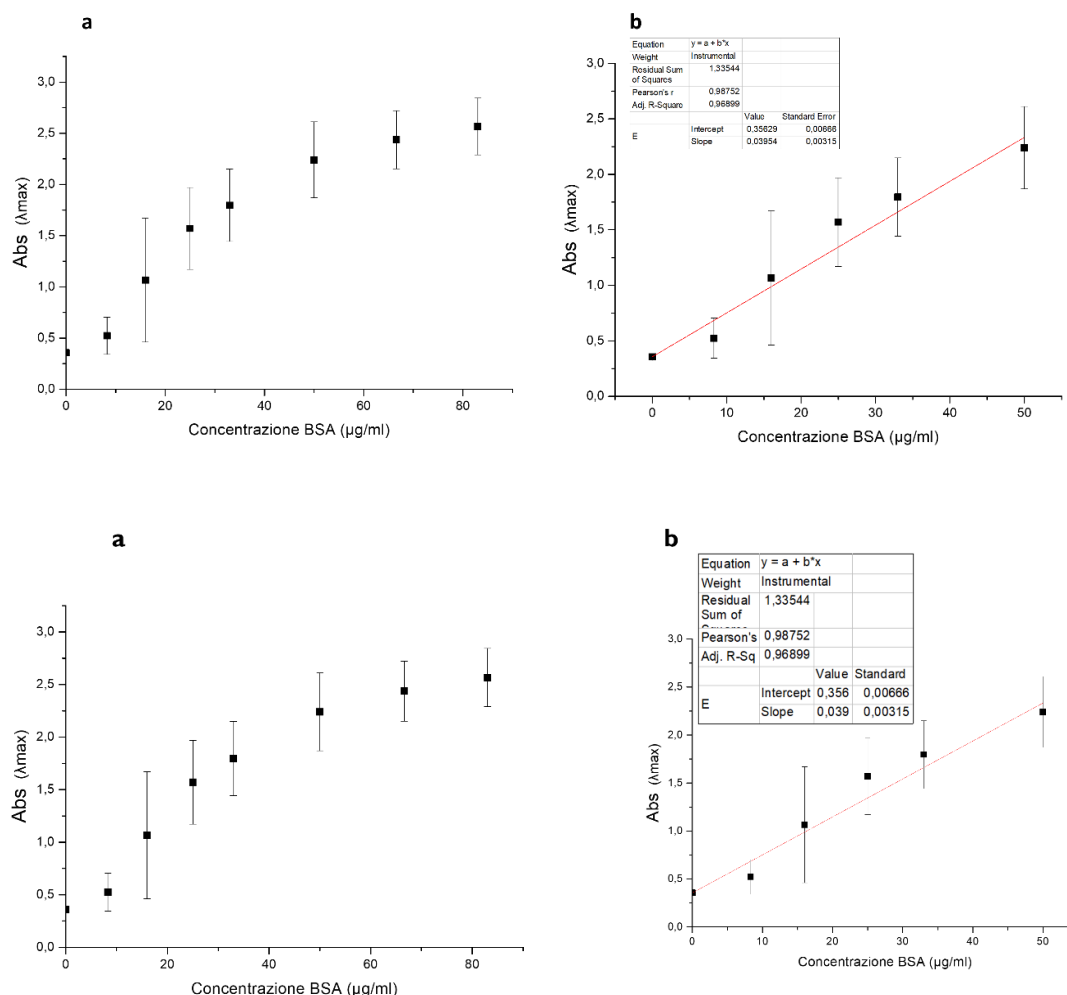


Figura 3.26: Curva di calibrazione del saggio colorimetrico ottenuta nelle condizioni sperimentali ottimali, nel range di concentrazione della BSA compreso tra 0 e 83  $\mu\text{g/ml}$  (a) e tra 0 e 50  $\mu\text{g/ml}$  (b). La linea rossa rappresenta il fit lineare utilizzato per la determinazione di LOD e LOQ.

### 3.3 Analisi Raman

Una volta ottimizzato il saggio colorimetrico per la determinazione delle proteine totali, è stata infine valutata la possibilità di sfruttare lo stesso principio in combinazione con una rivelazione SERS. A tale scopo, le nanoparticelle sono state incubate con MBA, una molecola sonda dotata di un gruppo tiolico che lega con grande affinità la superficie di argento, il cui segnale vibrazionale può essere utilizzato per la rivelazione SERS, e successivamente sottoposte al

saggio. Lo scopo di questi test è rappresentato dallo sviluppo di un saggio basato sulla spettroscopia SERS al fine di rilevare le proteine presenti nel sistema colloidale e verificare se tale metodo risulti più sensibile rispetto al solo saggio effettuato mediante colorimetria. Il saggio prevede di incubare le NP inizialmente con MBA, e successivamente con BSA (a concentrazioni crescenti). In seguito, al sistema viene aggiunto l'NaCl, la cui presenza, se le nanoparticelle non risultano ben funzionalizzate, induce aggregazione. Oltre a determinare una variazione delle risonanze plasmoniche di superficie, l'aggregazione delle nanoparticelle in presenza di sale porta alla formazione di hot spot SERS, in grado di generare una notevole amplificazione del segnale Raman dell'MBA. In presenza di maggiore aggregazione, ci si attende dunque una maggiore amplificazione dello spettro Raman della molecola sonda. Inoltre, l'analisi ha permesso di monitorare come avvenissero i fenomeni di interazione competitiva tra molecola organica e la proteina modello e come variasse il segnale SERS. Attraverso tale analisi, è infatti possibile verificare come le molecole si adsorbono e si riorganizzano sulle nanoparticelle d'argento e come la presenza dell'NaCl influisca sulle stesse. Tale analisi permette di capire inoltre se il comportamento della proteina modello è comparabile a quello misurato mediante lettore di piastra e/o spettrofotometro.

### 3.3.1 Analisi comparativa tra incubazione con BSA e incubazione con MBA e BSA

Prima di procedere con le misure SERS, il saggio colorimetrico è stato condotto incubando le NP in presenza di MBA e BSA a concentrazioni crescenti. Considerando il medesimo colloide a pH 11.5, la prova (Fig. 3.27) mostra differenze evidenti inerenti gli spettri. In particolare, l'assorbanza, nel caso dell'incubazione con solo BSA (Fig. 3.27a), raggiunge un valore massimo intorno a 2.5. Al contrario, il medesimo campione incubato con solo MBA (Fig. 3.27b) mostra che in assenza di sale (CTR-NP-MBA) il massimo valore raggiungibile è pari a 2. In presenza di sale, inoltre, il campione pre-incubato con MBA raggiunge un valore massimo di assorbanza pari a 1.55 alla concentrazione di BSA più alta, notevolmente inferiore rispetto al caso del colloide protetto con la sola BSA, mostrando come la presenza dell'MBA riduca probabilmente in parte l'adsorbimento della BSA sulla superficie delle NP a causa di una competizione tra le due molecole.

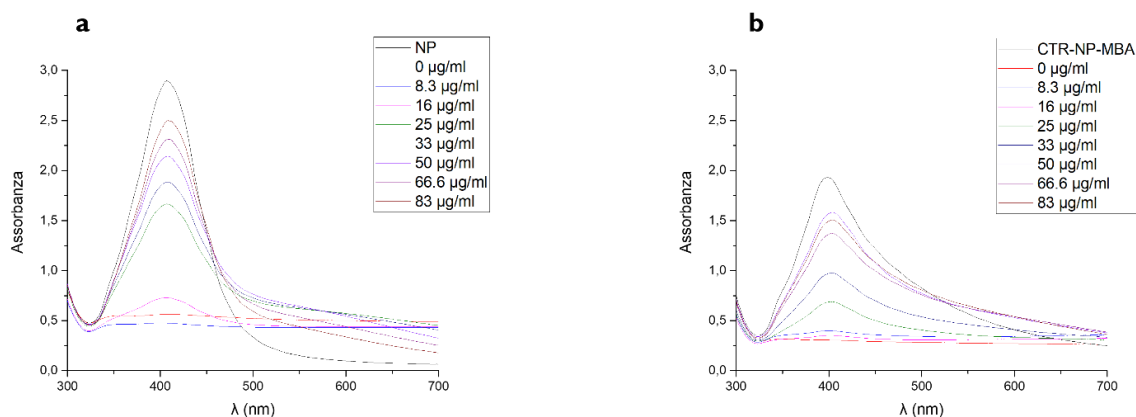


Figura 3.27: Confronto tra gli spettri del saggio colorimetrico ottenuto con nanoparticelle d'argento incubate con sola BSA (a) o con MBA e BSA (b). Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl (5 M) a differenti concentrazioni di BSA (0–83 µg/ml). Lo spettro denominato CRT-NP-MBA comprende NP incubate con MBA e acqua.

Sulla base dei risultati ottenuti dal saggio colorimetrico, i test sono stati condotti utilizzando un colloide ottenuto a pH pari 11.5, il quale ha mostrato prestazioni migliori in termini di sensibilità e risposta del sistema, mantenendo il tempo di incubazione con la BSA pari a 10 minuti. Tuttavia, viste le differenze evidenziate in presenza di MBA, si è reso necessario ottimizzare alcuni parametri, quali la concentrazione del sale e della molecola sonda.

Per le analisi Raman sono state inizialmente testate due lunghezze d'onda, pari a 532 nm e 785 nm. A seguito di prove preliminari è stata scelta una lunghezza d'onda pari a 785 nm, in quanto potenzialmente in grado di eccitare le risonanze plasmoniche delle nanoparticelle aggregate. La prova è stata inizialmente condotta utilizzando una concentrazione salina pari a 5 M. Dal grafico (Fig. 3.28), risulta possibile osservare gli spettri ottenuti mediante lettore di piastra. In particolare, il campione definito "CTR-NP-MBA", che corrisponde a nanoparticelle incubate solo in presenza di MBA, e il campione denominato "controllo" che include nanoparticelle con MBA, 10 µl di BSA e 10 µl di acqua (ma non viene indotta l'aggregazione con NaCl), presentano valori di assorbanza leggermente differenti. La presenza del controllo permette di ottenere un confronto visivo su come variano gli spettri, ottenendo così una stima sui valori di assorbanza massimi raggiunti con e in assenza di sale. Inoltre, il controllo presenta un leggero shift verso lunghezze d'onda maggiori. Si conferma come la presenza dell'MBA tenda a indurre un decremento dell'intensità dei picchi dopo l'aggiunta del sale. Alle concentrazioni più elevate di BSA, infatti, il massimo valore raggiungibile risulta circa pari a 1.4, dimostrando come il colloide risulti sensibile alla presenza del raman reporter. Tale comportamento potrebbe essere attribuito ad un minor adsorbimento della BSA, che in presenza del reporter Raman, non riesce a distribuirsi in maniera efficiente sulla superficie metallica. A differenza del sistema composto solo da BSA ed NaCl 5M come già precedentemente visto (Fig. 3.27), in questa situazione l'introduzione dell'MBA sembra modificare il comportamento delle NP, le quali risultano meno stabili, per cui in presenza di elevata forza ionica e di BSA, le NP risultano più sensibili all'aggregazione.

È possibile osservare come ad ogni concentrazione di albumina di siero bovino corrisponde un preciso valore di assorbanza ottenuto misurando il campione mediante lettore di piastre. Il

segnale di assorbanza mostra, in ogni caso, un andamento progressivo e pressoché lineare, anche in presenza della funzionalizzazione con MBA. (Fig. 3.29a)

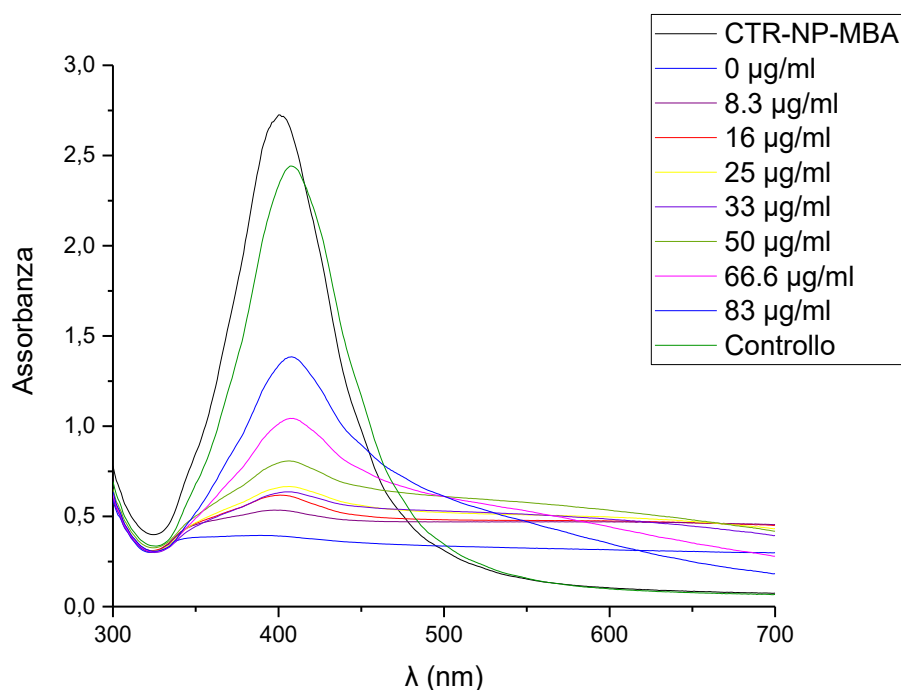


Figura 3.28: Spettri del saggio colorimetrico con BSA e MBA  $10^{-5}$  M, ottenuti con lettore di piastra. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl (5 M) a differenti concentrazioni di BSA (0–83 µg/ml). Lo spettro denominato controllo comprende NP incubate con MBA, BSA e acqua.

La Figura 3.29b mostra invece gli spettri SERS, mediati sulle tre acquisizioni effettuate, ottenuti sul colloide incubato con diverse concentrazioni di BSA (da 0 a 83 µg/ml). In assenza di BSA, si distinguono chiaramente i tipici picchi vibrazionali dell'MBA a circa  $1078\text{ cm}^{-1}$  e  $1585\text{ cm}^{-1}$ , riconducibili rispettivamente al breathing dell'anello benzenico e alle vibrazioni di stretching C-C dell'anello aromatico. [76,108] La presenza di un segnale così intenso è strettamente legata alla presenza della concentrazione di sale utilizzata che induce l'aggregazione delle NP non protette dalla BSA. Viene dunque confermato che a valori di concentrazione proteica nulla o bassa, la presenza dell'NaCl induce aggregazione delle NP e porta alla formazione di hot-spot che incrementano il segnale derivante dall'MBA. Le molecole di MBA confinate in questi punti risentono di un'amplificazione del campo elettromagnetico locale che incrementa di ordini di grandezza l'efficienza dello scattering Raman e quindi l'intensità del segnale vibrazionale rivelato. [76] Inoltre, il pH fortemente basico (11.5) promuove la deprotonazione dei gruppi tiolici (-SH) dell'MBA, favorendo un ancoraggio chimico stabile e uniforme sulla superficie dell'argento tramite legame coordinativo argento-zolfo. [109]

Introducendo concentrazioni crescenti di BSA, è possibile constatare come si evidenzia una riduzione dell'intensità del segnale della molecola sonda. Infatti, nonostante il fattore di scala applicato (/4), l'intensità delle bande dell'MBA subisce una drastica riduzione, fino a

scompare quasi completamente nei campioni a più alta concentrazione proteica (66.6  $\mu\text{g/ml}$  e 83.0  $\mu\text{g/ml}$ ). Quando la concentrazione di BSA aumenta, essa previene l'aggregazione indotta da sale e quindi la formazione di hot-spot. Inoltre, la proteina agisce progressivamente sull'MBA scalzandolo dai siti di legame o incapsulandolo (effetto *shrouding*), dimostrando come molto probabilmente la BSA, rivestendo la superficie delle nanoparticelle modula la formazione di hot-spot utili e attenui il campo elettromagnetico rilevabile mediante il reporter, conseguentemente bloccando quindi l'effetto amplificante guidato dal sale. [110]

Infine, lo spettro finale, acquisito in assenza di NaCl, non mostra i picchi caratteristici della molecola, evidenziando come sia proprio la sua presenza a indurre gli hot-spot necessari per un'amplificazione del segnale Raman dell'MBA. Nonostante globalmente si osservi una diminuzione dell'intensità dei picchi SERS dell'MBA all'aumentare della concentrazione di proteina aggiunta, in molti casi l'andamento risulta altalenante, impedendo l'utilizzo del saggio in queste condizioni per una determinazione quantitativa della BSA.

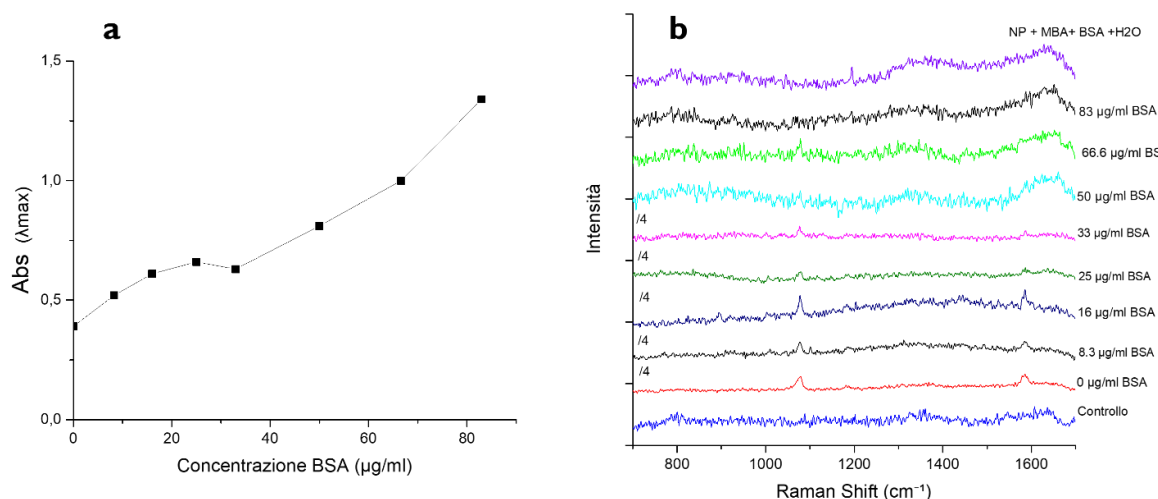


Figura 3.29: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\text{max}}$  (408 nm) in funzione della concentrazione di BSA del colloide a  $\text{pH}=11.5$  e  $\text{NaCl}$  5 M, in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.

Per verificare l'evoluzione del sistema all'interfaccia solido-liquido, la misura è stata anche condotta modificando la profondità di campionamento: mediante l'utilizzo di un obiettivo a basso ingrandimento (10x), focalizzando il fascio laser sul fondo della goccia depositata sul substrato. Gli aggregati formati in presenza di elevata forza ionica tendono a sedimentare durante la misura, quindi focalizzare il laser sul fondo ha permesso di individuare la massima densità numerica di hot spot sedimentati e di rendere l'analisi maggiormente riproducibile. Osservando la serie di spettri riportata in Figura 3.30, si nota come a basse concentrazioni di BSA la presenza dei picchi caratteristici dell'MBA sia evidente, grazie alla presenza massiccia di cluster di nanoparticelle. Tuttavia, tale intensità crolla repentinamente già a 25  $\mu\text{g/ml}$  per poi scomparire del tutto a 66.6  $\mu\text{g/ml}$ . Tale andamento conferma che il guscio proteico che avvolge le particelle sedimentate è estremamente stabile, limitando la rilevazione delle molecole sonda.

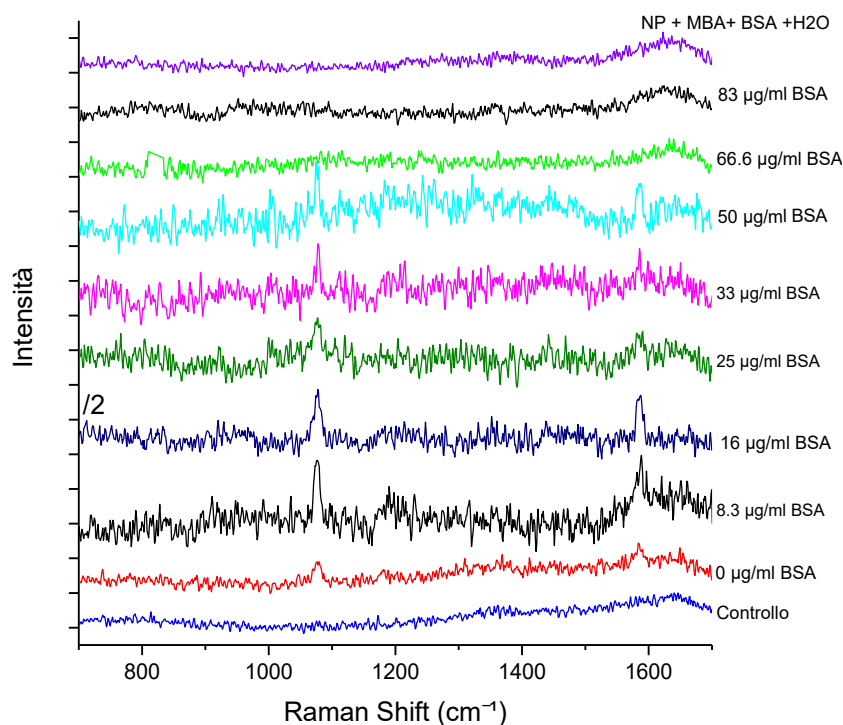


Figura 3.30: Spettri SERS del colloide incubato con concentrazioni crescenti di BSA e NaCl 5 M in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl 5 M a differenti concentrazioni di BSA (0–83 µg/ml).

La medesima prova è stata successivamente condotta sullo stesso colloide, ma utilizzando una concentrazione salina pari a 1 M, al fine di comprendere come la forza ionica potesse influenzare l'evoluzione del sistema colloidale.

Dall'analisi spettroscopica (Fig. 3.31a) effettuata monitorando il massimo plasmonico ad una lunghezza d'onda fissa pari a 405 nm, è possibile constatare come una minor forza ionica moderi il grado di aggregazione delle nanoparticelle d'argento. Tale evidenza è supportata anche dai valori di assorbanza raggiunti alle diverse concentrazioni, i quali risultano maggiori rispetto al caso precedente a 5 M (Fig.3.29, 3.30). La presenza di tale concentrazione salina preserva una maggiore densità numerica di particelle stabili.

L'andamento degli spettri SERS (Fig. 3.31b) riflette questo differente comportamento del sistema colloidale. A concentrazioni nulle o minime di proteina, i picchi dell'MBA si presentano intensi, grazie agli hot-spot generati dall'aggregazione. Tale intensità risulta apprezzabile sino a 25 µg/ml e con tracce molto meno visibili fino a 33 µg/ml. A tale concentrazione salina, il rivestimento proteico attorno alle nanoparticelle risulta meno marcato per cui la presenza di una forza ionica inferiore induce minor aggregazione e conseguentemente minor formazione di hot-spot, tuttavia permette ugualmente la rilevazione del segnale della sonda Raman, la cui intensità, inoltre, diminuisce gradualmente e in modo pressoché monotono con l'aumentare della concentrazione di BSA.

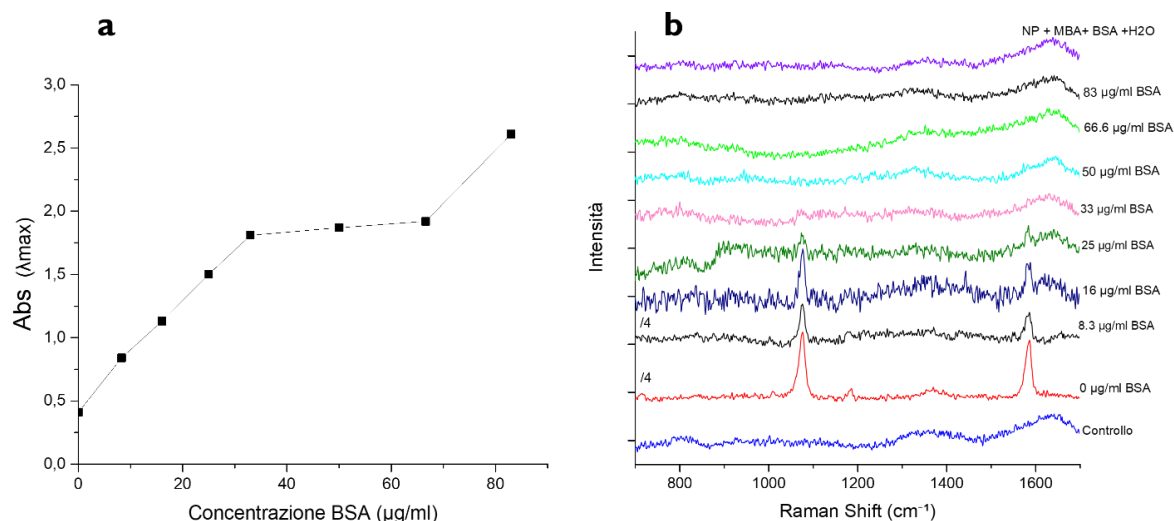


Figura 3.31: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{max}$  (408 nm) in funzione della concentrazione di BSA del colloide sintetizzato a  $\text{pH}=11.5$ , in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) e NaCl 1 M (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.

Anche per questo test condotto con NaCl 1 M la misura è stata eseguita sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. I profili ottenuti (Fig. 3.32) mostrano un andamento analogo a quello riscontrato nelle misure eseguite in precedenza con l'ingrandimento 20x.

Si osserva, infatti, una graduale e progressiva riduzione del segnale all'aumentare della concentrazione di BSA, con picchi caratteristici ancora visibili a concentrazioni uguali a 33  $\mu\text{g/ml}$ . L'intensità dei picchi risulta inferiore rispetto all'uso di NaCl 5 M, perché probabilmente con 1 M la formazione di aggregati risulta meno favorita. Tuttavia, le analisi eseguite con le due modalità di campionamento confermano un trend nettamente più lineare del segnale dell'MBA in funzione della concentrazione di BSA.

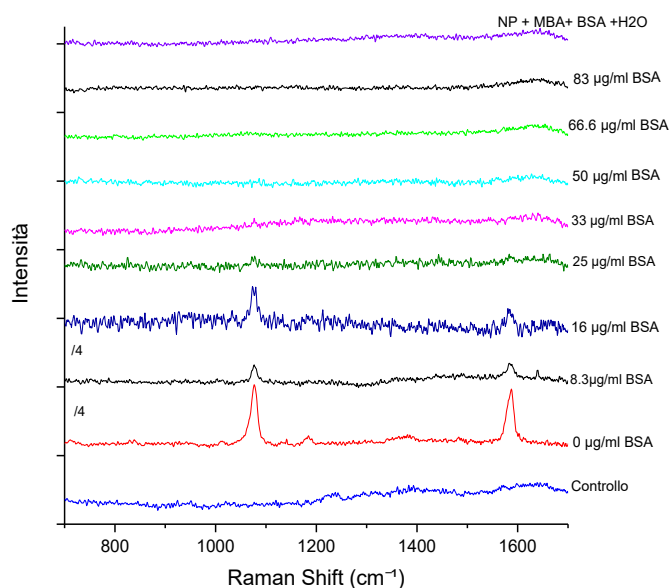


Figura 3.32: Spettri SERS del colloide incubato con concentrazioni crescenti di BSA e NaCl 1 M in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl 5 M a differenti concentrazioni di BSA (0–83  $\mu\text{g/ml}$ ).

Ulteriori prove sono state condotte variando il range di concentrazione di MBA. Tale valore è stato aumentato passando da un valore pari a  $10^{-5}$  M sino a  $10^{-4}$  M in modo da incrementare l'intensità del segnale SERS iniziale e ottenere un miglioramento della sensibilità del saggio. La concentrazione di MBA influisce tuttavia anche sulla saturazione della superficie delle nanoparticelle e sulla successiva interazione con la BSA.

Il grafico di assorbanza (Fig.3.33a), registrato in corrispondenza di  $\lambda_{\text{max}}$  alla lunghezza d'onda di 409 nm mostra un andamento non lineare con una rapida crescita dell'assorbanza seguito da una sua netta e improvvisa flessione. Oltre la soglia critica dei 50  $\mu\text{g/ml}$ , l'assorbanza riprende a salire stabilmente.

Dagli spettri SERS (Fig. 3.33b), si evidenzia come nello spettro a concentrazione nulla di proteina i picchi caratteristici dell'MBA risultano estremamente intensi. Sebbene l'andamento del segnale dell'MBA negli spettri non mostri anche in questo caso linearità, si osserva la persistenza di una debole traccia dei picchi dell'MBA a 50  $\mu\text{g/ml}$ , in esatta corrispondenza con la fase di instabilità registrata nel grafico UV-Vis.

Probabilmente, l'introduzione di una concentrazione maggiore di molecola reporter satura l'interfaccia metallica delle nanoparticelle. Quindi, sebbene una maggiore concentrazione iniziale di MBA generi picchi con elevata intensità, il segnale scompare molto rapidamente già a basse concentrazioni di BSA, probabilmente a causa di un'aggiuntiva protezione nei confronti dell'aggregazione derivante dalla presenza dello strato di MBA adsorbito sulla superficie delle AgNP.

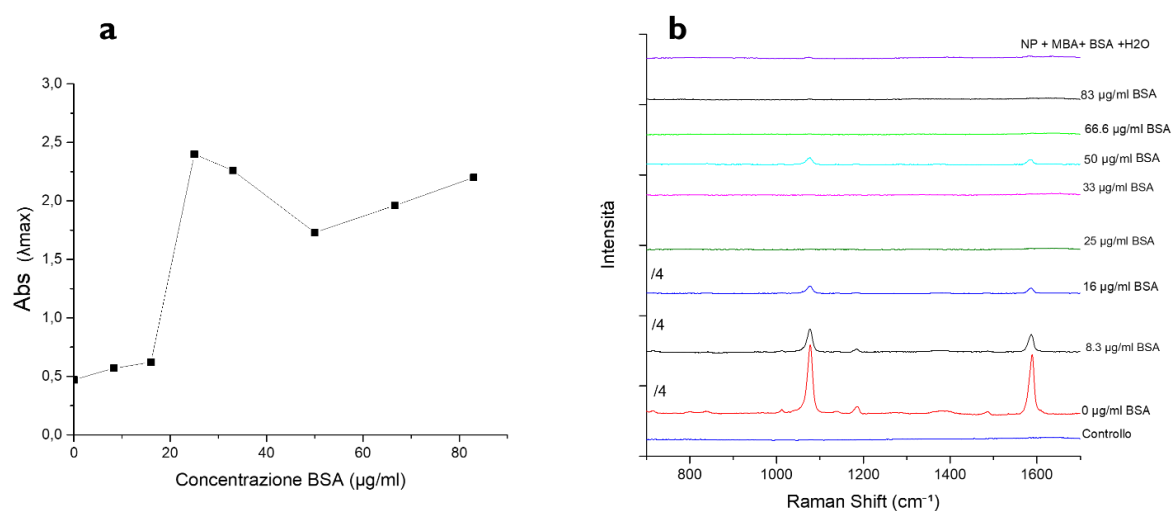


Figura 3.33: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\text{max}}$  (408 nm) in funzione della concentrazione di BSA, del colloide sintetizzato a  $\text{pH}=11.5$ , in presenza di MBA ( $10^{-4}$  M) e NaCl 1 M, (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.

La prova condotta al fondo della goccia (Fig. 3.34) restituisce spettri SERS molto nitidi. A concentrazione nulla o minima l'intensità delle bande risulta marcata a conferma dell'accumulo di aggregati d'argento sul fondo del pozzetto. All'aumentare della componente proteica il sistema sembra comportarsi diversamente rispetto ai casi precedenti e in corrispondenza di una concentrazione proteica pari a 25  $\mu\text{g/ml}$  si verifica uno spegnimento del segnale Raman, con i profili successivi che si appiattiscono stabilmente.

L'azione combinata della forza ionica e dell'elevata concentrazione di MBA sembra accelerare la sedimentazione delle NP sul fondo della goccia, bloccando l'effetto amplificante sul reporter a concentrazioni proteiche nettamente inferiori.

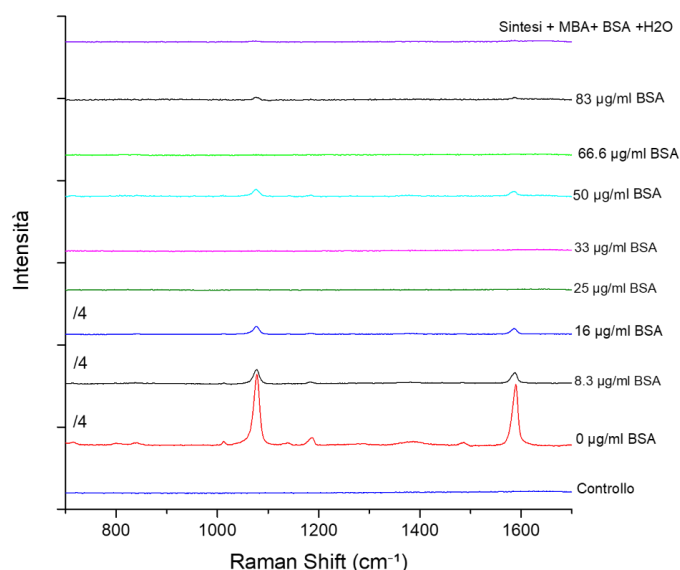


Figura 3.34: Spettri SERS del colloide incubato con concentrazioni crescenti di BSA e NaCl 5 M in presenza di MBA ( $10^{-4}$  M) registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl (5 M) a differenti concentrazioni di BSA (0–83 µg/ml). Lo spettro denominato controllo comprende NP incubate con MBA.

Lo studio comparativo condotto sul colloide a pH 11.5, ha permesso di ottenere una comprensione su come il sistema evolva. L'impiego sinergico delle spettroscopie UV-Vis e SERS ha evidenziato come l'evoluzione del sistema sia strettamente dipendente da tre variabili sperimentali chiave: la forza ionica del mezzo, la densità iniziale del reporter molecolare e la concentrazione proteica utilizzata.

Per comprendere quanto si riesca ad essere sensibili alla rilevazione della molecola utilizzata durante il saggio e come la sua rilevazione venga influenzata dalla proteina modello sono state condotte ulteriori prove per indagare il range di concentrazione in cui il segnale generato dalla BSA non perturbi in modo significativo l'intensità del segnale della sonda.

### 3.3.2 Ottimizzazione del saggio su range proteico inferiore e determinazione di LOD e LOQ

I test condotti mostrano che, a seconda delle condizioni utilizzate, il saggio SERS è in grado di rivelare concentrazioni di BSA non superiori a 16–33 µg/ml. Allo stesso tempo, i dati evidenziano la possibilità di estendere invece l'intervallo di concentrazioni rivelabili a valori inferiori rispetto a quelli precedentemente testati. Nuove prove sono quindi state condotte utilizzando un range di BSA compreso tra 0 e 20.88 µg/ml, mantenendo fissa la concentrazione di MBA a un valore pari a ( $10^{-5}$  M) e utilizzando una forza ionica pari a 1 M NaCl. Tale modifica

ha permesso di studiare la rivelazione della BSA in un intervallo di concentrazioni inferiore e di verificare come avvenga l'interazione.

Dall'analisi al lettore di piastra (Fig. 3.35a) effettuata considerando il valore di assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\max}$  (405 nm), si osserva come la presenza della minor forza ionica moduli l'aggregazione. I valori di assorbanza risultano progressivamente crescenti e il trend del segnale segue un andamento regolare. Tale andamento risulta simile ai casi precedenti in cui la concentrazione di BSA era maggiore (Fig.3.29), dimostrando come la presenza di concentrazioni crescenti di BSA vada a schermare la superficie delle nanoparticelle con conseguentemente riduzione dell'aggregazione.

L'andamento degli spettri SERS (Fig. 3.35b) riflette questa transizione in modo complementare, confermando l'elevata sensibilità del saggio nel range analizzato. In assenza di proteina (0  $\mu\text{g/ml}$ ) e alle minime concentrazioni di BSA, i picchi vibrazionali caratteristici dell'MBA risultano, come osservato in precedenza, nitidi e intensi, generati dalla presenza di hot-spot plasmonici indotti dal sale. Come evidenziato dal fattore di scala (/4), l'intensità del segnale si mantiene elevata fino a 6.25  $\mu\text{g/ml}$ .

Superata la soglia pari a 8.33  $\mu\text{g/ml}$ , corrispondente al cambio di pendenza registrato nel grafico UV-Vis, si verifica una repentina attenuazione dell'intensità Raman. A differenza dei casi precedenti, (Fig.3.29) in cui la scomparsa del segnale si verificava totalmente a partire da una concentrazione proteica pari a 25  $\mu\text{g/ml}$ , in questa circostanza le bande dell'MBA si riducono progressivamente fino a scomparire quasi del tutto superando la concentrazione di 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , dove i profili si appiattiscono sulla linea di base. Tale comportamento potrebbe essere giustificato da eventuali errori di campionamento.

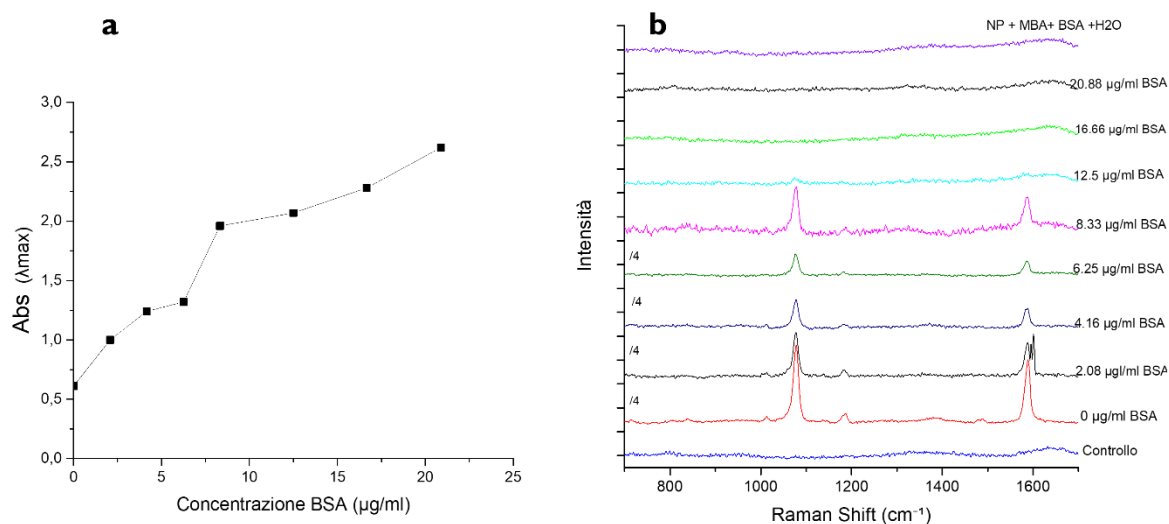


Figura 3.35: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\max}$  (408 nm) in funzione della concentrazione di BSA in un range compreso tra 0 e 20.88  $\mu\text{g/ml}$ , del colloide sintetizzato a  $\text{pH}=11.5$ , in presenza di MBA ( $10^{-5} \text{ M}$ ) e NaCl 1 M, (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.

Anche le misure condotte sul fondo della goccia (Fig. 3.36) mediante obiettivo a basso ingrandimento (10x), mostrano segnali SERS apprezzabili e un'intensità elevata. Il trend, caratterizzato da una graduale decrescita dell'intensità del segnale in funzione della concentrazione del target proteico, risulta coerente al caso precedente (Fig.3.34), tuttavia, emerge una differenza significativa riguardante la concentrazione proteica di BSA pari a 12.5

$\mu\text{g/ml}$ . A tale specifica concentrazione, a differenza della misura superficiale in cui il segnale non appariva più, in questo caso risulta ancora possibile rivelare la presenza dei picchi caratteristici. La presenza del segnale suggerisce come i cluster colloidali sedimentati sul fondo siano responsabili di una maggiore amplificazione. Conseguentemente, la riduzione del segnale Raman risulta ritardata e con un'attenuazione definitiva soltanto a concentrazioni proteiche superiori.

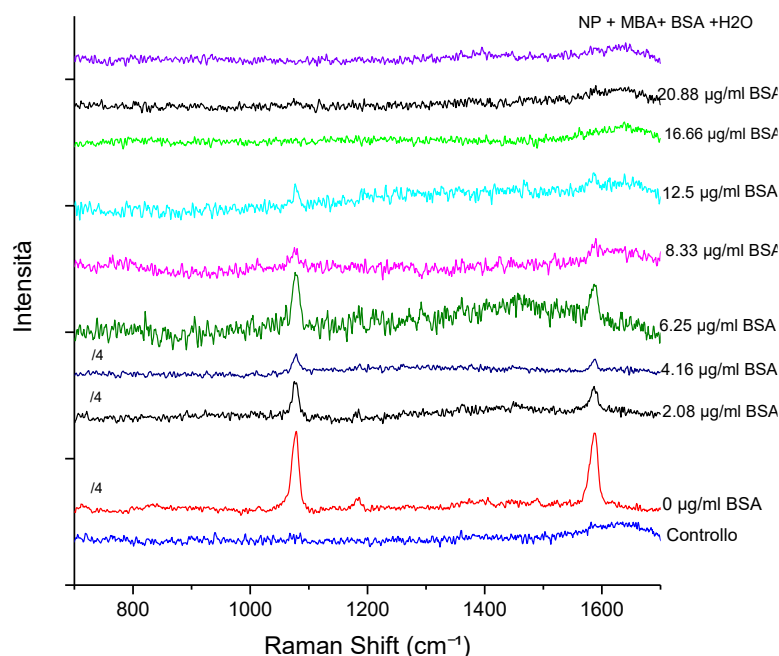


Figura 3.36: Spettri SERS del colloide incubato con MBA  $10^{-5}$  M, a concentrazioni crescenti di BSA in un range compreso tra 0 e  $20.88 \mu\text{g/ml}$  e NaCl 1 M, registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl.

Per esplorare un range di concentrazione ancora più basso e ottimizzare le prestazioni analitiche del saggio, la medesima prova è stata infine condotta considerando un range proteico compreso tra 0 e  $8.33 \mu\text{g/ml}$ . Questa ulteriore prova è stata introdotta per studiare il comportamento del colloide a concentrazioni proteiche molto basse, permettendo di verificare come la forza ionica e l'ingombro sterico della BSA permetta di preservare l'integrità degli hot-spot e massimizzare l'efficienza del reporter molecolare.

L'analisi spettrofotometrica (Fig. 3.37) rivela un profilo di assorbanza differente al caso precedente (Fig. 3.34). Nella prima regione del grafico tra 0 e circa  $2 \mu\text{g/ml}$  di BSA, il segnale a 405 nm si mantiene pressoché costante e stabile. Superata la soglia dei  $2 \mu\text{g/ml}$ , i valori di assorbanza aumentano con un'improvvisa e marcata impennata in corrispondenza dell'ultimo punto sperimentale a  $8.3 \mu\text{g/ml}$ . Tale incremento potrebbe essere legato a una riorganizzazione delle macromolecole proteiche attorno ai cluster presenti nel colloide.

I corrispondenti spettri SERS (Fig. 3.37b) confermano l'efficacia di questa ottimizzazione di range, mostrando una intensa persistenza del segnale del reporter. Lo spettro a concentrazione nulla (BSA  $0 \mu\text{g/ml}$ ) evidenzia le bande intense dell'MBA, normalizzate tramite il fattore di scala ( $1/4$ ). All'aumentare della BSA, a differenza di quanto osservato nel range compreso tra 0 e  $20.88 \mu\text{g/ml}$ , il segnale Raman non subisce un crollo repentino. Al contrario, l'intensità delle bande a  $1078 \text{ cm}^{-1}$  e  $1585 \text{ cm}^{-1}$  si mantiene robusta e strutturata lungo quasi tutto l'intervallo.

Solo a partire da 5  $\mu\text{g/ml}$  e 6.66  $\mu\text{g/ml}$  si nota un inizio di attenuazione, ma i picchi risultano ancora definiti, netti e identificabili in tutti i range analizzati.

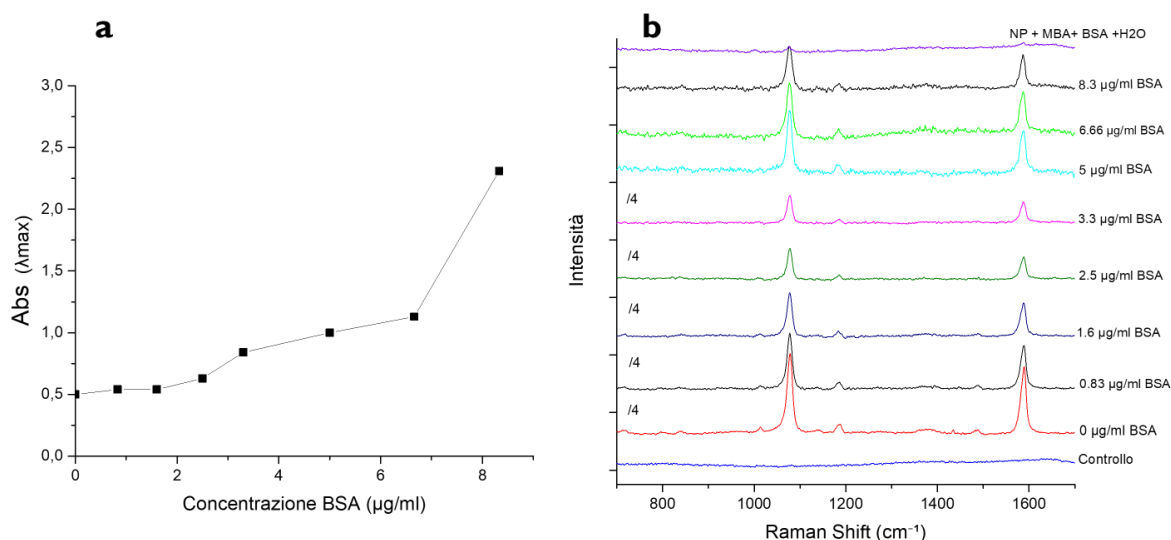


Figura 3.37: (a) Grafico dell'assorbanza in corrispondenza di  $\lambda_{\text{max}}$  (405 nm) in funzione della concentrazione di BSA in un range compreso tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$ , del colloide sintetizzato a  $\text{pH}=11.5$ , in presenza di MBA ( $10^{-5}$  M) e NaCl 1 M, (b) spettri SERS del colloide ottenuti nelle stesse condizioni.

Infine, anche per tale prova, è stata eseguita la misura con obiettivo 10x. Gli spettri ottenuti (Fig. 3.38), mostrano come anche sul fondo della goccia l'intensità dei picchi caratteristici dell'MBA sia evidente e con un'attenuazione lineare, confermando l'efficace sedimentazione e l'accumulo dei cluster colloidali sul fondo della goccia.

I segnali mostrano un'ottima risoluzione lungo l'intero range analizzato, rimanendo chiaramente identificabili e strutturati fino al punto massimo di 8.3  $\mu\text{g/ml}$  di BSA.

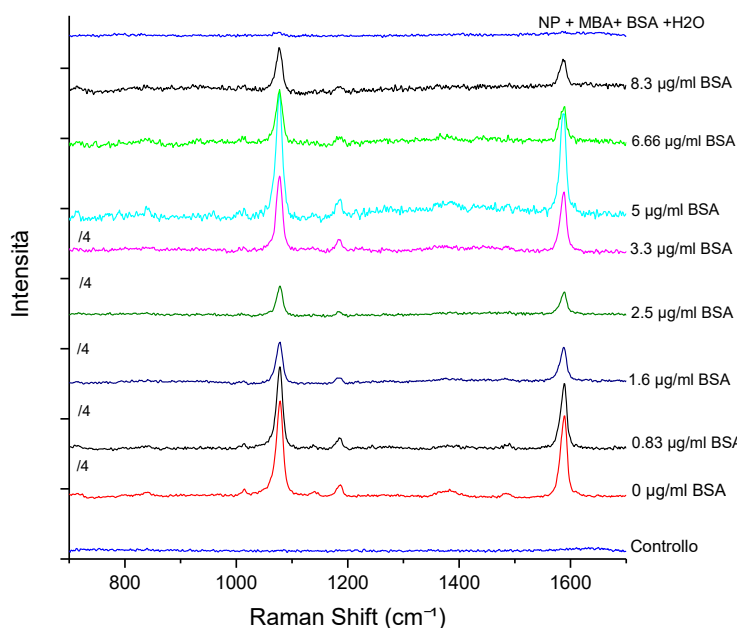


Figura 3.38: Spettri SERS del colloide incubato con MBA  $10^{-5}$  M, a concentrazioni crescenti di BSA in un range compreso tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$  e NaCl 1 M, registrati sul fondo della goccia mediante obiettivo 10x. Il grafico confronta lo spettro delle nanoparticelle d'argento tal quali (Controllo con MBA e senza BSA) con gli spettri ottenuti dopo l'aggiunta NaCl.

Al fine di effettuare un confronto grafico e analitico diretto tra i risultati ottenuti dai due differenti stock di proteina (rispettivamente tra 0 e 20.88  $\mu\text{g/ml}$  e tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$ ), si è resa necessaria un'operazione di normalizzazione dei dati spettrali. Tale operazione è stata eseguita poiché le misure effettuate mostrano un'intensità assoluta di partenza leggermente differente. Da tali prove è possibile dedurre come la progressiva diluizione del target proteico permette di preservare l'integrità e l'efficienza degli hot-spot plasmonici, garantendo un'intensità del segnale elevata sino a concentrazioni pari a 8.33  $\mu\text{g/ml}$ . Per entrambi i sistemi l'area decresce in modo pressoché lineare. Nel caso di una concentrazione proteica compresa tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 3.39 a), la decrescita è lineare sino 3.3  $\mu\text{g/ml}$ . Parallelamente, l'analisi dell'area applicata al sistema con un range proteico compreso tra 0 e 20.88  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 3.39 b), i cui valori di area e deviazione standard sono stati normalizzati, moltiplicandoli per il fattore di normalizzazione, permette di visualizzare la cinetica di spegnimento della risposta SERS in un range più ampio. La curva mostra una decrescita dell'area già nelle primissime fasi, confermando una pendenza molto più severa, che si esaurisce definitivamente attorno 12.5  $\mu\text{g/ml}$  di BSA.

Una volta ottimizzate le condizioni sperimentali del saggio Raman, è stata valutata la sensibilità analitica del metodo mediante la determinazione del LOD. A differenza del saggio colorimetrico, la risposta sperimentale non ha mostrato un andamento lineare nell'intero intervallo di concentrazione analizzato, pertanto, i dati sono stati interpolati mediante un fit non lineare, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Successivamente, il LOD è stato calcolato moltiplicando per 3.3 volte il valore della deviazione standard e per  $t_1$  (costante del sistema). Infine, tale valore è stato diviso per  $A_1$  (ampiezza della retta). Sulla base di tali calcoli è stato calcolato anche il LOQ, calcolato seguendo i medesimi passaggi ma moltiplicando la deviazione standard per 10. I risultati del fit non lineare sono riportati in Figura 3.38a e 38b per gli intervalli di concentrazione compresi tra 0–8.3  $\mu\text{g/ml}$  e 0–12  $\mu\text{g/ml}$ , rispettivamente.

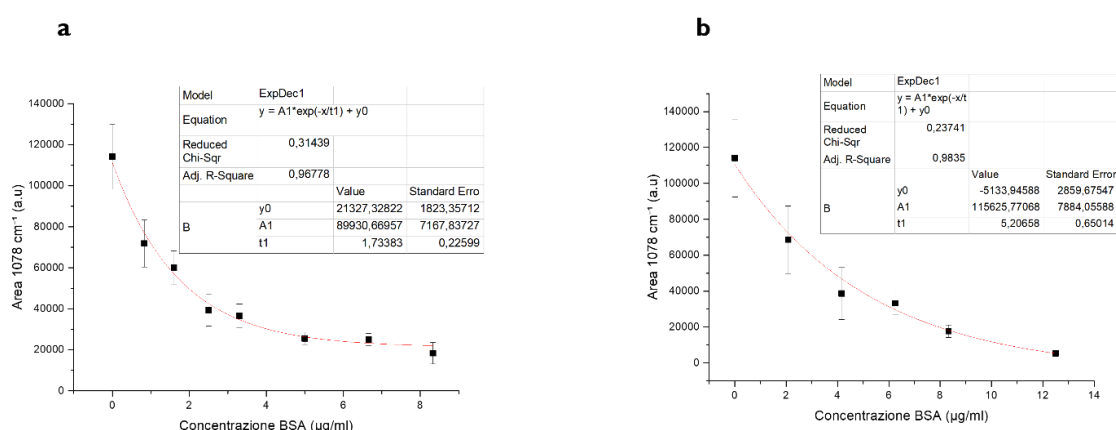


Figura 3.39: Curve di calibrazione e fit non lineare dell'area sottesa al picco a  $1078 \text{ cm}^{-1}$  per le serie con range compreso tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$  (a) e 0 e 20.88  $\mu\text{g/ml}$  (b).

Il confronto tra i due approcci evidenzia come il saggio Raman presenti una sensibilità superiore, mostrando un LOD pari a 0.19  $\mu\text{g/ml}$  e un LOQ pari a 0.57  $\mu\text{g/ml}$  per il saggio

condotto considerando il range compreso tra 0 e 8.33  $\mu\text{g/ml}$ , ed un LOD pari a 0.77  $\mu\text{g/ml}$  e un LOQ pari a 2.35  $\mu\text{g/ml}$ , per il saggio condotto considerando un range proteico compreso tra 0 e 20.88 $\mu\text{g/ml}$ . Dall'analisi dei dati emerge che, considerando entrambi gli intervalli di concentrazione di BSA studiati (rispettivamente 0-8.33  $\mu\text{g/ml}$  per la prima prova e 0-20.88  $\mu\text{g/ml}$  per la seconda), i valori di LOD e LOQ ottenuti mediante spettroscopia Raman risultano inferiori rispetto a quelli calcolati con il metodo colorimetrico. Tali dati indicano quindi una maggiore sensibilità nel rilevare basse concentrazioni di proteina.

Mediante tali calcoli è possibile affermare come il saggio testato, abbia una buona sensibilità nel range considerato risultando riproducibile per le concentrazioni analizzate. Rispetto a un saggio commerciale basata su BCA, in cui si ha una perdita di linearità al di sopra di un range compreso tra 0.5 e 20  $\mu\text{g/ml}$  e per cui l'attendibilità è spesso limitata a concentrazioni superiori, il saggio implementato in questo lavoro di tesi tende a superare tali criticità, garantendo una rilevazione accurata anche a concentrazioni proteiche molto basse. [111]

## Capitolo 4

### Conclusioni e sviluppi futuri

Nel seguente lavoro di tesi l'interesse è stato focalizzato sulla sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle d'argento colloidali e sulla realizzazione di un saggio colorimetrico per la determinazione delle proteine totali. Le analisi svolte durante l'intero lavoro hanno permesso di approfondire il ruolo di diversi parametri chiave nella sintesi delle nanoparticelle, rivelandone l'influenza sulle proprietà finali dei sistemi colloidali.

Inizialmente, lo studio è stato focalizzato sul controllo delle condizioni di sintesi al fine di ottenere sistemi stabili e riproducibili. La formazione di tali colloidali è avvenuta in ambiente acquoso, mediante metodo chimico, utilizzando acido ascorbico e trisodio citrato, che rappresentano rispettivamente l'agente riducente e l'agente stabilizzante, reagenti fondamentali nello sviluppo di colloidali stabili. Per l'ottenimento delle nanoparticelle ottimali per la successiva applicazione biochimica, i parametri di maggiore interesse sono stati il pH, la temperatura e il tempo di reazione che esercitano un'influenza fondamentale sulla dimensione e sulla distribuzione dimensionale dei colloidali. Nel dettaglio, mediante un controllo sul pH è stato possibile guidare la formazione delle nanoparticelle verso sistemi colloidali stabili con forme sferiche e con dimensioni fortemente dipendenti dal pH. Mediante un controllo sulla temperatura e sul tempo di reazione è stato possibile modulare la velocità di riduzione, evitando fenomeni di crescita incontrollata e/o precipitazione.

Le caratterizzazioni mediante spettroscopia UV-Vis e lettore di piastra effettuate su tutti i colloidali hanno fornito informazioni sulle variazioni della banda plasmonica, dalle quali è stato possibile ottenere in modo indiretto una prima indicazione sulle dimensioni e sullo stato di aggregazione delle nanoparticelle. Ulteriori caratterizzazioni effettuate hanno permesso di ottenere informazioni sui colloidali, sulla morfologia e sul loro comportamento. In particolare, a partire dai dati ottenuti mediante FESEM, è stato possibile ricavare il diametro medio delle nanoparticelle, osservare la distribuzione dimensionale e la rispettiva concentrazione. Conseguentemente è stato sviluppato uno script Matlab che mediante un'elaborazione automatizzata delle immagini e la realizzazione di mappe a contrasto colori ha consentito di ottenere informazioni riguardo alcuni parametri, quali diametro medio e deviazione standard. Infine, la dimensione è stata ottenuta anche mediante DLS, attraverso cui è stato possibile ricavare informazioni sulla distribuzione dimensionale delle nanoparticelle presenti in sospensione.

In seguito all'ottimizzazione della sintesi è stato possibile identificare un colloidale ottimale che successivamente è stato selezionato per lo sviluppo di un saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica. In tale saggio le NP vengono incubate con concentrazioni crescenti di BSA (individuata come proteina modello) e NaCl, il quale induce l'aggregazione delle nanoparticelle, in assenza di una copertura efficiente della loro superficie. Mediante l'utilizzo di diverse concentrazioni proteiche risulta possibile evidenziare la concentrazione ottimale di BSA che adsorbendosi sulle NP le protegge in presenza di NaCl. Inizialmente, il saggio è stato riadattato per essere eseguito in piastre multipozzetto, con

lettura tramite lettore di piastre. In seguito, le prove condotte su sintesi ottenute a pH differenti, mediante variazioni dei tempi di incubazione e della concentrazione salina utilizzata, hanno permesso di individuare le condizioni ottimali per l'adsorbimento della proteina. È stata dimostrata la proporzionalità tra concentrazione di BSA utilizzata e la protezione dall'aggregazione indotta dal sale. Infatti, il raggiungimento di un plateau sulle curve ottenute ha permesso di comprendere come in determinati range di concentrazione proteica avvenisse la formazione di un rivestimento proteico in grado di modulare la stabilità del sistema. La formazione di questa "corona proteica" è stata effettivamente in grado di proteggere le nanoparticelle dall'aggregazione indotta dal sale. Tali prove hanno consentito di individuare un intervallo di condizioni ottimali per ottenere stabilità e riproducibilità nel sistema colloidale e di permettere la determinazione delle proteine in un campione incognito.

Dal confronto tra i dati ottenuti sperimentalmente e mediante la modellazione è stata stimata la superficie totale disponibile delle nanoparticelle nel colloide ed è stata confrontata con l'area teoricamente occupata dalle molecole di BSA in un range proteico compreso tra 0 e 83  $\mu\text{g/ml}$ . Successivamente, per ogni concentrazione utilizzata durante l'esperimento è stato calcolato il numero di molecole corrispondenti ad ogni range proteico analizzato. Tale valore è stato confrontato con il numero di molecole ricavato a partire dalla stima dei diametri medi ottenuti dalla caratterizzazione al FESEM. Questo procedimento è stato effettuato per comprendere le condizioni che portano alla stabilizzazione del colloide.

Infine, per incrementare la sensibilità del saggio le prove sono state condotte mediante spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS). Il protocollo sperimentale ha previsto l'incubazione delle nanoparticelle con MBA e BSA, seguita dall'aggiunta di NaCl come agente aggregante. Le prove, sono state ottimizzate variando anche in questo caso diversi parametri, tra cui i tempi di incubazione e gli stock di MBA e BSA utilizzati. In particolare, è stato analizzato un range proteico compreso tra 0 e 83  $\mu\text{g/ml}$ . Per quanto riguarda l'MBA, la concentrazione è stata inizialmente variata nell'intervallo 0-83  $\mu\text{g/ml}$ , per poi essere ridotta a 0-20,88  $\mu\text{g/ml}$  e, infine, a 0-8,33  $\mu\text{g/ml}$ . L'intensità dei segnali ha mostrato una buona riproducibilità fino alla concentrazione minima saggiata di 8,33  $\mu\text{g/ml}$ . L'analisi delle stesse è avvenuta mediante spettroscopia Raman la quale ha invece permesso di ottenere informazioni più dettagliate riguardo l'interazione tra le nanoparticelle e le molecole target. Infine per entrambi i saggi condotti è stato calcolato il LOD, per testare la sensibilità del metodo utilizzato, ottenendo limiti di rivelabilità inferiori rispetto a quelli tipici dei kit commerciali. I dati ottenuti confermano l'elevata sensibilità del metodo sviluppato. I valori di LOD e LOQ ottenuti quindi confermano la capacità del metodo di rilevare basse concentrazioni di proteina. Rispetto al Micro BCA Protein Assay, con capacità di rilevazione in un range compreso tra 0.5–20  $\mu\text{g/ml}$  e oltre il quale la risposta diventa non lineare. Il metodo proposto in tale lavoro di tesi risulta quindi più sensibile nel range investigato.

Dalle prove effettuate è possibile dedurre come la combinazione di sintesi controllate e le rispettive caratterizzazioni, supportate anche dalla creazione di uno script, rappresentano una strategia efficace per lo sviluppo di sistemi colloidali funzionali e per la comprensione delle caratteristiche che contraddistinguono ogni colloide. Tale approccio non solo ha permesso di ottimizzare le condizioni per la sintesi delle nanoparticelle, ma anche di comprendere in maniera più approfondita l'interazione tra superficie metallica e biomolecole, al fine di ottenere sistemi stabili e riproducibili.

Tale studio rappresenta quindi un punto di partenza per ulteriori sviluppi futuri. In quest'ottica, il sistema studiato apre la strada a ulteriori sviluppi nel campo dei biosensori basati su nanoparticelle metalliche mediante lo sviluppo di un metodo rapido e a basso costo. In particolare, l'impiego di ulteriori proteine, che differiscono dalla BSA per dimensioni, carica e struttura tridimensionale potrebbe permettere di valutare in modo più sistematico la formazione della corona proteica e la conseguente stabilità colloidale, oltreché la realizzazione di saggi colorimetrici più selettivi e sensibili. Inoltre, l'estensione dello studio verso biomolecole di interesse clinico potrebbe contribuire, in un'ottica futura allo sviluppo di saggi con funzioni diagnostiche, sfruttando una misura ottica.

In conclusione, le prove effettuate in questo lavoro rappresentano un contributo sulla sintesi, sullo studio e sulla caratterizzazione delle nanoparticelle d'argento e la possibile interazione delle stesse con molecole target, evidenziando quindi, il potenziale di tali sistemi in diverse applicazioni che in ottica futura potrebbe condurre allo sviluppo di sistemi performanti in ambito biosensoristico e diagnostico.

## Bibliografia

- [1] Jozef T. Devreese. «Nanosensors: Feynman's Vision and the Birth of Nanotechnology». In: *MRS Bulletin* 32.9 (2007), pp. 718–725. doi: 10.1557/mrs2007.164.
- [2] Vicky V. Mody, Rodney Siwale, Ajay Singh e Hardik R. Mody. «Introduction to Metallic Nanoparticles». In: *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2.4 (2010), pp. 282–289. doi: 10.4103/0975-7406.72127.
- [3] Prasad Govindrao Jamkhande, Namrata W. Ghule, Abdul Haque Bamer e Mohan G. Kalaskar. «Metal Nanoparticles Synthesis: An Overview on Methods of Preparation, Advantages and Disadvantages, and Applications». In: *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 53 (2019), p. 101174. doi: 10.1016/j.jddst.2019.101174.
- [4] Gopal Ramalingam, Poopathy Kathirgamanathan, Ganesan Ravi, Thangavel Elangovan, Bojarajan Arjun Kumar, Nadarajah Manivannan e Kasinathan Kaviyarasu. «Quantum Confinement Effect of 2D Nanomaterials». In: *Quantum Dots – Fundamental and Applications* (2020). doi: 10.5772/intechopen.90140.
- [5] John Onyango Agumba, Godfrey Okumu Barasa, Clovis Ntahkie Takembo, Philip Mang'are Amuyunzu e Joseph Owino. «Silver Nanoparticle Kinetics: Plasmonic and Quantum Confinement Modeling». In: *Applied Physics A* 132 (2026), p. 115. doi: 10.1007/s00339-026-09291-x.
- [6] Rolf Koole et al. «Size Effects on Semiconductor Nanoparticles». In: *Nanoparticles – Workhorses of Nanoscience*. Springer, 2014. doi: 10.1007/978-3-662-44823-6\_2.
- [7] Gonalo Doria, João Conde, Bruno Veigas, Luís Giestas, Catarina Almeida, Marisa Assuno, João Rosa e Pedro V. Baptista. «Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications». In: *Sensors* 12.2 (2012), pp. 1657–1687. doi: 10.3390/s120201657.
- [8] May Hlaing et al. «Absorption and Scattering Cross-Section Extinction Values of Silver Nanoparticles». In: *Optical Materials* 58 (2016), pp. 439–444. doi: 10.1016/j.optmat.2016.03.041.
- [9] R. Sakthi Devi et al. «Applications of Gold and Silver Nanoparticles in Theranostics». In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 194 (2022), pp. 4187–4219. doi: 10.1007/s12010-022-03963-z.
- [10] Kevin G. Stamplecoskie, Juan C. Scaiano, Vidhu S. Tiwari e Hanan Anis. «Optimal Size of Silver Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy». In: *The Journal of Physical Chemistry C* 115.5 (feb. 2011), pp. 1403–1409. doi: 10.1021/jp106666t.
- [11] Ishara Fernando e Yan Zhou. «Impact of pH on the Stability, Dissolution and Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles». In: *Chemosphere* 216 (2019), pp. 297–305. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.122.
- [12] N. Fleitas-Salazar, E. Silva-Campa, S. Pedroso-Santana et al. «Effect of Temperature on the Synthesis of Silver Nanoparticles with Polyethylene Glycol: New Insights into the Reduction Mechanism». In: *Journal of Nanoparticle Research* 19 (2017), p. 113. doi: 10.1007/s11051-017-3780-3.
- [13] K. A. Willets e R. P. Van Duyne. «Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing». In: *Annual Review of Physical Chemistry* 58 (2007), pp. 267–297. doi: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607.
- [14] Sebastian Schl cker. «Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications». In: *Angewandte Chemie International Edition* 53 (2014), pp. 4756–4795. doi: 10.1002/anie.201205748.

- [15] Jorge L. Cholula-Díaz et al. «Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticle Clusters and Their Application in Ascorbic Acid Detection by SERS». In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 163 (2018), pp. 329–335. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.039.
- [16] V. Kumar, V. Nagal, A. Kumar, A. K. Singh, A. K. Hafiz e K. Singh. «Smart Nanomaterials and Sensing Devices: An Introduction». In: *Smart Nanostructure Materials and Sensor Technology*. Springer, 2022. doi: 10.1007/978-981-19-2685-3\_1.
- [17] YuJuan Zhang, Rao Huang, XianFang Zhu, LianZhou Wang e ChenXu Wu. «Synthesis, Properties, and Optical Applications of Noble Metal Nanoparticle-Biomolecule Conjugates». In: *Chinese Science Bulletin* 57.2–3 (2012), pp. 238–246. doi: 10.1007/s11434-011-4747-x.
- [18] Harish K. K., Nagasamy V., Himangshu B. e Anuttam K. «Metallic Nanoparticle: A Review». In: *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* 4.2 (2018), articolo 001011. doi: 10.26717/BJSTR.2018.04.001011.
- [19] D. Vilela, M. C. González e A. Escarpa. «Sensing Colorimetric Approaches Based on Gold and Silver Nanoparticles Aggregation: Chemical Creativity behind the Assay. A Review». In: *Analytica Chimica Acta* 751 (2012), pp. 24–43. doi: 10.1016/j.aca.2012.08.043.
- [20] I. S. Che Sulaiman, B. W. Chieng, M. J. Osman, K. K. Ong, J. I. A. Rashid, W. M. Z. Wan Yunus, S. A. M. Noor, N. A. M. Kasim, N. A. Halim e A. Mohamad. «A Review of Colorimetric Assays for Detection of Organophosphate Pesticides Using Gold and Silver Nanoparticles». In: *Microchimica Acta* 187.2 (2020), p. 131. issn: 0026-3672. doi: 10.1007/s00604-019-4034-z.
- [21] Myalowenkosi Sabela, Sébastien Balme, Mikhael Bechelany, Jean-Marc Janot e Krishna Bisetty. «A Review of Gold and Silver Nanoparticle-Based Colorimetric Sensing Assays». In: *Advanced Engineering Materials* 19.12 (2017), p. 1700270. doi: 10.1002/adem.201700270.
- [22] Benjamin Wiley, Younan Sun, Brian Mayers e Younan Xia. «Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver». In: *Chemistry – A European Journal* 11 (2005), pp. 454–463. doi: 10.1002/chem.200400927.
- [23] Clément Levard, Ernest M. Hotze, Gregory V. Lowry e Gordon E. Brown Jr. «Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity». In: *Environmental Science & Technology* 46.13 (2012), pp. 6900–6914. doi: 10.1021/es2037405.
- [24] C. Pang, P. Zhang, Y. Mu, J. Ren e B. Zhao. «Transformation and Cytotoxicity of Surface-Modified Silver Nanoparticles Undergoing Long-Term Aging». In: *Nanomaterials* 10.11 (2020), p. 2255. doi: 10.3390/nano10112255.
- [25] Y. Hang, A. Wang e N. Wu. «Plasmonic Silver and Gold Nanoparticles: Shape- and Structure-Modulated Plasmonic Functionality for Point-of-Care Sensing, Bio-Imaging and Medical Therapy». In: *Chemical Society Reviews* 53.6 (2024), pp. 2932–2971. doi: 10.1039/D3CS00793F.
- [26] Kim E. Sapsford, W. Russ Algar, Lorenzo Berti, Kelly Boeneman Gemmill, Brendan J. Casey, Eunkeu Oh, Michael H. Stewart e Igor L. Medintz. «Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries That Facilitate Nanotechnology». In: *Chemical Reviews* 113 (2013), pp. 1904–2074. doi: 10.1021/cr300143v.
- [27] Sonia Maraya Tiquia-Arashiro e Debora F. Rodrigues. «Nanoparticles Synthesized by Microorganisms». In: *Extremophiles: Applications in Nanotechnology*. Springer, Cham, 2016, pp. 1–51. doi: 10.1007/978-3-319-45215-9\_1.
- [28] T. Wonglakhon e Y. Thepchuay. «Computational Modeling of Silver Nanoparticles and Their Applications: Bridging Simulation and Experiment». In: *Journal of Cluster Science* 37 (2026), p. 12. doi: 10.1007/s10876-025-02964-2.

- [29] Amica Panja et al. «Silver Nanoparticles – A Review». In: Eurasian Journal of Medicine and Oncology 5.2 (2021), pp. 95–102. doi: 10.14744/ejmo.2021.59602.
- [30] Jorge L. Cholula-Díaz et al. «Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticle Clusters and Their Application in Ascorbic Acid Detection by SERS». In: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 163 (2018), pp. 329–335. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.039.
- [31] Z. Starowicz, R. Wojnarowska-Nowak, P. Ozga et al. «The Tuning of the Plasmon Resonance of the Metal Nanoparticles in Terms of the SERS Effect». In: Colloid and Polymer Science 296 (2018), pp. 1029–1037. doi: 10.1007/s00396-018-4308-9.
- [32] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao e G. C. Schatz. «The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment». In: The Journal of Physical Chemistry B 107.3 (2003), pp. 668–677. doi: 10.1021/jp026731y.
- [33] J. Grand, B. Auguie ed E. C. Le Ru. «Combined Extinction and Absorption UV–Visible Spectroscopy as a Method for Revealing Shape Imperfections of Metallic Nanoparticles». In: Analytical Chemistry 91.22 (2019), pp. 14639–14648. doi: 10.1021/acs.analchem.9b03798.
- [34] nanoComposix. «Silver Nanoparticles: Physical Properties». Fonte online, consultata il 28 giugno 2026.
- [35] J. Lermé. «Size Evolution of the Surface Plasmon Resonance Damping in Silver Nanoparticles: Confinement and Dielectric Effects». In: The Journal of Physical Chemistry C 115.29 (2011), pp. 14098–14110. doi: 10.1021/jp203481m.
- [36] P. Yu, J. Huang e J. Tang. «Observation of Coalescence Process of Silver Nanospheres During Shape Transformation to Nanoprisms». In: Nanoscale Research Letters 6 (2011), p. 46. doi: 10.1007/s11671-010-9808-6.
- [37] Y. Yang, S. Matsubara, L. Xiong, T. Hayakawa e M. Nogami. «Solvothermal Synthesis of Multiple Shapes of Silver Nanoparticles and Their SERS Properties». In: The Journal of Physical Chemistry C 111.26 (2007), pp. 9095–9104. doi: 10.1021/jp068859b.
- [38] S. Link e M. A. El-Sayed. «Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods». In: The Journal of Physical Chemistry B 103.40 (1999), pp. 8410–8426. doi: 10.1021/jp9917648.
- [39] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán e P. Mulvaney. «Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications». In: Coordination Chemistry Reviews 249.17–18 (2005), pp. 1870–1901. doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.030.
- [40] P. Szczyglewska, A. Feliczak-Guzik e I. Nowak. «Nanotechnology–General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles». In: Molecules 28.13 (2023), p. 4932. doi: 10.3390/molecules28134932.
- [41] J. Haber e K. Sokolov. «Synthesis of Stable Citrate-Capped Silver Nanoprisms». In: Langmuir 33 (2017), pp. 10525–10530. doi: 10.1021/acs.langmuir.7b01362.
- [42] Nathan D. Israelsen et al. «Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor». In: The Scientific World Journal 2015 (2015), articolo 124582. doi: 10.1155/2015/124582.
- [43] M. Islam, M. S. Ahmed, S. Yun, H.-Y. Kim e K.-W. Nam. «Harnessing Radiation for Nanotechnology: A Comprehensive Review of Techniques, Innovations, and Applications». In: Nanomaterials 14.24 (2024), p. 2051. doi: 10.3390/nano14242051.

- [44] Ivan Sondi, Dan V. Goia ed Egon Matijević. «Preparation of Highly Concentrated Stable Dispersions of Uniform Silver Nanoparticles». In: *Journal of Colloid and Interface Science* 260 (2003), pp. 75–81. doi: 10.1016/S0021-9797(02)00280-2.
- [45] A. Mazzonello et al. «Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles». In: *International Journal of Modern Engineering Research* 7 (2017), pp. 41–47.
- [46] Md Alim-Al-Razy, G. M. Asik Bayazid, Raihan Ur Rahman, Rajib Bosu e Shahla Samim Shamma. «Silver Nanoparticle Synthesis, UV-Vis Spectroscopy to Find Particle Size and Measure Resistance of Colloidal Solution». In: *Journal of Physics: Conference Series* 1706 (2020), p. 012020. doi: 10.1088/1742-6596/1706/1/012020.
- [47] Kandarp Mavani e Mihir Shah. «Synthesis of Silver Nanoparticles by Using Sodium Borohydride as a Reducing Agent». In: *International Journal of Engineering Research & Technology* 2.3 (2013), pp. 1–5.
- [48] L. Mulfinger, S. D. Solomon, M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky e C. Boritz. «Synthesis and Study of Silver Nanoparticles». In: *Journal of Chemical Education* 84.2 (2007), pp. 322–325.
- [49] Yaqiong Qin et al. «Size Control over Spherical Silver Nanoparticles by Ascorbic Acid Reduction». In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372 (2010), pp. 172–176.
- [50] Ludivine Malassis et al. «One-Step Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles with Ascorbic Acid and Their Versatile Surface Post-Functionalization». In: *RSC Advances* 6 (2016), pp. 33092–33100. doi: 10.1039/C6RA00194G.
- [51] N. Mat Zain, A. G. F. Stapley e G. Shama. «Green Synthesis of Silver and Copper Nanoparticles Using Ascorbic Acid and Chitosan for Antimicrobial Applications». In: *Carbohydrate Polymers* 112 (nov. 2014), pp. 195–202. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.05.081.
- [52] Debashree Roy et al. «Exploring the Complex Chemistry and Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Nanoparticle Synthesis». In: *Angewandte Chemie International Edition* 63 (2024), e202412542. doi: 10.1002/anie.202412542.
- [53] I. Ahmad, R. H. Shaikh, A. Khurshid e A. Khurshid. «Photolysis of Ascorbic Acid in Aqueous Solution: A Kinetic Study». In: *Baqai Journal of Health Sciences* 22.1 (2019), pp. 20–32.
- [54] I. De Leersnyder, L. De Gelder, I. Van Driessche e P. Vermeir. «Revealing the Importance of Aging, Environment, Size and Stabilization Mechanisms on the Stability of Metal Nanoparticles: A Case Study for Silver Nanoparticles in a Minimally Defined and Complex Undefined Bacterial Growth Medium». In: *Nanomaterials* 9.12 (2019), p. 1684. doi: 10.3390/nano9121684.
- [55] «Surface and Colloid Chemistry». In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. A cura di K. H. J. Buschow, R. W. Cahn, M. C. Flemings, B. Ilschner, E. J. Kramer e S. Mahajan. 2ª ed. Elsevier, 2001, pp. 1–10. doi: 10.1016/B0-08-043152-6/01622-3.
- [56] Ernest M. Hotze et al. «Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment». In: *Journal of Environmental Quality* 39 (2010), pp. 1909–1924. doi: 10.2134/jeq2009.0462.
- [57] Xuan Li, John J. Lenhart e Harold W. Walker. «Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles». In: *Langmuir* 28 (2012), pp. 1095–1104. doi: 10.1021/la202328n.
- [58] V. Bal. «Stability Characteristics of Nanoparticles in a Laminar Linear Shear Flow in the Presence of DLVO and Non-DLVO Forces». In: *Langmuir* 35.34 (2019), pp. 11175–11187. doi: 10.1021/acs.langmuir.9b01886.

- [59] L. B. Anigol, J. S. Charantimath e P. M. Gurubasavaraj. «Effect of Concentration and pH on the Size of Silver Nanoparticles Synthesized by Green Chemistry». In: *Organic & Medicinal Chemistry International Journal* 3.5 (2017). doi: 10.19080/OMCIJ.2017.03.555622.
- [60] S. Yazdani, A. Daneshkhah, A. Diwate, H. Patel, J. Smith, O. Reul, R. Cheng, A. Izadian e A. R. Hajrasouliha. «Model for Gold Nanoparticle Synthesis: Effect of pH and Reaction Time». In: *ACS Omega* 6.25 (2021), pp. 16847–16853. doi: 10.1021/acsomega.1c01418.
- [61] V. Etacheri, R. Georgekutty, M. K. Seery e S. C. Pillai. «Single Step Morphology-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles». In: *MRS Proceedings* 1217 (2010). doi: 10.1557/PROC-1217-Y08-40.
- [62] F. Yusof, S. Chowdhury, N. Sulaiman e M. O. Faruck. «Effect of Process Parameters on the Synthesis of Silver Nanoparticles and Its Effects on Microbes». In: *Jurnal Teknologi* 80.3 (2018), pp. 115–120. doi: 10.11113/jt.v80.11465.
- [63] Z. Li, Y. Wang e Q. Yu. «Significant Parameters in the Optimization of Synthesis of Silver Nanoparticles by Chemical Reduction Method». In: *Journal of Materials Engineering and Performance* 19 (2010), pp. 252–256. doi: 10.1007/s11665-009-9486-7.
- [64] Majid Darroudi, Mansor Bin Ahmad, Reza Zamiri, A. K. Zak, Abdul Halim Abdullah e Nor Azowa Ibrahim. «Time-Dependent Effect in Green Synthesis of Silver Nanoparticles». In: *International Journal of Nanomedicine* 6 (2011), pp. 677–681. doi: 10.2147/IJN.S17669.
- [65] G. Suriati et al. «Synthesis of Silver Nanoparticles by Chemical Reduction Method: Effect of Reducing Agent and Surfactant Concentration». In: *International Journal of Automotive and Mechanical Engineering* 10 (2014), pp. 1920–1927. doi: 10.15282/ijame.10.2014.9.0160.
- [66] B. Wiley, Y. Sun e Y. Xia. «Synthesis of Silver Nanostructures with Controlled Shapes and Properties». In: *Accounts of Chemical Research* 40.10 (2007), pp. 1067–1076. doi: 10.1021/ar7000974.
- [67] M. J. S. Spencer, A. Hung, I. K. Snook e I. Yarovsky. «Density Functional Theory Study of the Relaxation and Energy of Iron Surfaces». In: *Surface Science* 513.2 (2002), pp. 389–398. doi: 10.1016/S0039-6028(02)01809-5.
- [68] N. T. K. Thanh, N. Maclean e S. Mahiddine. «Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution». In: *Chemical Reviews* 114.15 (2014), pp. 7610–7630. doi: 10.1021/cr400544s.
- [69] Javed Ijaz Hussain et al. «Silver Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Kinetics». In: *Advanced Materials Letters* 2.3 (2011), pp. 188–194. doi: 10.5185/amlett.2011.1206.
- [70] Roberto Nisticò, Paola Rivolo e Fabrizio Giorgis. «Tips and Tricks for the Surface Engineering of Well-Ordered Morphologically Driven Silver-Based Nanomaterials». In: *ChemistryOpen* 8.4 (apr. 2019), pp. 508–519. issn: 2191-1363. doi: 10.1002/open.201900007.
- [71] S. Kumar, K. S. Gandhi e R. Kumar. «Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method». In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 46.10 (2007), pp. 3128–3136. doi: 10.1021/ie060672j.
- [72] Neus G. Bastús et al. «Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties». In: *Chemistry of Materials* 26 (2014), pp. 2836–2846. doi: 10.1021/cm500316k.
- [73] A. Loiseau, V. Asila, M. Salmain, G. Boitel-Aullen, M. Lam e S. Boujday. «Silver-Based Plasmonic Nanoparticles and Their Use in Biosensing». In: *Biosensors* 9.2 (2019), p. 78. doi: 10.3390/bios9020078.
- [74] N. Ibrahim, N. D. Jamaluddin, L. L. Tan e N. Y. Mohd Yusof. «A Review on the Development of Gold and Silver Nanoparticles-Based Biosensor as a Detection Strategy of Emerging and Pathogenic RNA Virus». In: *Sensors* 21.15 (2021), p. 5114. doi: 10.3390/s21155114.

- [75] Aswathy Ravindran, Preethy Chandran e S. Sudheer Khan. «Biofunctionalized Silver Nanoparticles: Advances and Prospects». In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 105 (2013), pp. 342–352. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.036.
- [76] Younghyun Wy, Hayoon Jung, Jong Wook Hong e Sang Woo Han. «Exploiting Plasmonic Hot Spots in Au-Based Nanostructures for Sensing and Photocatalysis». In: *Accounts of Chemical Research* 55 (2022), pp. 831–843. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00682.
- [77] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo e G. M. Whitesides. «Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology». In: *Chemical Reviews* 105.4 (2005), pp. 1103–1170. doi: 10.1021/cr0300789.
- [78] L. Yu e N. Li. «Noble Metal Nanoparticles-Based Colorimetric Biosensor for Visual Quantification: A Mini Review». In: *Chemosensors* 7.4 (2019), p. 53. doi: 10.3390/chemosensors7040053.
- [79] F. Kazemi, S. M. Naghib, Y. Zare e K. Y. Rhee. «Biosensing Applications of Polyaniline (PANI)-Based Nanocomposites: A Review». In: *Polymer Reviews* 61.3 (2021), pp. 553–597. doi: 10.1080/15583724.2020.1858871.
- [80] Shruti R. Saptarshi, Albert Duschl e Andreas L. Lopata. «Interaction of Nanoparticles with Proteins: Relation to Bio-Reactivity of the Nanoparticle». In: *Journal of Nanobiotechnology* 11 (2013), p. 26. doi: 10.1186/1477-3155-11-26.
- [81] Siddhartha Shrivastava e Debabrata Dash. «Label-Free Colorimetric Estimation of Proteins Using Nanoparticles of Silver». In: *Nano-Micro Letters* 2 (2010), pp. 164–168. doi: 10.5101/nml.v2i3.p164-168.
- [81a] Xu Xu, Jing Wang, Feng Yang, Kai Jiao e Xue Yang. «Label-Free Colorimetric Detection of Small Molecules Utilizing DNA Oligonucleotides and Silver Nanoparticles». In: *Small* 5 (2009), pp. 2669–2672. doi: 10.1002/smll.200901164.
- [82] Van Hong Nguyen e Beom-Jin Lee. «Protein Corona: A New Approach for Nanomedicine Design». In: *International Journal of Nanomedicine* 12 (2017), pp. 3137–3151. doi: 10.2147/IJN.S129300.
- [83] Jingyi Zhang, Xianjun Fu, Changling Yan e Gongke Wang. «The Morphology-Dependent Interaction between Silver Nanoparticles and Bovine Serum Albumin». In: *Materials* 16.17 (2023), p. 5821. doi: 10.3390/ma16175821.
- [84] C. Tanford. «How Protein Chemists Learned about the Hydrophobic Factor». In: *Protein Science* 6.6 (1997), pp. 1358–1366. doi: 10.1002/pro.5560060627.
- [85] Brittany E. Givens, Elizabeth Wilson e Jennifer Fiegel. «The Effect of Salts in Aqueous Media on the Formation of the BSA Corona on SiO<sub>2</sub> Nanoparticles». In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 179 (2019), pp. 374–381. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.04.012.
- [86] A. M. El Badawy, T. P. Luxton, R. G. Silva, K. G. Scheckel, M. T. Suidan e T. M. Tolaymat. «The Impact of Stabilization Mechanism on the Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles». In: *Science of the Total Environment* 429 (2012), pp. 325–331. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.041.
- [87] Y. T. Ho, B. Poinard, E. L. L. Yeo e J. C. Y. Kah. «An Instantaneous Colorimetric Protein Assay Based on Spontaneous Formation of Protein Corona on Gold Nanoparticles». In: *Analyst* 140 (2015), pp. 1026–1036. doi: 10.1039/C4AN01819B.
- [88] Monica Acuña, Mariana Walter, Maritza Paez e Manuel Ignacio Azócar. «Colorimetric Detection of Bovine Serum Albumin (BSA Protein) by Interaction and Modification of Silver Nanoparticles». In: *ACS Omega* 10 (2025), pp. 2679–2687. doi: 10.1021/acsomega.4c07828.

- [89] A. Mohammed Siddiqa, Devaraj Murugan, Rachana Srivastava e Md. Sayem Alam. «Influence of pH on Interaction of Silver Nanoparticles–Protein: Analyses by Spectroscopic and Thermodynamic Ideology». In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 184 (2019), p. 110524. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110524.
- [90] L. Lin, H. Peng, Z. Chang e G. Ding. «Experimental Investigation on TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Migration from Refrigerant–Oil Mixture to Lubricating Oil during Refrigerant Dryout». In: *International Journal of Refrigeration* 77 (mag. 2017), pp. 75–86. doi: 10.1016/j.ijrefrig.2017.02.026.
- [91] Azhar S. Alaboodi, Shaymaa Awad Kadhim e Ahmed Shaker Hussein. «Ultraviolet-Visible Spectroscopy, Importance, Principle, Structure and Most Important Applications: A Study Review». In: *International Journal of Novel Research in Physics Chemistry & Mathematics* 12 (2025), pp. 53–60. doi: 10.5281/zenodo.14965556.
- [92] R. Senthil Prabhu, R. Priyanka, M. Vijay e G. R. Kaviya Vikashini. «Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) with a Very Big Future in Pharmaceutical Research». In: *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 11 (2021), pp. 161–167. doi: 10.21276/ijpbs.2021.11.2.21.
- [93] Humboldt-Universität zu Berlin. «Scanning-Electron Microscopy». SALSA School of Analytical Sciences Adlershof, Photonics and Application Labs, Application Lab, Instrumentation. Consultato il 27 giugno 2026. <https://www.salsa.hu-berlin.de/>
- [94] Lab Expert. «Microplate Reader». Consultato il 27 giugno 2026. [https://www.labexpert.co.th/Microplate\\_Reader.html](https://www.labexpert.co.th/Microplate_Reader.html)
- [95] Andrea Orlando, Filippo Franceschini, Cristian Muscas, Solomiya Pidkova, Mattia Bartoli, Massimo Rovere e Alberto Tagliaferro. «A Comprehensive Review on Raman Spectroscopy Applications». In: *Chemosensors* 9.9 (2021), p. 262. doi: 10.3390/chemosensors9090262.
- [96] Dongxian Li, Weisheng Yue, Ping Gao, Tiancheng Gong, Changtao Wang e Xiangang Luo. «Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for the Characterization of Atmospheric Aerosols: Current Status and Challenges». In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 170 (2024), p. 117426. doi: 10.1016/j.trac.2023.117426.
- [97] Stuart T. Gentry, Shane F. Kendra e Mark W. Bezpalko. «Ostwald Ripening in Metallic Nanoparticles: Stochastic Kinetics». In: *The Journal of Physical Chemistry C* 115 (2011), pp. 12736–12741. doi: 10.1021/jp2009786.
- [98] B. Ajitha, Y. Ashok Kumar Reddy e P. Sreedhara Reddy. «Enhanced Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles with Controlled Particle Size by pH Variation». In: *Powder Technology* 269 (2015), pp. 110–117. doi: 10.1016/j.powtec.2014.08.049.
- [99] S. Piñero et al. «Silver Nanoparticles: Influence of the Synthesis Temperature on the Particles' Morphology». In: *Journal of Physics: Conference Series* 786 (2017), p. 012020. doi: 10.1088/1742-6596/786/1/012020.
- [100] X. C. Jiang, W. M. Chen, C. Y. Chen, S. X. Xiong e A. B. Yu. «Role of Temperature in the Growth of Silver Nanoparticles through a Synergetic Reduction Approach». In: *Nanoscale Research Letters* 6 (2011), p. 32. doi: 10.1007/s11671-010-9780-1.
- [101] Nikolai G. Khlebtsov e Lev A. Dykman. «Optical Properties and Biomedical Applications of Plasmonic Nanoparticles». In: *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 111 (2010), pp. 1–35. doi: 10.1016/j.jqsrt.2009.07.012.
- [102] Indah Miftakhul Janah, Roto Roto e Dwi Siswanta. «Effect of Ascorbic Acid Concentration on the Stability of Tartrate-Capped Silver Nanoparticles». In: *Indonesian Journal of Chemistry* 22 (2022), pp. 857–866. doi: 10.22146/ijc.73196.

- [103] Harihar Nath Verma, Praveen Singh e R. M. Chavan. «Gold Nanoparticle: Synthesis and Characterization». In: *Veterinary World* 7.2 (2014), pp. 72–77. doi: 10.14202/vetworld.2014.72-77.
- [104] D. Chicea, A. Nicolae-Maranciuc, A. S. Doroshkevich, L. M. Chicea e O. M. Ozkendir. «Comparative Synthesis of Silver Nanoparticles: Evaluation of Chemical Reduction Procedures, AFM and DLS Size Analysis». In: *Materials* 16.15 (2023), p. 5244. doi: 10.3390/ma16155244.
- [105] Gianluca Almara, Alessandro Chiadò, Roberta Calmo e Carlo Ricciardi. «Succinic Anhydride Functionalized Microcantilevers for Protein Immobilization and Quantification». In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408.28 (2016), pp. 7917–7926. doi: 10.1007/s00216-016-9920-2.
- [106] Amro M. El Badawy, Todd P. Luxton, Rendahandi G. Silva, Kirk G. Scheckel, Makram T. Suidan e Thabet M. Tolaymat. «Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticle Suspensions». In: *Environmental Science & Technology* 44 (2010), pp. 1260–1266. doi: 10.1021/es902240g.
- [107] Daniel Fologea, Bradley Ledden, David S. McNabb e Jiali Li. «Electrical Characterization of Protein Molecules by a Solid-State Nanopore». In: *Applied Physics Letters* 91.5 (2007), p. 053901. doi: 10.1063/1.2767206.
- [108] Yu Yun Wang, Haotian Shi, Yichen Gong, Boxin Zhang, Bofan Zhao, Ruoxi Li e Stephen B. Cronin. «Measuring Local pKa and pH Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of 4-Mercaptobenzoic Acid». In: *Langmuir* 39.47 (nov. 2023), pp. 16807–16811. issn: 0743-7463. doi: 10.1021/acs.langmuir.3c02073.
- [109] Matthew Y. Chan, Weinan Leng e Peter J. Vikesland. «Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Characterization of Salt-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles». In: *ChemPhysChem* 19.1 (gen. 2018), pp. 24–28. doi: 10.1002/cphc.201700798.
- [110] T. Huang, M. Long e B. Huo. «Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay». In: *The Open Biomedical Engineering Journal* 4 (2010), pp. 271–278. doi: 10.2174/1874120701004010271.

# Appendice

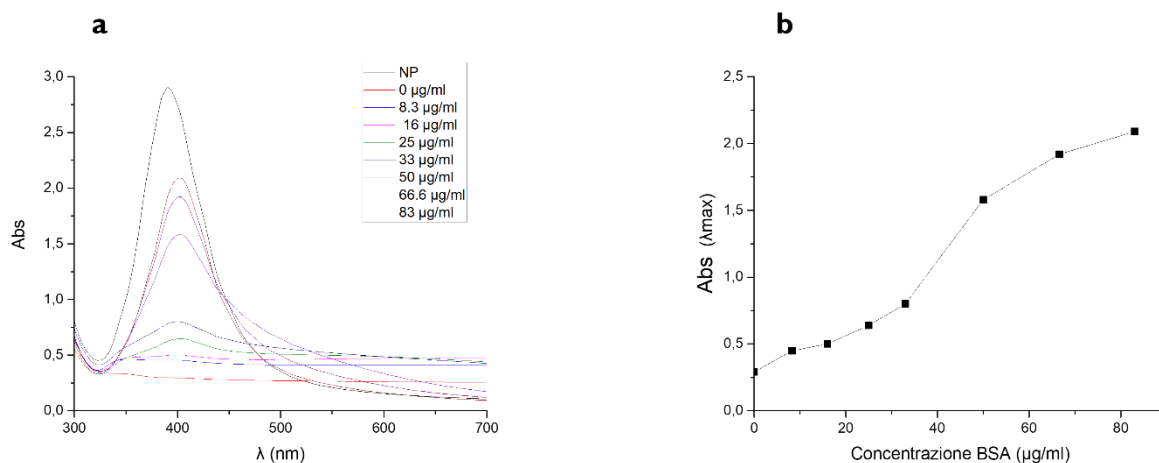


Figura 1: Analisi al lettore di piastra del campione diluito. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 403 nm in funzione della concentrazione di BSA.

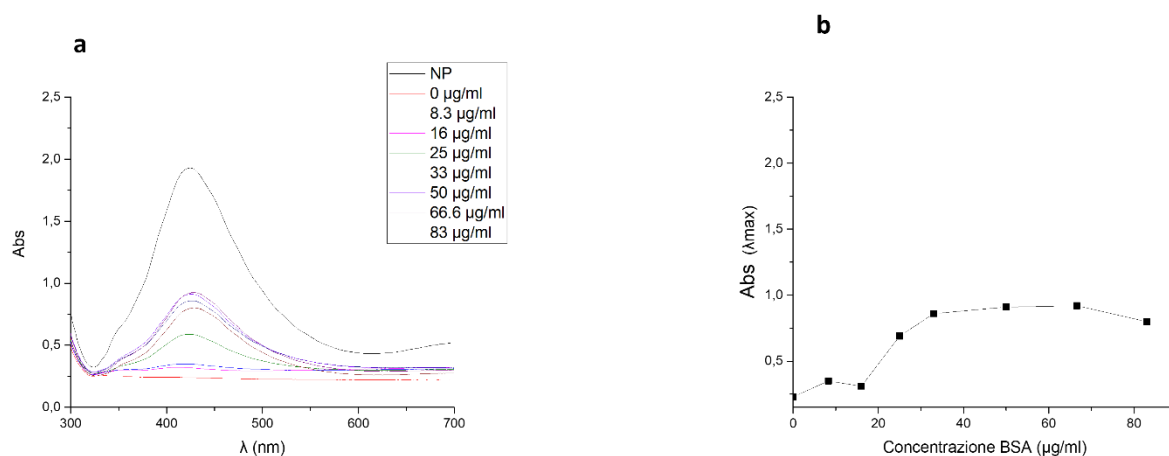


Figura 2: Analisi al lettore di piastra, campione a pH=7.00. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 428 nm in funzione della concentrazione di BSA.

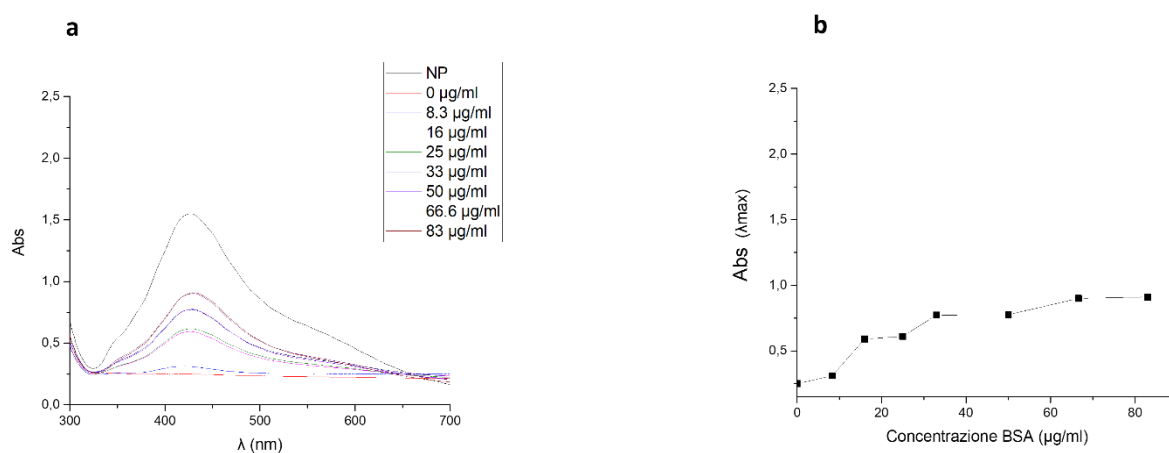


Figura 3: Analisi al lettore di piastra, campione a pH=8.00. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 428 nm in funzione della concentrazione di BSA.

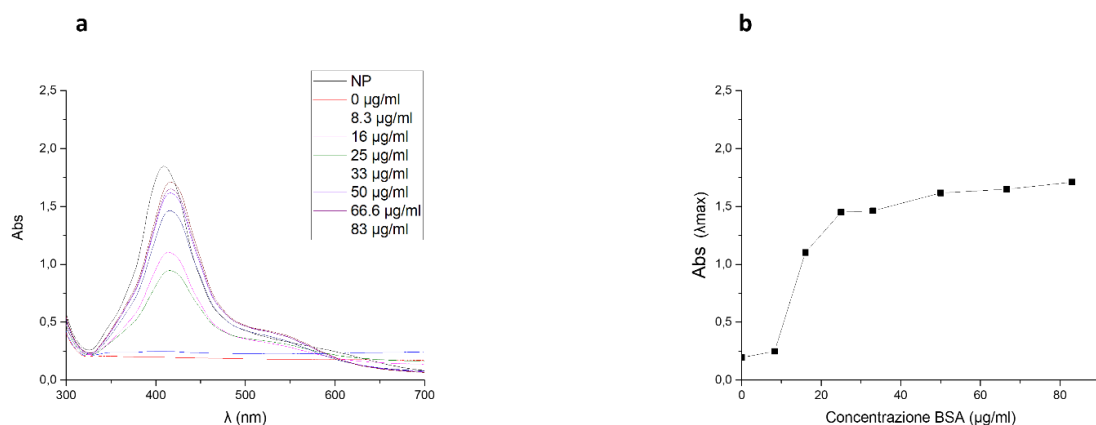


Figura 4: Analisi al lettore di piastra, campione a pH=9.00. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 420 nm in funzione della concentrazione di BSA.

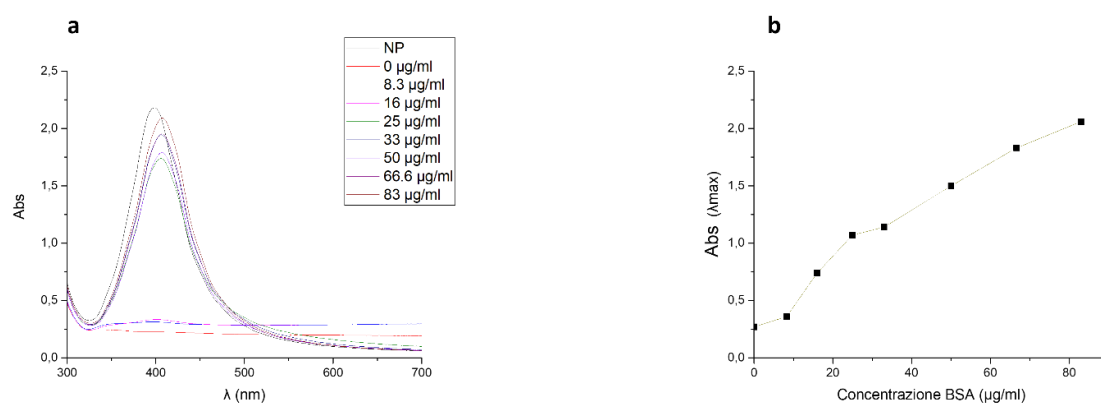


Figura 5: Analisi al lettore di piastra, campione a pH=10.00. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 412 nm in funzione della concentrazione di BSA.

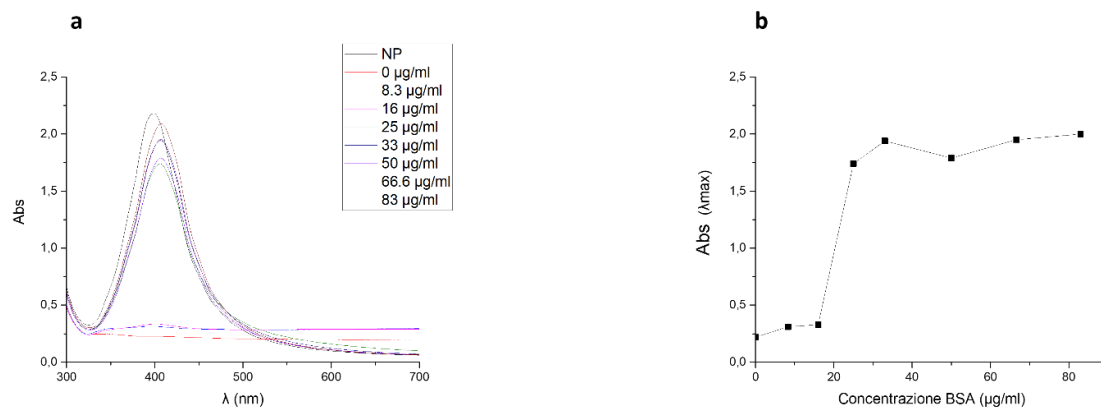


Figura 6: Analisi al lettore di piastra, campione a pH=10.5. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 407 nm in funzione della concentrazione di BSA.

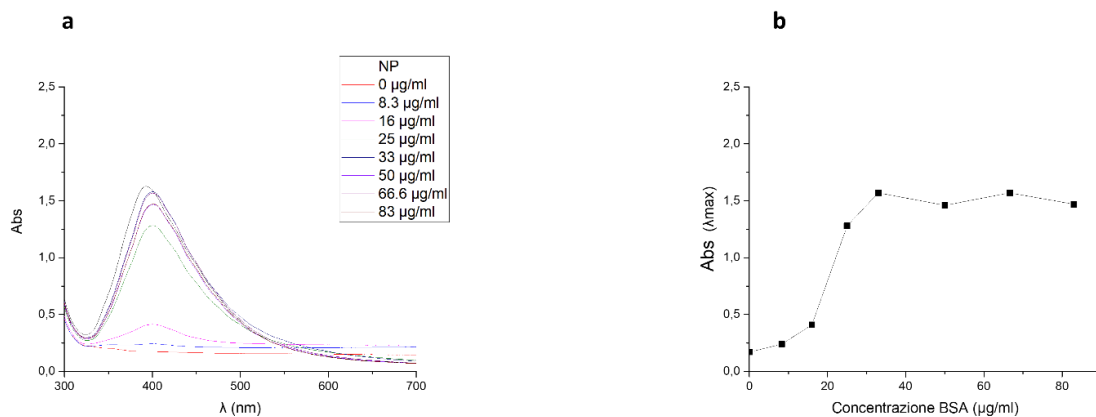


Figura 7: Analisi al lettore di piastra, campione a pH=11.00. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 400 nm in funzione della concentrazione di BSA.

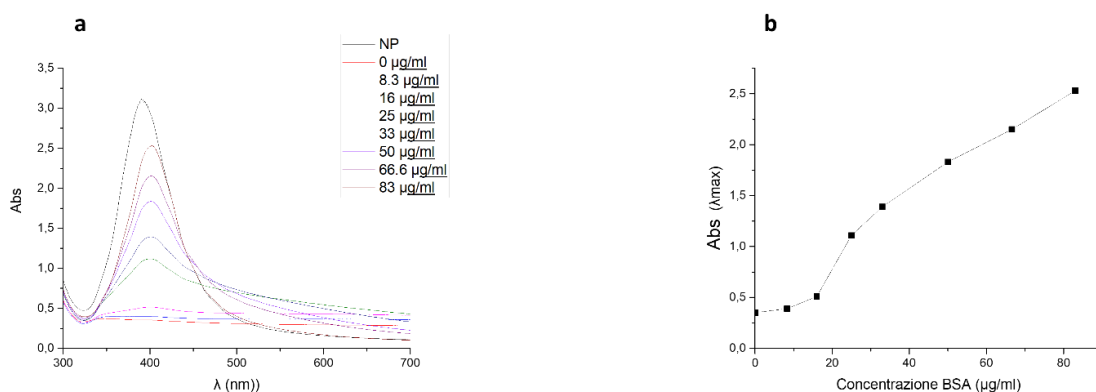


Figura 8: Analisi al lettore di piastra, campione a pH=11.5. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 402 nm in funzione della concentrazione di BSA.

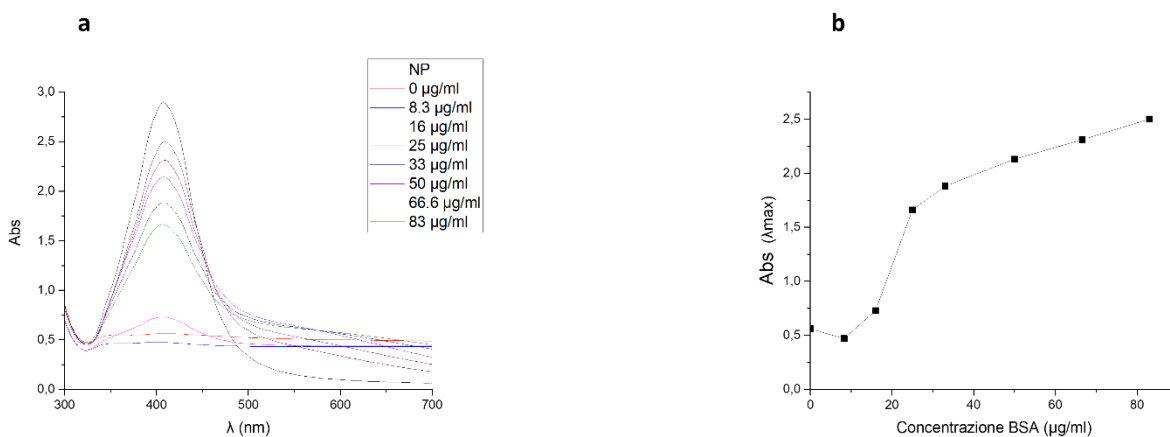


Figura 9: Analisi al lettore di piastra, campione a pH=12.00. (a) Spettri di assorbanza alle diverse concentrazioni di BSA. (b) Grafico dell'assorbanza picco a 403 nm in funzione della concentrazione di BSA.

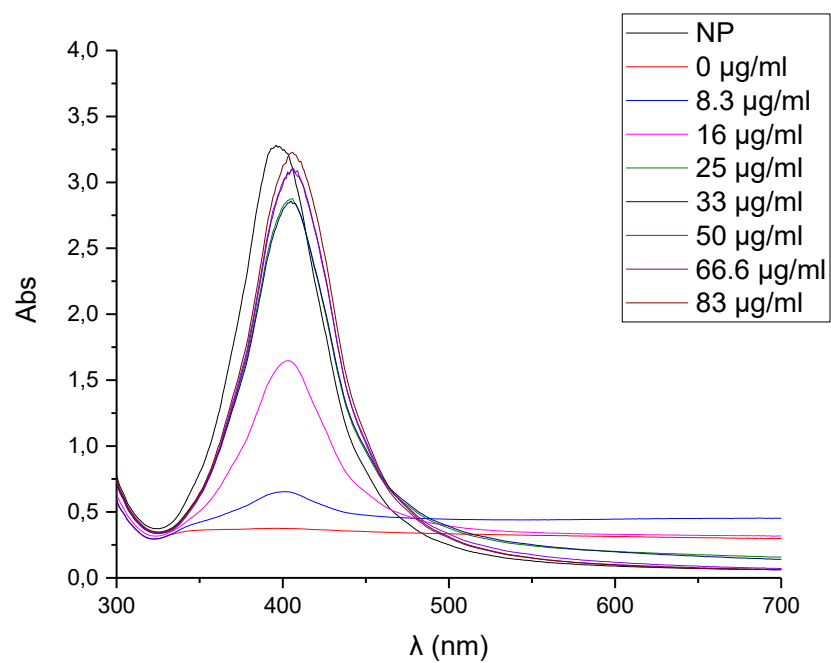


Figura 10: Analisi al lettore di piastra del campione a pH=11.0 ottenuto dopo 10 minuti di reazione.

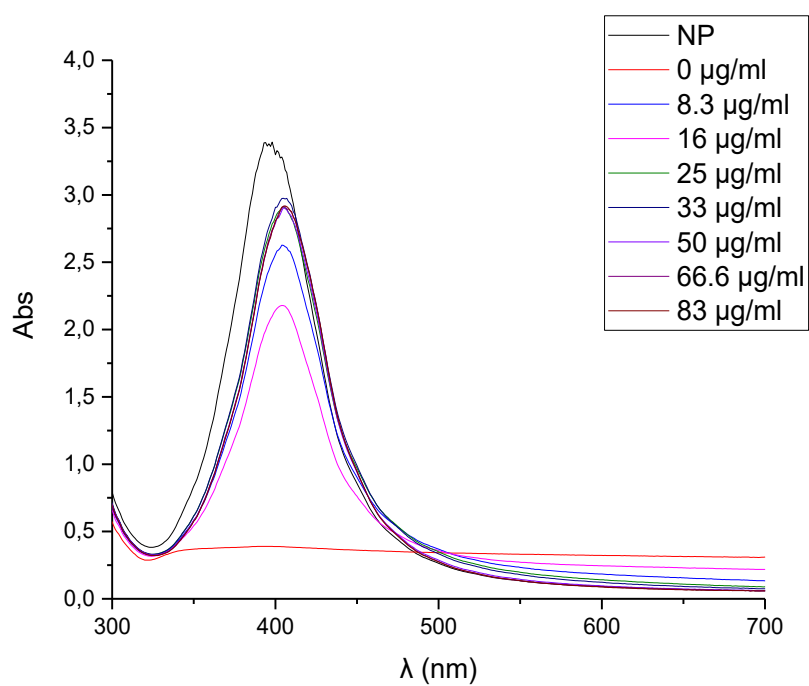


Figura 11: Analisi al lettore di piastra del campione a pH=11.0 ottenuto dopo 30 minuti di reazione.

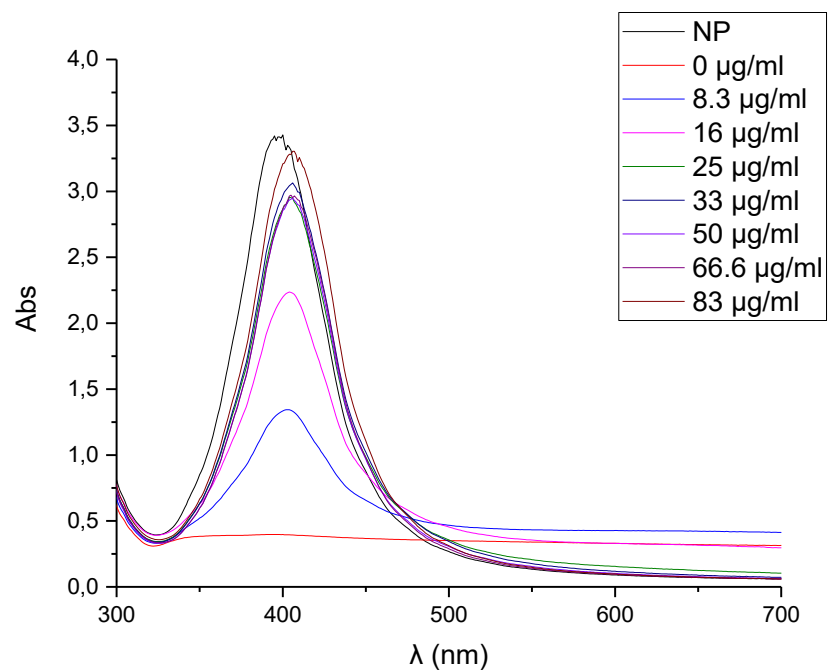


Figura 12: Analisi al lettore di piastra del campione a  $pH=11.0$  ottenuto dopo 60 minuti di reazione.

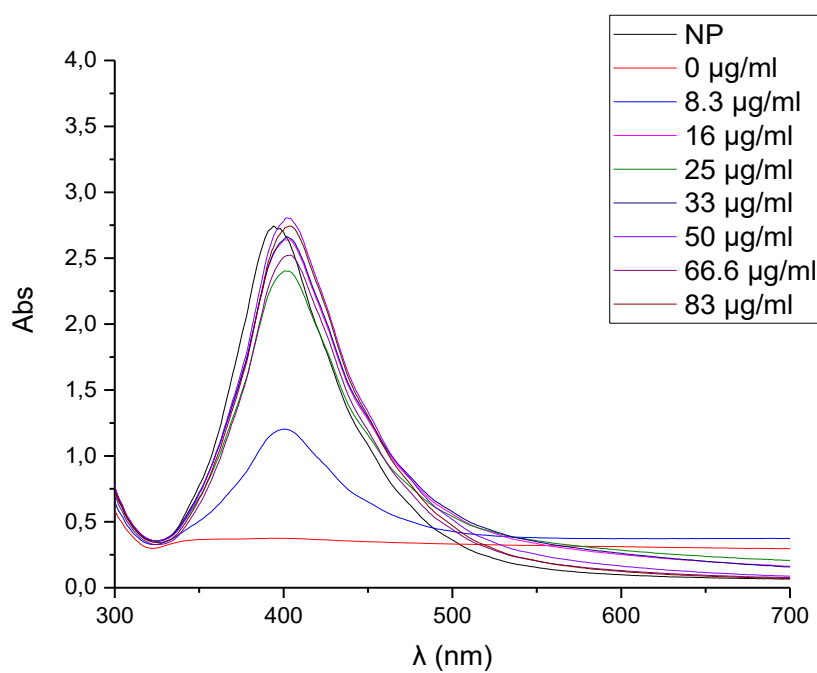


Figura 13: Analisi al lettore di piastra del campione a  $pH=11.5$  ottenuto dopo 10 minuti di reazione.

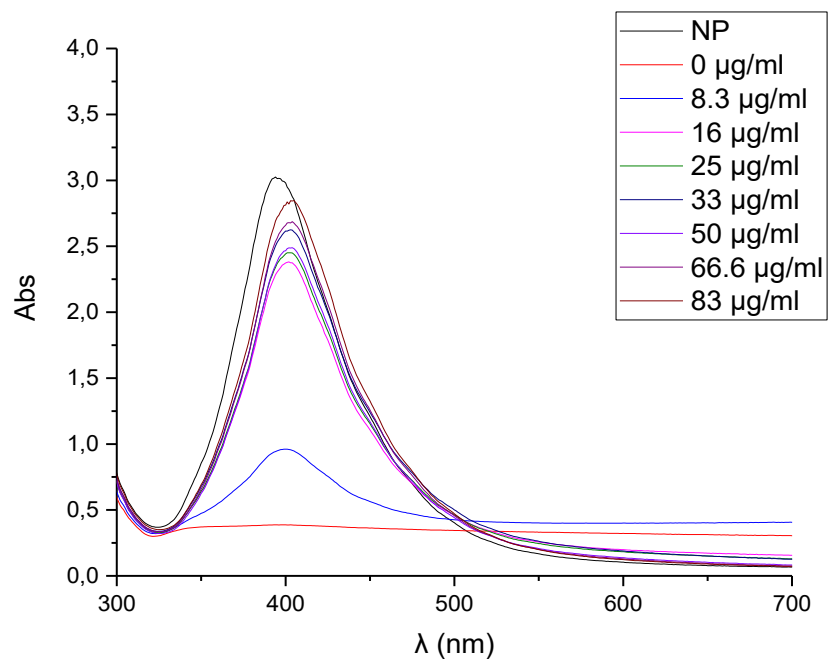


Figura 14: Analisi al lettore di piastra del campione a pH=11.5 ottenuto dopo 30 minuti di reazione.

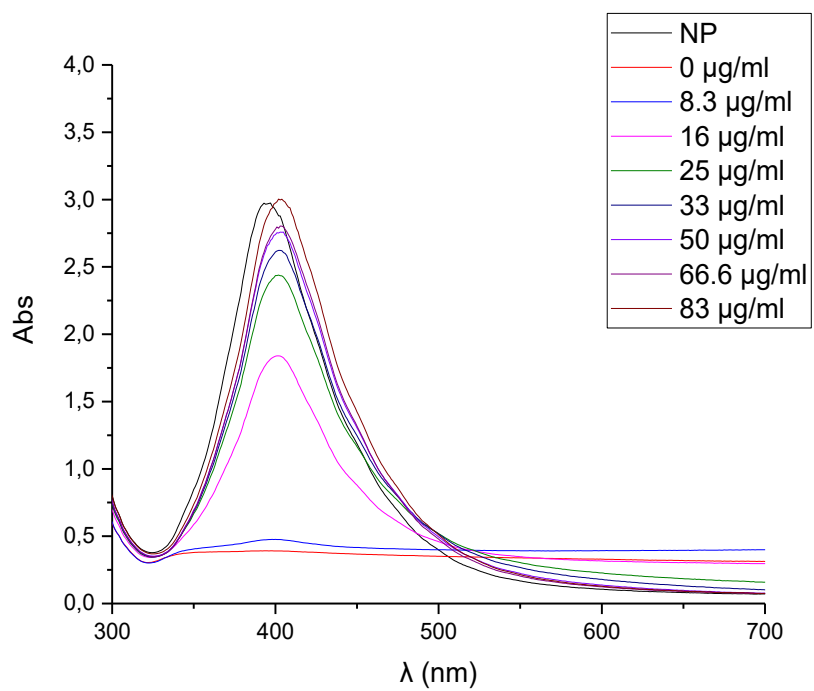


Figura 15: Analisi al lettore di piastra del campione a pH=11.5 ottenuto dopo 60 minuti di reazione.

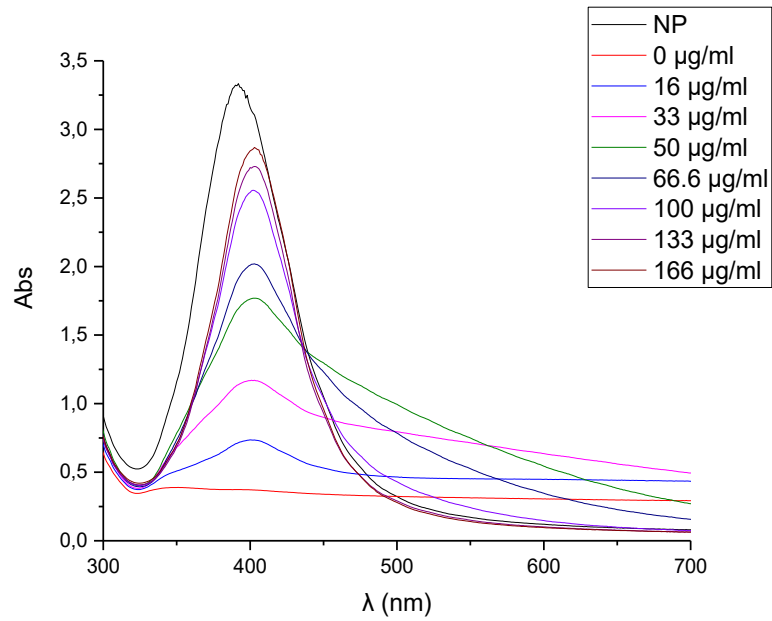


Figura 16: Analisi al lettore di piastra del campione a pH=11.5 ottenuto dopo 10 minuti di reazione, utilizzando una soluzione stock di BSA a concentrazione pari a 2 mg/ml.

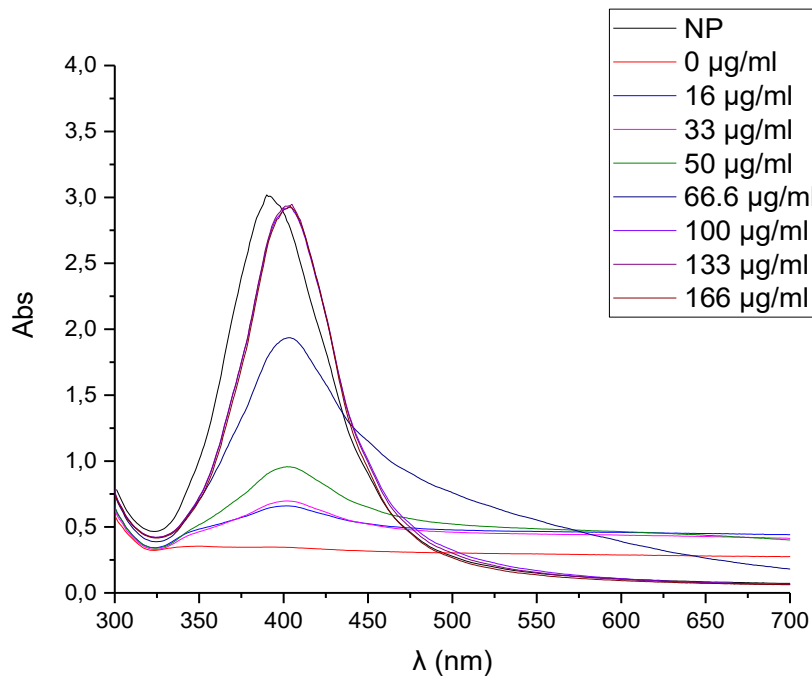


Figura 17: Analisi al lettore di piastra del campione a pH=11.5 ottenuto dopo 30 minuti di reazione, utilizzando una soluzione stock di BSA a concentrazione pari a 2 mg/ml.

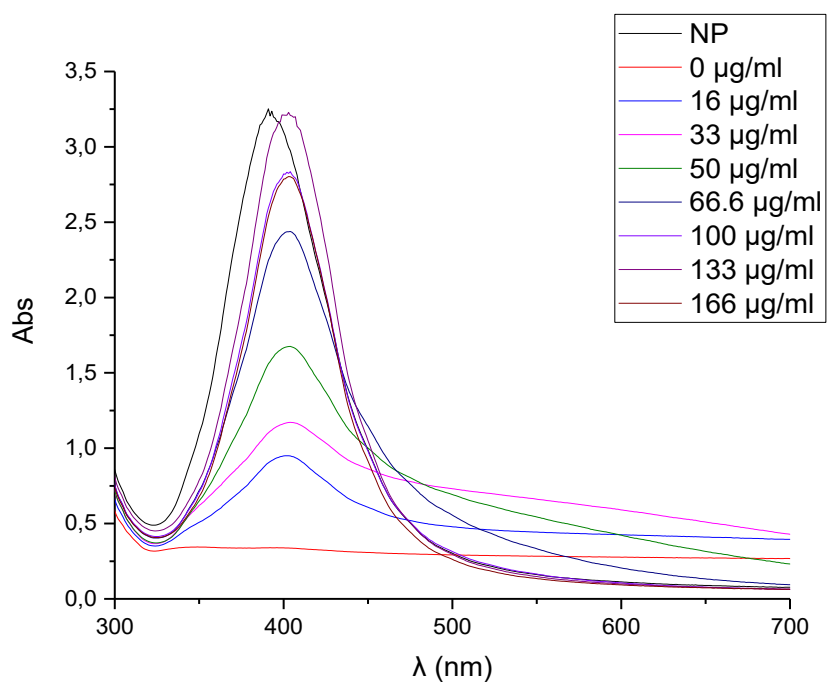


Figura 18: Analisi al lettore di piastra del campione a pH=11.5 ottenuto dopo 60 minuti di reazione, utilizzando una soluzione stock di BSA a concentrazione pari a 2 mg/ml.

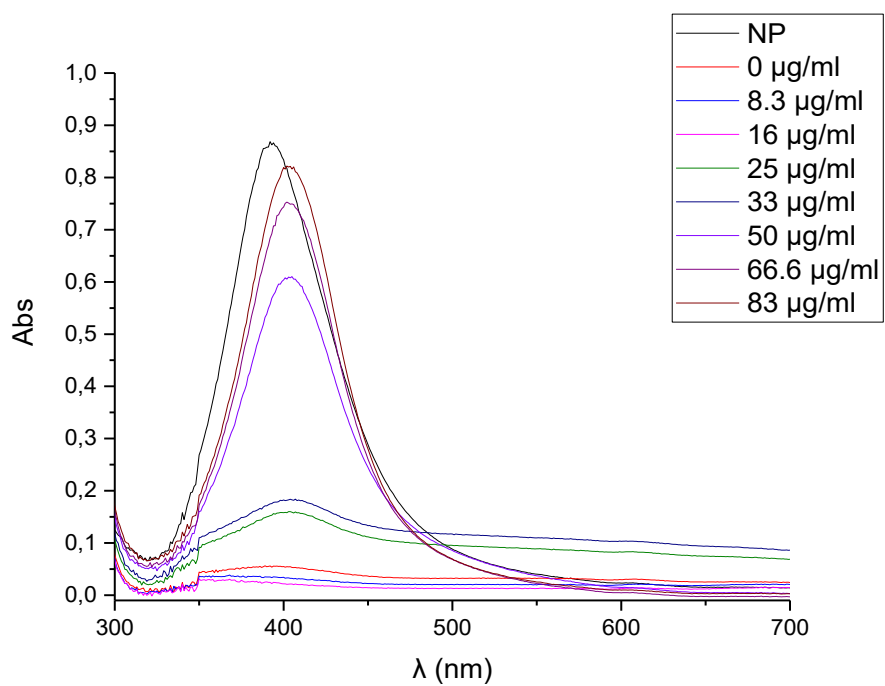


Figura 19: Analisi al lettore di piastra del surnatante a pH=11.5.

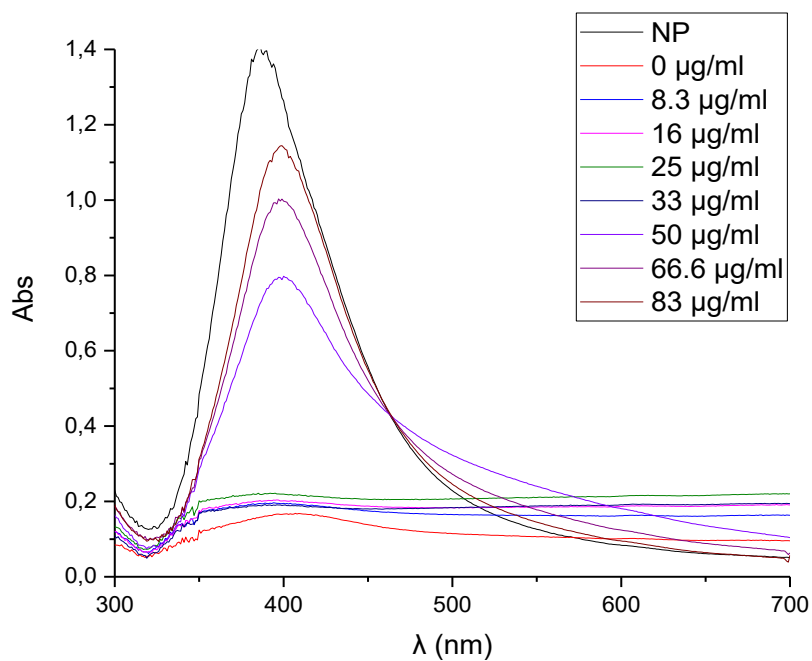


Figura 20: Analisi al lettore di piastra del pellet a pH=11.5.

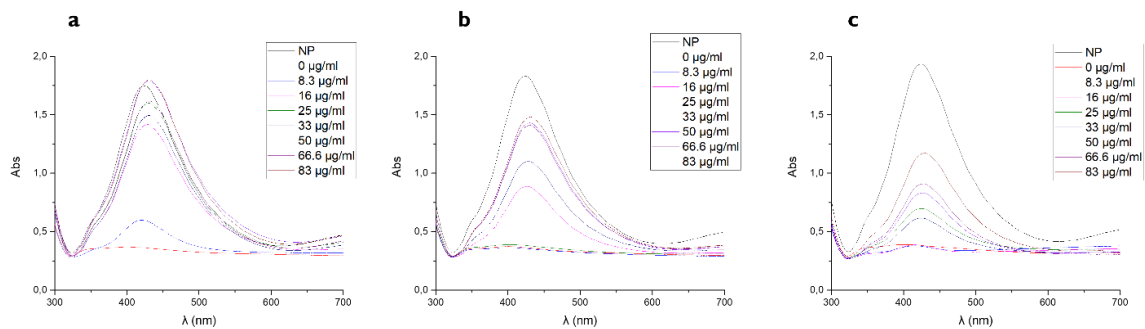


Figura 21: Analisi al lettore di piastra del colloide a pH 7.00 in presenza di BSA, incubato con NaCl 1 M (a), 2.5 M (b), 5 M (c).

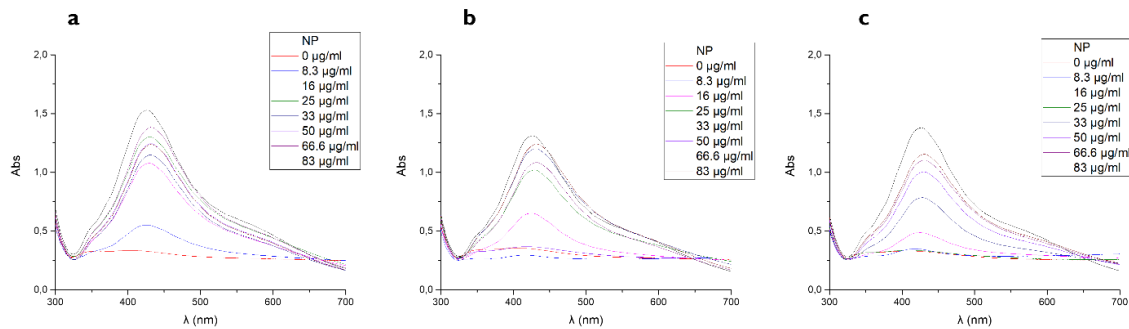


Figura 22: Analisi al lettore di piastra del colloide a pH 8.00 in presenza di BSA, incubato con NaCl 1 M (a), 2.5 M (b), 5 M (c).

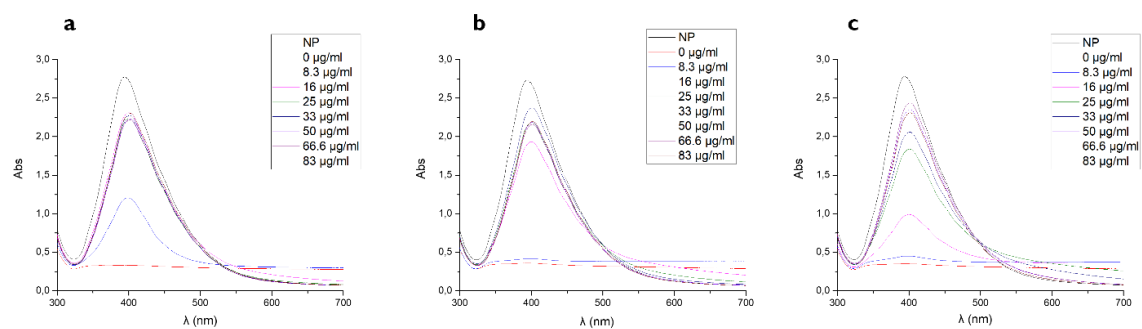


Figura 23: Analisi al lettore di piastra del colloide a pH 11.0 in presenza di BSA, incubato con NaCl 1 M (a), 2.5 M (b), 5 M (c).